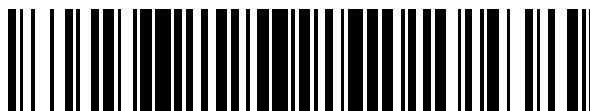


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 249**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014 PCT/EP2014/002182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018529**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014 E 14761281 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3030262**

54 Título: **Composición farmacéutica combinada**

30 Prioridad:

08.08.2013 EP 13003964

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

13.05.2020

73 Titular/es:

CYTUNE PHARMA (50.0%)
3 chemin Pressoir Chenaie
44100 Nantes, FR y
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR) (50.0%)

72 Inventor/es:

BECHARD, DAVID;
CHAPUT, NATHALIE y
DESBOIS, MÉLANIE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 760 249 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

Composición farmacéutica combinada

- 5 La presente invención se refiere a una nueva "composición farmacéutica combinada", y más específicamente a una combinación para tratar cáncer de un superagonista de IL-15 específico y de un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T tal como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

- 10 Una respuesta inmunitaria adaptativa implica activación, selección y proliferación clonal de dos clases principales de linfocitos denominados células T y células B. Después de encontrarse con un antígeno, las células T proliferan y se diferencian dando células efectoras específicas de antígeno, mientras que las células B proliferan y se diferencian dando células que secretan anticuerpos.

- 15 La activación de células T es un proceso de múltiples etapas que requiere varios acontecimientos de señalización entre la célula T y una célula presentadora de antígeno (APC). Para que se produzca la activación de células T, deben administrarse dos tipos de señales a una célula T en reposo.

- 20 El primer tipo está mediado por el receptor de células T específico de antígeno (TcR), y confiere especificidad a la respuesta inmunitaria.

- El segundo tipo coestimulador regula la magnitud de la respuesta y se administra a través de receptores accesorios sobre la célula T. Estos receptores comprenden receptores inmunosupresores (por ejemplo CTLA-4, PD-1 o KIR inhibidores) y receptores coestimuladores (por ejemplo CD40, 4-1BB, OX-40 o proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR)).

- Se han desarrollado estrategias terapéuticas sobre la inhibición de receptores inmunosupresores o sobre la activación de receptores coestimuladores para potenciar la respuesta antitumoral del sistema inmunitario.

- 30 El documento WO 2012/175222 da a conocer una inmunocitocina que comprende (a) un conjugado y (b) un anticuerpo o un fragmento del mismo ligado directa o indirectamente por covalencia a dicho conjugado, en la que dicho conjugado comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la interleucina 15 o derivados de la misma, y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de la IL-15Ra o derivados de la misma. Xu *et al.* (Cancer Research, vol. 73, n.º 10, páginas 3075-3086, 2013) dan a conocer que una única dosis de un complejo de un mutante superagonista de interleucina (IL)-15 y una proteína de fusión α Su/Fc del receptor de IL-15 dimérico, pero no IL-15 sola, elimina células de mieloma 5T33P y MOPC-315P en la médula ósea de ratones que portan tumor.

- 40 En realidad también se prevén estrategias combinadas. Ahora, los resultados son muy peligrosos según los compuestos sometidos a prueba.

Sumario de la invención

- 45 Ahora, los inventores muestran que una combinación de su compuesto específico, denominado RLI, con un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T da como resultado un porcentaje muy alto de remisión del tumor, mientras que tal remisión no podría contemplarse en vista de la remisión del tumor obtenida con RLI o antagonistas de receptores inmunosupresores solos.

- 50 Además, esta acción sinérgica también se obtuvo con una combinación de dosis baja en la que una dosis baja de RLI se combinó con una dosis baja de anti-PD1. Sorprendentemente, y en comparación con la combinación previa, esta combinación ha proporcionado una inhibición fuerte y sinérgica del crecimiento del tumor.

Esta fuerte sinergia permite contemplar nuevas terapias.

- 55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica combinada que comprende:

- 60 1) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana; un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo; y

- 65 2) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo,

un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo,

5 en la que dicho anticuerpo es un antagonista de PD-1/PD-L1/PD-L2, en la que dicho anticuerpo antagoniza o bien mediante la unión del receptor PD-1 o bien mediante la unión del ligando PD-L1 o PD-L2, en la que dicho conjugado y el anticuerpo o fragmento del mismo no están ligados.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende

10 (A) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana, un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo, en la que el uso comprende la administración simultánea, por separado o secuencial de (a) dicha composición farmacéutica y (b) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo, o

20 (B) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo,

25 en la que el uso comprende la administración simultánea, por separado o secuencial de (a) dicha composición farmacéutica y (b) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana, un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo, y

en la que dicho anticuerpo es un antagonista de PD-1/PD-L1/PD-L2,

35 en la que dicho anticuerpo antagoniza o bien mediante la unión del receptor PD-1 o bien mediante la unión del ligando PD-L1 o PD-L2.

40 La composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o la composición farmacéutica combinada de la presente invención, se adaptan preferiblemente para administración simultánea, por separado o secuencial para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra el protocolo de inyección usado en el modelo de cáncer de ratón con anti-PD1 de BIOXELL.

La figura 2 muestra la presencia de TIL en el modelo CT26.

La figura 3 muestra la terapia de combinación anti-PD1 (RPMI1-14) y RLI en ratones.

50 La figura 4 muestra la supervivencia de los ratones para el tratamiento de combinación anti-PD1/RLI.

La figura 5 muestra el protocolo de inyección usado en el modelo de cáncer de ratón.

55 La figura 6 muestra la terapia de combinación anti-PD1 (mBAT) y RLI en ratones.

Descripción detallada

Conjugado

60 El término "interleucina 15" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una citocina con similitud estructural con IL-2 (GRABSTEIN *et al.*, Science, vol. 264(5161), págs.: 965-968, 1994). Esta citocina también se conoce como IL-15, IL15 o MGC9721. Esta citocina e IL-2 comparten muchas actividades biológicas y se encontró que se unían a subunidades del receptor de hematopoyetina comunes. Por tanto, pueden competir por el mismo receptor, regulando de manera negativa la actividad de la otra. Se ha establecido IL-15 regula la activación y proliferación de células T y linfocitos citolíticos naturales, y que se muestra que el número de células de memoria CD8+ está controlado por un equilibrio entre esta citocina e IL2. La actividad de IL-15 puede medirse determinando

su inducción de proliferación sobre la línea celular kit225 (HORI *et al.*, Blood, vol. 70(4), págs.: 1069-72, 1987), tal como se da a conocer en los ejemplos.

Dicha IL-15 o derivados de la misma tienen al menos el 10% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, preferiblemente al menos el 25% y más preferiblemente al menos el 50%.

Dicha interleucina 15 es una interleucina 15 de mamífero, preferiblemente una interleucina 15 de primate, y más preferiblemente una interleucina 15 humana.

El experto puede identificar de manera sencilla la interleucina 15 de mamífero. Como ejemplo, puede citarse la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Rattus norvegicus* (número de registro NP_037261), de *Mus musculus* (número de registro NP_032383), de *Bos taurus* (número de registro NP_776515), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP_001075685), de *Ovis aries* (número de registro NP_001009734), de *Felis catus* (número de registro NP_001009207), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP_000576), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001038196), de *Cavia porcellus* (número de registro NP_001166300) o de *Clorocebus sabaeus* (número de registro ACI289).

Tal como se usa en el presente documento, el término "interleucina 15 de mamífero" se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 1.

El experto puede identificar de manera sencilla la interleucina 15 de primate. Como ejemplo, puede citarse la interleucina 15 de *Sus scrofa* (número de registro ABF82250), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro NP_001075685), de *Macaca fascicularis* (número de registro BAA19149), de *Homo sapiens* (número de registro NP_000576), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001038196) o de *Clorocebus sabaeus* (número de registro ACI289).

Tal como se usa en el presente documento, el término "interleucina 15 de primate" se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 2.

El experto puede identificar de manera sencilla la interleucina 15 humana y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados de interleucina 15" se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 10 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98,5% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos) o de al menos el 99% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). El experto puede identificar de manera sencilla tales derivados en vista de su conocimiento personal y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. Como ejemplo de tales derivados, pueden citarse los descritos en la solicitud de patente internacional PCT WO 2009/135031. También se entenderá que los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por aminoácidos químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados aumentan la semivida del polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que van a compararse, obtenido con la mejor alineación de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y extendiéndose las diferencias entre estas dos secuencias aleatoriamente sobre las secuencias de aminoácidos. Tal como se usa en el presente documento, "mejor alineación" o "alineación óptima", significa la alineación para la cual el porcentaje de identidad determinado (véase a continuación) es el mayor. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realiza habitualmente comparando estas secuencias que se han alineado previamente según la mejor alineación; esta comparación se realiza en segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. Puede realizarse la mejor alineación de secuencias para realizar la comparación, además de manera manual, usando el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (Ad. App. Math., vol. 2, págs.: 482, 1981), usando el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, pág.: 443, 1970), usando el método de similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, pág.: 2444, 1988), usando softwares informáticos que usan tales algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.), usando los algoritmos de alineación múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., Nucleic Acids Research, vol. 32, págs.: 1792, 2004). Para obtener la mejor alineación local, puede usarse preferiblemente el software BLAST con la matriz BLOSUM 62. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas óptimamente, pudiendo abarcar las secuencias de aminoácidos adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia con el fin de obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el

número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

5 Preferiblemente, los derivados de interleucina 15 son agonistas o superantagonistas de IL-15. Un experto en la técnica puede identificar de manera sencilla un agonista o superagonista de IL-15. Como ejemplo de agonista o superagonista de IL-15, pueden citarse los dados a conocer en la solicitud de patente internacional WO 2005/085282 o en ZHU *et al.* (J. Immunol., vol. 183(6), págs.: 3598-607, 2009).

10 Todavía preferiblemente, dicho agonista o superagonista de IL-15 se selecciona en el grupo que comprende/que consiste en L45D, L45E, S51D, L52D, N72D, N72E, N72A, N72S, N72Y y N72P (en referencia a la secuencia de IL-15 humana, SEQ ID NO: 3).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “el dominio sushi de IL-15R α ” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un dominio que empieza en el primer residuo de cisteína (C1) después del péptido señal de IL-15R α , y que termina en el cuarto residuo de cisteína (C4) después de dicho péptido señal. Dicho dominio sushi correspondiente a una porción de la región extracelular de IL-15R α es necesario para su unión a IL-15 (WEI *et al.*, J. Immunol., vol. 167(1), págs.: 277-282, 2001).

20 Dicho dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a interleucina-15 humana, preferiblemente al menos el 25% y más preferiblemente al menos el 50%. Dicha actividad de unión puede determinarse de manera sencilla mediante el método dado a conocer en WEI *et al.* (mencionado anteriormente, 2001).

25 Dicho dominio sushi de la IL-15R α es el dominio sushi de una IL-15R α de mamífero, preferiblemente el dominio sushi de una IL-15R α de primate y más preferiblemente el dominio sushi de la IL-15R α humana.

30 El experto puede identificar de manera sencilla el dominio sushi de una IL-15R α de mamífero. Como ejemplo, puede citarse el dominio sushi de una IL-15R α de *Rattus norvegicus* (número de registro XP_002728555), de *Mus musculus* (número de registro EDL08026), de *Bos taurus* (número de registro XP_002692113), de *Oryctolagus cuniculus* (número de registro XP_002723298), de *Macaca fascicularis* (número de registro ACI42785), de *Macaca nemestrina* (número de registro ACI42783), de *Homo sapiens* (número de registro Q13261.1), de *Macaca mulatta* (número de registro NP_001166315), *Pongo abelii* (número de registro XP_002820541), *Cercocebus torquatus* (número de registro ACI42784), *Callithrix jacchus* (número de registro XP_002750073) o de *Cavia porcellus* (número de registro NP_001166314).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio sushi de una IL-15R α de mamífero” se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 4.

40 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de una IL-15R α de mamífero se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 5.

45 El experto puede identificar de manera sencilla el dominio sushi de una IL-15R α de primate. Como ejemplo, pueden citarse dominios sushi de IL-15R α de *Oryctolagus cuniculus*, de *Macaca fascicularis*, de *Macaca nemestrina*, de *Homo sapiens*, de *Macaca mulatta*, *Pongo abelii*, *Cercocebus torquatus* o *Callithrix jacchus*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio sushi de una IL-15R α de primate” se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 6.

50 Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de una IL-15R α de primate se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 7.

55 El experto puede identificar de manera sencilla el dominio sushi de IL-15R α humana y se refiere a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

Preferiblemente, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α humana se refiere a SEQ ID NO: 9.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados del dominio sushi de la IL-15R α ” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, preferiblemente de al menos el 96% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R α y el experto

65

puede identificarlos de manera sencilla en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También se entenderá que los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por aminoácidos químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados permiten aumentar la semivida del polipéptido.

5 Según una realización preferida, el conjugado comprende (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α o derivados de la misma.

10 El dominio bisagra de IL-15R α se define como la secuencia de aminoácidos que empieza en el primer residuo amino después del dominio sushi y que termina en el último residuo de aminoácido antes del primer sitio posible de glicosilación. En IL-15R α humana, la secuencia de aminoácidos de la región bisagra consiste en los catorce aminoácidos que se ubican después del dominio sushi de esta IL-15R α , en una posición C-terminal en relación con dicho dominio sushi, es decir, dicha región bisagra de IL-15R α empieza en el primer aminoácido después de dicho residuo de cisteína (C4), y termina en el decimocuarto aminoácido (contando en la orientación convencional “desde N-terminal hasta C-terminal”).

Dichos dominios sushi y bisagra de IL-15R α son los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero, preferiblemente los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate y más preferiblemente los dominios sushi y bisagra de la IL-15R α humana.

20 El experto puede identificar de manera sencilla la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de mamífero” se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 10.

25 El experto puede identificar de manera sencilla la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de una IL-15R α de primate” se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 11.

30 El experto puede identificar de manera sencilla la secuencia de aminoácidos de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α humana. Tal como se usa en el presente documento, el término “dominios sushi y bisagra de IL-15R α humana” se refiere a la secuencia consenso SEQ ID NO: 12.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados de los dominios sushi y bisagra de IL-15R α ” se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 93% (es decir, correspondiente a aproximadamente 5 sustituciones de aminoácidos) con una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, preferiblemente de al menos el 97% (es decir, correspondiente a aproximadamente 2 sustituciones de aminoácidos), y más preferiblemente de al menos el 98% (es decir, correspondiente a aproximadamente 1 sustitución de aminoácido). Tales derivados comprenden los cuatro residuos de cisteína del dominio sushi de L-15R α y el experto puede

40 identificarlos de manera sencilla en vista de su conocimiento general y de la enseñanza de la presente solicitud de patente. También se entenderá que los aminoácidos naturales pueden reemplazarse por aminoácidos químicamente modificados. Normalmente, tales aminoácidos químicamente modificados permiten aumentar la semivida del polipéptido.

45 Ambos polipéptidos i) y ii) del conjugado pueden ligarse de manera no covalente tal como en el complejo dado a conocer en la patente US 8.124.084 B2. Dicho conjugado o complejo puede obtenerse de manera sencilla proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido i), proporcionando una cantidad adecuada del polipéptido ii), mezclando ambos polipéptidos en condiciones iónicas y de pH adecuadas durante una duración suficiente para permitir la formación del complejo (es decir, conjugado), y opcionalmente concentrar o purificar dicho complejo. Los polipéptidos del complejo (es decir, conjugado) pueden formarse, por ejemplo, usando un sintetizador peptídico según métodos convencionales; expresando cada polipéptido por separado en una célula o un extracto celular, luego aislando y purificando el polipéptido. Opcionalmente, el complejo polipeptídico terapéutico de la invención puede formarse expresando ambos polipéptidos i) y ii) en la misma célula o extracto celular, luego aislando y purificando los complejos, por ejemplo, usando técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de afinidad con anticuerpos contra la porción de linfocinas, la porción del receptor de linfocinas, o contra el complejo.

55 Ambos polipéptidos i) y ii) del conjugado también pueden ligarse de manera covalente usando agentes de acoplamiento de proteína bifuncional o en una proteína de fusión.

60 El experto conoce bien los agentes de acoplamiento de proteína bifuncional así como los métodos que los usan, e incluyen, como ejemplos, (2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), (N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y

compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno).

El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína creada a través de la unión de dos o más genes que originalmente codificaban para diferentes proteínas. También se conoce como proteína quimérica. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales que se derivan de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica. Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada a través de modificación por ingeniería genética de un gen de fusión. Esto implica normalmente retirar el codón de terminación de una secuencia de ADNc que codifica para la primera proteína, luego anexando la secuencia de ADNc de la segunda proteína en marco a través de PCR de extensión por superposición o ligación. Esa secuencia de ADN la expresará entonces una célula como única proteína. La proteína puede modificarse por ingeniería genética para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o sólo una porción de cualquiera.

En una realización preferida, el conjugado es una proteína de fusión.

La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma puede estar en una posición C-terminal o en una posición N-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la interleucina 15 o derivados de la misma está en una posición C-terminal en relación con la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma.

La secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma y la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma pueden separarse mediante una primera secuencia de aminoácidos "ligadora". Dicha primera secuencia de aminoácidos "ligadora" puede tener una longitud suficiente para garantizar que la proteína de fusión forme estructuras secundarias y terciarias adecuadas.

La longitud de la primera secuencia de aminoácidos ligadora pueden variar sin afectar significativamente la actividad biológica de la proteína de fusión. Normalmente, la primera secuencia de aminoácidos ligadora comprende al menos uno, pero no menos de 30 aminoácidos por ejemplo, un ligador de 2-30 aminoácidos, preferiblemente de 10-30 aminoácidos, más preferiblemente de 15-30 aminoácidos, todavía más preferiblemente de 15-25 aminoácidos, lo más preferiblemente de 18-22 aminoácidos.

Secuencias de aminoácidos ligadoras preferidas son aquellas que permiten que el conjugado adopte una conformación adecuada (es decir, una conformación que permita una actividad de transducción de señales adecuada a través de la ruta de señalización IL-15R β /gamma).

Las primeras secuencias de aminoácidos ligadoras más adecuadas (1) adoptarán una conformación extendida flexible, (2) no presentarán una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que puede interactuar con los dominios funcionales de las proteínas de fusión y (3) tendrán carácter cargado o hidrófobo mínimo que puede promover la interacción con los dominios de proteína funcionales.

Preferiblemente, la primera secuencia de aminoácidos ligadora comprende aminoácidos casi neutros seleccionados en el grupo que comprende Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) y Gln (Q), lo más preferiblemente en el grupo que comprende Gly (G), Asn (N) y Ser (S).

Ejemplos de secuencias ligadoras se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 5.073.627 y 5.108.910.

Los ligadores flexibles ilustrativos que son más adecuados particularmente para la presente invención incluyen aquellos codificados por las secuencias de SEQ ID NO: 13 (SGGSGGGGSGGGSGGGGSLQ), SEQ ID NO: 14 (SGGSGGGGSGGGSGGGGSGG) o SEQ ID NO: 15 (SGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ).

Todavía preferiblemente, el conjugado es una proteína de fusión que tiene la secuencia SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

Anticuerpo antagonista del receptor inmunosupresor

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina correspondiente a un tetrámero que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas (aproximadamente de 50-70 kDa cuando tienen longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (aproximadamente de 25 kDa cuando tienen longitud completa) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada N-terminal (abreviada en el presente documento como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, IgD e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está compuesta por una

región variable de cadena ligera N-terminal (abreviada en el presente documento como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según convenciones bien conocidas. La capacidad funcional del anticuerpo de unirse a un antígeno particular depende de las regiones variables de cada pareja de cadena ligera/pesada, y se determina en gran medida por las CDR.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo quimérico y/o anticuerpo humanizado.

Ventajosamente, el término anticuerpo se refiere a una IgG, tal como IgG1, IgG2 (IgG2a o IgG2b), IgG3 e IgG4. Preferiblemente, el término anticuerpo se refiere a IgG1 o IgG2, y más preferiblemente a IgG2a.

"Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo que se compone de regiones variables de una inmunoglobulina murina y de regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Esta alteración consiste simplemente en sustituir la región constante de un anticuerpo humano con la región constante murina, dando como resultado de ese modo una quimera humana/murina que puede tener inmunogenicidad suficientemente baja para ser aceptable para uso farmacéutico. Se han notificado varios métodos para producir tales anticuerpos quiméricos, formando de ese modo parte del conocimiento general del experto en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.225.539).

"Anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo que está compuesto parcial o completamente de secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR). Esta humanización de la región variable del anticuerpo y finalmente la CDR se realiza mediante técnicas que ya se conocen bien en la técnica. Como ejemplo, la solicitud de patente británica GB 2188638A y la patente estadounidense n.º 5.585.089 dan a conocer procesos en los que se producen anticuerpos recombinantes en los que la única porción del anticuerpo que se sustituye es la región determinante de complementariedad, o "CDR". La técnica de injerto de CDR se ha usado para generar anticuerpos que consisten en CDR murinas y regiones constantes y de entramado de regiones variables humanas (véase, por ejemplo, RIECHMANN *et al.*, Nature, vol. 332, pág.: 323-327, 1988). Estos anticuerpos mantienen las regiones constantes humanas que son necesarias para la función efectora dependiente de Fc, pero es mucho menos probable que evoquen una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo. Como ejemplo, las regiones de entramado de las regiones variables se sustituyen por las correspondientes regiones de entramado humanas que dejan la CDR no humana sustancialmente intacta, o que incluso reemplazan la CDR con secuencias derivadas de un genoma humano. Se producen anticuerpos totalmente humanos en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunitarios se han alterado para corresponderse con sistemas inmunitarios humanos. Tal como se mencionó anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos de la invención emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo fragmentos que representan formas de cadenas sencillas.

De nuevo, un anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo que comprende una región de entramado humana, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en la que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente el 85 o el 90%, preferiblemente al menos el 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humanas nativas. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada no abarcaría normalmente un anticuerpo quimérico de región constante humana/región variable de ratón. Como ejemplo, puede llevarse a cabo el diseño de inmunoglobulinas humanizadas de la siguiente manera: cuando un aminoácido se encuentra en la siguiente categoría, el aminoácido de región de entramado de una inmunoglobulina humana que va a usarse (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido de región de entramado de una inmunoglobulina no humana que proporciona CDR (inmunoglobulina donante): (a) el aminoácido en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el correspondiente aminoácido en la inmunoglobulina donante es típico para inmunoglobulina humana en esa posición; (b) la posición del aminoácido está inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de cadena lateral de un aminoácido de región de entramado está dentro de aproximadamente 5-6 Angstroms (centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional (CO M. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, págs.: 2869, 1991). Cuando cada uno de los aminoácidos en la región de entramado humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es inusual para inmunoglobulina humana en esa posición, tal aminoácido se reemplaza por un aminoácido típico para inmunoglobulina humana en esa posición.

El término "fragmento de anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo. El experto puede identificar de manera sencilla tales fragmentos y comprenden, como ejemplo, fragmento F_{ab} (por ejemplo, mediante digestión

con papaína), fragmento F_{ab}' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina y reducción parcial), fragmento $F_{(ab)'}_2$ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), F_{acb} (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), F_d (por ejemplo, mediante digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), y también fragmento scF_v (F_v de cadena sencilla; por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular) están abarcados por la invención.

5 Tales fragmentos pueden producirse mediante técnicas recombinantes, sintéticas o escisión enzimática, tal como se conocen en la técnica y/o tal como se describen en el presente documento. También pueden producirse anticuerpos en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los que uno o más codones de terminación se han introducido aguas arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica para una porción de cadena pesada $F_{(ab)'}_2$ puede diseñarse para incluir secuencias de ADN que codifican para el dominio CH_1 y/o región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos pueden unirse juntas químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como proteína contigua usando técnicas de modificación por ingeniería genética.

15 Preferiblemente, dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento scF_v .

El término "anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T" se refiere a un anticuerpo que antagoniza el receptor inmunosupresor PD-1 o bien uniéndose a este receptor o bien uniéndose a este ligando, promoviendo de ese modo la activación inmunitaria evitando señales de regulación por disminución. Se da a conocer además que otro "anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T" es un anticuerpo que antagoniza el receptor inmunosupresor CTL-A4 o KIR inhibidores o bien uniéndose a este receptor o bien uniéndose a este ligando, promoviendo de ese modo la activación inmunitaria evitando señales de regulación por disminución. Como ejemplo de anticuerpo antagonista de receptor inmunosupresor, pueden citarse los anticuerpos correspondientes a CTL-A4, PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, KIR inhibidores, CD276, VTCN1, BTLA/HVEM, LAG3, HAVCR2 y antagonista ADORA2A, preferiblemente anticuerpos PD-1/PD-L1.

30 CTL-A4 (antígeno asociado a linfocito citotóxico, también denominado CD 152) se descubrió en 1987 (BRUNET *et al.*, Nature, vol. 328, págs.: 267-270, 1987). El papel de CTL-A4 es principalmente inhibir la activación de células T y esto se demostró en ratones deficientes en CTL-A4 que padecían linfoproliferación masiva (CHAMBERS *et al.*, Immunity, vol. 7, págs.: 8855-8959, 1997). Ahora, el bloqueo de CTL-A4 se ha demostrado que potencia respuestas de células T *in vitro* (WALUNAS *et al.*, Immunity, vol. 1, págs.: 405-413, 1994) e *in vivo* (KEARNEY, J. Immunol, vol. 155, págs.: 1032-1036, 1995) y también que aumenta la inmunidad antitumoral (LEACH, Science, vol. 271, págs.: 1734-1736, 1996). Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de CTL-A4, pueden citarse ipilimumab (también denominado MDX-010 y 10D1, disponible de MEDAREX y comercializado como YERVOY™ por BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) dado a conocer en el documento WO 01/14424, ticilimumab (también conocido como 11.2.1 y CP-675.206) dado a conocer en el documento WO 00/37504, y también los anticuerpos CTL-A4 dados a conocer en las solicitudes de patente internacionales WO 98/42752, WO 01/14424, WO 2004/035607 y WO 2012/120125, en los documentos EP 1212422 y EP 1262193, en las patentes estadounidenses n.ºs US 5.811.097, US 5.855.887, US 5.977.318, US 6.051.227, US 6.207.156, US 6.682.736, US 6.984.720, US 7.109.003 y US 7.132.281.

45 La muerte celular programada 1 también conocida como PD-1 (también denominada PDCD1 o CD279) es una glicoproteína de membrana tipo I de ~55 kD. PD-1 es un receptor de la familia de genes coestimuladores CD28, que se expresa moderadamente en linfocitos citolíticos naturales y células T y B indiferenciados y se regula por incremento mediante señalización del receptor de células T/B en linfocitos, monocitos y células mieloides. PD-1 tiene dos ligandos conocidos con distintos perfiles de expresión, PD-L1 (B7-H1), que se expresa ampliamente, es decir, en linfocitos indiferenciados en células B y T activadas, monocitos y células dendríticas, y PD-L2 (B7-DC), cuya expresión está restringida, es decir, en células dendríticas activadas, macrófagos y monocitos y en células endoteliales vasculares. En varios modelos de tumores singénicos murinos, el bloqueo de o bien PD-1 o bien PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento del tumor o indujo la remisión completa. Por tanto, PD-1 se reconoce como un miembro importante en la regulación del sistema inmunitario y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de PD-1/PD-L1/PD-L2, puede citarse nivolumab (también conocido como BMS-936558 o MDX1106; anticuerpo anti-PD-1, BRISTOL-MYERS SQUIBB) se da a conocer en el documento WO 2006/121168, Merck 3745 (también conocido como MK-3475 o SCH-900475, es un anticuerpo anti-PD-1) se da a conocer en el documento WO 2009/114335, CT-01 1 (también conocido como hBAT o hBAT-1, anticuerpo anti-PD-1) se da a conocer en el documento WO 2009/101611, lambrolizumab se da a conocer en el documento WO2008/156712, AMP514 que se da a conocer en los documentos WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828 y WO2010/098788, y también los anticuerpos dados a conocer en las solicitudes de patente internacionales WO 2004/056875, WO 2006/056875, WO 2008/083174, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO 2010/089411, WO 2011/110604, WO 2012/135408 y WO 2012/145493. Dicho antagonista de PD-1 puede corresponderse con un anticuerpo anti-PD-L1 tal como MDX-1 105 (también conocido como BMS-936559, anticuerpo anti-PD-L1) dado a conocer en el documento WO 2007/005874 o YW243.55.S70 (también conocido como MPDL3280A o RG7446; anticuerpo anti-PD-L1) dado a conocer en el documento WO 2010/077634.

65 Los receptores similares a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR), son una familia de proteínas de la superficie

celular que se encuentran en células importantes del sistema inmunitario denominadas linfocitos citolíticos naturales (NK). Regulan la función de destrucción de estas células interactuando con moléculas del CMH de clase I, que se expresan en todos los tipos de células. Esta interacción les permite detectar células infectadas por virus o células tumorales que tienen un nivel bajo característico de CMH de clase I en su superficie. La mayoría de KIR son inhibidores, lo que significa que su reconocimiento de CMH suprime la actividad citotóxica de su linfocito citolítico natural. Sólo un número limitado de KIR tiene la capacidad de activar la célula.

Los KIR inhibidores tienen una larga cola citoplásmica que contiene un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM), que transduce señales inhibitoras al linfocito citolítico natural tras el acoplamiento de sus ligandos del CMH de clase I. Los KIR inhibidores conocidos incluyen miembros de las subfamilias KIR2DL y KIR3DL que comprenden KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DL3. Como ejemplo de anticuerpos correspondientes a antagonistas de KIR inhibidores, puede citarse el anticuerpo 1-7F9 dado a conocer en el documento WO 2006/003179.

Se sabe que los miembros de la familia de ligandos B7 tienen una fuerte actividad inmunorreguladora por células inmunitarias y más recientemente por células tumorales, familia que comprende CD276 y VTCN1.

CD276 (agrupación de diferenciación 276) (también conocido como B7H3, B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7-H3) es una proteína transmembrana de tipo I de la familia de ligandos B7, que se identificó en primer lugar en células dendríticas y células T activadas. Algunos tumores sólidos expresan CD276 y se piensa que participan en la regulación de la respuesta inmunitaria mediada por células T. Más especialmente, parece que CD276 regula por disminución respuesta inmunitaria de cooperadores T y suprime la inmunidad (SUH W. K. *et al.*, 2003. *Nat Immunol* 4(9): 899-906). Como ejemplo de antagonista de CD276, puede citarse el anticuerpo 8H9 dado a conocer en la solicitud de patente US 2005/0169932 y el documento WO 2008/116219, y otros anticuerpos tales como MGA271 dados a conocer en el documento WO 2011/109400.

VTCN1 (dominio del conjunto V que contiene el inhibidor 1 de activación de células T), también conocido como B7X; B7H4; B7S1; B7-H4, también es un miembro de la familia B7. Se piensa que VTCN1 desempeña un papel en la regulación inhibitora de la respuesta de células T y estudios han demostrado que altos niveles de esta proteína se han correlacionado con la progresión tumoral. Como ejemplo de antagonistas de VTCN1, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2009/073533.

BTLA (atenuador de linfocitos B y T), también conocido como CD272, se induce durante la activación de células T, y permanece expresado en células Th1 pero no en células Th2. BTLA presenta inhibición de células T por medio de interacción con el factor de necrosis tumoral (receptor), miembro 14 (TNFRSF14), también conocido como mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), TR2; ATAR; HVEA; CD270; LIGHTR. Se identificó TNFRSF14 como mediador celular de la entrada del virus del herpes simple (VHS). Se encontró que la región citoplásmica de este receptor se unía a varios miembros de la familia TRAF, que pueden mediar en las rutas de transducción de señales que activan la respuesta inmunitaria. Finalmente, los complejos BTLA/HVEM regulan negativamente las respuestas inmunitarias de células T. Como ejemplo de antagonista de BTLA/HVEM, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en los documentos WO 2008/076560, WO 2010/106051 y WO 2011/014438.

LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos, también conocido como CD223) pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y contiene 4 dominios extracelulares similares a Ig. Como ejemplo de antagonistas de LAG3, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2010/019570.

HAVCR2 (receptor 2 celular del virus de la hepatitis A, también conocido como Tim-3, KIM-3; TIMD3; Tim-3; y TIMD-3) es una proteína de la superficie celular específica de Th1 que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. HAVCR2 regula la activación de macrófagos e inhibe las respuestas auto y aloinmunitarias mediadas por Th1, promoviendo de ese modo la tolerancia inmunológica. Como ejemplo de antagonistas de HAVCR2, pueden citarse los anticuerpos dados a conocer en el documento WO 2013/006490A.

ADORA2A (receptor de adenosina A_{2A}, también conocido como A_{2A}R, RDC8; o ADORA2) pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína (proteína G) de unión a nucleótido guanina (GPCR), que se subdivide en clases y subtipos. Esta proteína desempeña un papel importante en muchas funciones biológicas, tales como la circulación y el ritmo cardíaco, el flujo sanguíneo cerebral y renal, la función inmunitaria, la regulación del dolor y el sueño. Se ha implicado en condiciones patofisiológicas tales como enfermedades inflamatorias y trastornos neurodegenerativos.

Dicho anticuerpo o fragmento del mismo y dicho conjugado no están ligados.

Ácidos nucleicos y vectores

Tal como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN, preferiblemente a ADN.

Preferiblemente, un “polinucleótido” de este tipo se liga operativamente a una secuencia de expresión génica, que dirige la expresión del ácido nucleico dentro de una célula procariota o eucariota, preferiblemente dentro de una célula eucariota. La “secuencia de expresión génica” es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación promotora-potenciadora, que facilita la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico de inmunocitocina al que se liga operativamente. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible.

Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina, promotor de la creatina cinasa muscular, promotor del factor de elongación humano y otros promotores constitutivos. Los promotores virales a modo de ejemplo que funcionan de manera constitutiva en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del virus del simio (por ejemplo, VS40), virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (VSR), virus de la hepatitis B (VHB), las largas repeticiones terminales (LTR) de virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa de virus del herpes simple. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores constitutivos.

Los promotores útiles como secuencias de expresión génica también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente de inducción. Por ejemplo, la metalotióna en el promotor se induce para promover la transcripción y traducción en presencia de determinados iones metálicos. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores inducibles.

En general, la secuencia de expresión génica incluirá, según sea necesario, secuencias no transcriptoras en 5' y no traductoras en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de caperuza, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias no transcriptoras en 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido operativamente. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras hacia 5' según se desee. Tal como se usa en el presente documento, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención y la secuencia de expresión génica se dice que están “ligadas operativamente” cuando se ligan de manera covalente de tal manera que colocan la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia que codifica para la inmunocitocina de la invención bajo la influencia o el control de la secuencia de expresión génica.

Se dice que dos secuencias de ADN están ligadas operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica en 5' da como resultado la transcripción de la inmunocitocina de la invención y si la naturaleza de la unión entre la dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de la inmunocitocina de la invención o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que va a traducirse en una proteína. Por tanto, una secuencia de expresión génica estaría ligada operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención si la secuencia de expresión génica pudiera efectuar la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico de modo que el transcrito resultante se traduce en el polipéptido deseado.

Ventajosamente, dicha secuencia de ácido nucleico comprende un intrón, dado que las moléculas de ARNm previo han demostrado a menudo mejorar los rendimientos de producción de moléculas recombinantes. Puede usarse cualquier secuencia de intrón, y como ejemplo, puede citarse la dada a conocer en ZAGO *et al.* (Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 52(Pt 3), págs.: 191-8, 2009) y en CAMPOS-DA-PAZ *et al.* (Mol. Biotechnol., vol. 39(2), págs.: 155-8, 2008).

El polinucleótido que codifica para el conjugado o para el anticuerpo inmunomodulador puede administrarse *in vivo* solo o en asociación con un vector.

En su sentido más amplio, un “vector” es cualquier vehículo que puede facilitar la transferencia del ácido nucleico que codifica para la inmunocitocina de la invención a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, fagémidos, episomas, cromosomas artificiales, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de inmunocitocina.

Los vectores plasmídicos son un tipo preferido de vector y se han descrito extensamente en la técnica y los conocen bien los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SANBROOK *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual,” segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Los ejemplos no limitativos de plásmidos incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, VS40 y pBlueScript, y otros plásmidos los conocen bien los expertos habituales en la técnica. Además, los plásmidos pueden diseñarse a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN.

Preferiblemente, el vector puede incluir marcadores seleccionables que son activos en células tanto bacterianas como de mamíferos.

5 Composiciones farmacéuticas y usos médicos

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

10 La composición farmacéutica de la invención puede incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente reacciones alérgicas o reacciones indeseables similares, tales como malestar gástrico, mareo y similares cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerarse en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

20 El término "portador" se refiere a un disolvente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

25 En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir la evolución de, o prevenir el trastorno o estado al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o estado. La expresión "tratar cáncer" tal como se usa en el presente documento, significa la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, tal tratamiento también conduce a la remisión del crecimiento del tumor, es decir, la disminución del tamaño de un tumor medible. Lo más preferiblemente, tal tratamiento conduce a la remisión completa del tumor.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para inhibir el crecimiento de células cancerosas, preferiblemente suficiente para inducir la remisión del crecimiento del tumor. Las dosis administradas pueden adaptarse en función de diversos parámetros, en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración de tratamiento deseada. De manera natural, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente del estado que va a tratarse, la gravedad de la dolencia, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc. No se pretende que los intervalos de dosis eficaces proporcionados a continuación limiten la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida puede ajustarse para cada sujeto, tal como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin experimentación excesiva.

40 En vista de la notable eficacia de la combinación de la invención, el experto puede planear usar dosis muy pequeñas de ambos compuestos individuales para tratar un sujeto.

45 Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo antagonista del receptor inmunosupresor de la invención puede administrarse mediante inyección a una dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, preferiblemente a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, y lo más preferiblemente a una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos.

50 Preferiblemente, dicho anticuerpo antagonista de receptor inmunosupresor puede administrarse mediante inyección a una dosis de al menos 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto, preferiblemente de al menos 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto, y lo más preferiblemente a una dosis de al menos 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto.

55 Como ejemplo no limitativo, el conjugado de la invención puede administrarse mediante inyección a una dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, preferiblemente a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, y lo más preferiblemente a una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos.

Preferiblemente, dicho conjugado puede administrarse mediante inyección a una dosis de al menos 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto, preferiblemente de al menos 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto, y lo más preferiblemente a una dosis de al menos 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto.

60 Como ejemplo, las etapas de administración pueden corresponderse con administraciones tópicas, orales, intranasales, intraoculares, intravenosas, intramusculares, intratumorales o subcutáneas, y similares. Preferiblemente, estas etapas de administración corresponden a inyección. Por tanto, el conjugado, el anticuerpo inmunomodulador o fragmento del mismo, el polinucleótido que codifica para tales polipéptidos, o los vectores que comprenden tales polinucleótidos se asocian con vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación prevista para inyección. Estos pueden ser, en particular, disoluciones isotónicas, estériles, salinas

65

(fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

5 El conjugado, el anticuerpo inmunomodulador o fragmento del mismo, el polinucleótido que codifica para tales polipéptidos, o los vectores que comprenden tales polinucleótidos pueden solubilizarse en un tampón o agua o incorporarse en emulsiones, microemulsiones, hidrogeles (por ejemplo, hidrogeles basados en copolímeros tribloque de PLGA-PEG-PLGA), en microesferas, en nanoesferas, en micropartículas, en nanopartículas (por ejemplo, micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (por ejemplo, poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido lactida-co-glicólico) (PLGA) ; microesferas, nanoesferas, micropartículas o nanopartículas de poliglutamato), en liposomas, u otras formulaciones galénicas. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida hasta el grado de inyectabilidad aceptable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 Pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa.

20 También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

25 El conjugado, el anticuerpo antagonista del receptor inmunosupresor o fragmento del mismo, el polinucleótido que codifica para tales polipéptidos, o los vectores que comprenden tales polinucleótidos invención pueden formularse para dar composiciones en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos y fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

35 El portador también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Los polipéptidos también pueden modificarse, mediante pegilación como ejemplo, para aumentar su biodisponibilidad.

40 Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

45 La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polioles y formulaciones covalentes y no covalentes que potencian la semivida.

50 Existen numerosas causas de degradación o inestabilidad peptídica, incluyendo hidrólisis y desnaturalización. La interacción hidrófoba puede provocar la aglomeración de moléculas juntas (es decir, agregación). Los estabilizadores pueden añadirse para reducir o evitar tales problemas.

55 Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y derivados de la misma (véase la patente estadounidense 5.730.969). Pueden añadirse conservantes adecuados tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final. Puede añadirse a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos iónicos y no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-galacturónico, trehalosa, dextranos, almidones de hidroxietilo, y mezclas de los mismos. La adición de sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un péptido. El péptido también puede estabilizarse al ponerlo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido sulfúrico de condroitina, almidón, glucógeno, dextrina y sal de ácido alginico. Otros azúcares que pueden añadirse incluyen monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcar, y mezclas de los mismos (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un péptido, y son miscibles en agua o solubles en agua. Polioles adecuados pueden ser alcoholes polihidroxilados, monosacáridos y disacáridos que incluyen manitol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, vinilpirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa, y polímeros de los mismos. Diversos excipientes también pueden estabilizar péptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metal, polivinilpirrolidona, 65 gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

En lo siguiente, la invención se describe en más detalle con referencia a secuencias de aminoácidos, secuencias de ácido nucleico y ejemplos. Sin embargo, los detalles de los ejemplos no pretenden limitar la invención.

Ejemplos

5

1) Modelo de cáncer de PD1/PD-L1

Se inyectaron ratones BALB/C por vía subcutánea en el flanco derecho con células tumorales CT26 (2×10^5 /ratón). El día 9, cuando los tumores alcanzaron 20-30 mm², se trataron los ratones con 250 µg/ratón de anti-PD1 (BIOXCELL, clon RPM1-14, n.º BE0146) solo o control de isotipo (IgG2a de rata; BIOXCELL, clon 2A3, n.º BE0089). Se inyectó anti-PD1 (α-PD1) o control de isotipo (2A3) en el día 9, 12 y 15. Desde el día 13 hasta el día 37, se trataron los ratones dos veces por semana con 2 µg de RLI CHO (1004-14p) o PBS en grupos de control. Se midieron los tumores tres veces por semana con un compás calibrador y se calculó el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron.

10

El protocolo se presenta en la figura 1. Los ratones que portan tumor CT26 recibieron tres 3 dosis (250 µg/dosis) de anti-PD1 o control de isotipo desde el día 9 hasta el día 15. Se inyectó tratamiento con RLI (2 µg/dosis) desde el día 13 hasta el día 37 dos veces por semana.

20

El modelo de tumor CT26 expresó PD-L1 (ligando para PD1; (DURAISWAMY *et al.*, Cancer Res., 5 de junio de 2013) y se infiltra mediante células T que expresan altamente el receptor de PD1. La figura 2 muestra la elevada frecuencia de células T CD8+ que infiltran tumor que coexpresan PD-1 y Tim-3 en el modelo CT26. Se tiñeron el bazo y el tumor disociados de ratón que porta tumor CT26 y se analizaron mediante citometría de flujo. La coexpresión de Tim-3 y PD-1 en células T CD3+ CD8+ se muestra en el bazo (panel izquierdo) y en el tumor (panel derecho).

25

La figura 3 muestra la evolución del tamaño del tumor en ratones que portan tumor CT26 tratados con anti-PD1 (αPD1) o control (2A3), RLI o control (PBS) o combinando ambos tratamientos (αPD1 + RLI) según el protocolo descrito previamente. (A) Crecimiento del tumor en cada grupo (n=5 ratones/grupo) (B) Como en A., pero a partir de un segundo experimento. C. Porcentaje de ratones con remisión del tumor completa en cada grupo. (D-G). Crecimiento del tumor en cada ratón (agrupados del experimento 1 y 2, n=10) para el grupo de control tratado (D); para el grupo independiente tratado con RLI (E); para el grupo independiente tratado con αPD1 (F) y para el grupo tratado con αPD1 + RLI (G). Se determinaron pruebas estadísticas usando ANOVA de 2 factores. * p<0,05; *** p<0,001.

30

La figura 4 muestra que el tratamiento de combinación anti-PD1/RLI aumenta la supervivencia global en ratones. A. Supervivencia global en cada grupo tratado (n=10 por grupo).

40

Por tanto, los resultados muestran que el tratamiento de combinación anti-PD1+RLI potencia el efecto antitumoral en comparación con grupos independientes. En particular, el tratamiento con RLI/αPD1 aumenta el número de ratones con remisión del tumor completa y la supervivencia global (figura 3C y 4). De manera sorprendente, ningún ratón libre de tumor tratado con una combinación de RLI y anti-PD1 que volvió a exponerse el día 145 después de la remisión total con tumores CT26 mostró ningún crecimiento del tumor, lo que sugiere la persistencia de una inmunidad antitumoral protectora (datos no mostrados). Estos resultados se confirmaron en otra serie de experimentos que establecen que i) por sí solo, RLI no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento del tumor cuando el tratamiento empezó a partir del D10 después de la inoculación del tumor, ii) en ese momento, anti-PD1 potenció la supervivencia pero apenas indujo remisión completa (5,9%). La combinación de anti-PD1 y RLI aumentó la supervivencia y las remisiones completas (30,4%), que eran remisiones duraderas. Esta combinación indujo una respuesta inmunitaria de memoria antitumoral eficaz puesto que los ratones todavía estaban libres de tumor 145 días después de la remisión total y la reexposición de ratones curados nunca mostró recuperación tumoral (datos no mostrados).

45

50

Se inyectaron ratones BALB/C por vía subcutánea en el flanco derecho con células tumorales CT26 (2×10^5 /ratón). Los ratones recibieron i.p. dosis bajas de anti-PD1 (clon mBAT, 12 µg/ratón) o control, 2 µg de RLI CHO (1004-15p) o control, o combinación de ambos tratamientos el día 10. Una semana más tarde (día 17), los ratones reciben una segunda inyección de anti-PD1, RLI o controles. Se midieron los tumores cada dos días con un compás calibrador y se calculó el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron. El protocolo se presenta en la figura 5.

55

La figura 6 muestra el crecimiento del tumor CT26 en ratones que portan tumor CT26 tratados con dos inyecciones i.p. de anti-PD1 a dosis bajas en combinación con RLI. Se determinaron pruebas estadísticas usando ANOVA de 2 factores. *** p<0,001.

60

Los resultados muestran que una dosis baja de anti-PD1 o RLI solo no puede apoyar la inhibición del crecimiento del tumor subcutáneo primario. Sin embargo, la combinación de anti-PD1 a dosis bajas con RLI permitió la inhibición del

65

crecimiento del tumor. Este experimento confirmó que RLI podía someterse a sinergia con estrategias anti-PD1 para combatir el crecimiento del tumor incluso con una dosis subóptima de tratamiento anti-PD1.

5 Finalmente, parece que esta combinación a dosis bajas da como resultado una notable sinergia que da como resultado una fuerte inhibición del crecimiento del tumor.

2) Melanoma metastásico

10 Se implantan tumores B16F10 mediante inyección de 3×10^4 células B16F10 en el flanco de ratones C57BL/6, i.d. el día 0. Se tratan los ratones i.p. con anti-CTLA-4 (clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o con el Acm anti-PD-1 (clon RPM1-14, n.º BE0146) o con el Acm anti-PD-L1 (clon: 10F.9G2) en combinación o no con RLI CHO (2 µg/ratón) inyectados i.p. desde el día 7 hasta el día 25 dos veces por semana con 2 µg de RLI CHO. La dosificación de anticuerpo anti-CTLA-4 o anti-PD-1 o anti-PD-L1 por inyección es 200 µg el día 3 más 100 µg los días 6 y 9. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo. Se monitorizaron la incidencia y el tamaño del tumor a lo largo del tiempo mediante examen físico.

3) Cáncer de pulmón avanzado

20 La línea de células tumorales TC-1 se derivó de células epiteliales de pulmón primarias de ratones C57BL/6 y es virus del papiloma humano 16 (VPH-16) E6/E7 y c-Ha-Ras cotransformado. Se inyectan s.c. 10^5 células de cáncer de pulmón TC-1 en la dermis superior en la espalda de ratones C57BL/6. El tratamiento se inicia el día 10 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores se vuelven claramente visibles y palpables a un tamaño de $\approx 15-20$ mm². El Acm anti-CTLA-4 (100 µg/ratón, clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o el Acm anti-PD-1 (250 µg/ratón, clon RPM1-14, n.º BE0146) o el Acm anti-PD-L1 (100 µg/ratón, clon: 10F.9G2) se proporciona en tres puntos de tiempo únicos (día 10, 14, 17) y RLI (2 µg/ratón) se proporciona el día 10, 13 y 18. Se compara el tratamiento con agentes individuales frente a combinaciones de doblete de cada anticuerpo con RLI, usando el crecimiento del tumor medido dos veces por semana como criterio de valoración. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo.

30 4) Cáncer de vejiga avanzado

La línea de células tumorales MB49 se origina a partir de un tumor inducido por carcinógenos de origen epitelial de vejiga de ratones macho C57BL/6. Se inyectan s.c. 10^6 células de cáncer de vejiga MB49 en la dermis superior en la espalda de ratones C57BL/6. El tratamiento se inicia el día 6 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores se vuelven claramente visibles y palpables a un tamaño de ≈ 15 mm². El Acm anti-CTLA-4 (100 µg/ratón, clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o el Acm anti-PD-1 (100 µg/ratón, clon RPM1-14, n.º BE0146) o el Acm anti-PD-L1 (100 µg/ratón, clon: 10F.9G2) se proporciona en cuatro puntos de tiempo únicos (día 6, 9, 12) y RLI (2 µg/ratón) se proporciona el día 7, 8, 10, 11, 13, 14, y 16, 17. Se compara el tratamiento con agentes individuales frente a combinaciones de doblete de cada anticuerpo con RLI. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo. Se midieron los tumores tres veces por semana con un compás calibrador y se calculó el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron.

45 5) Cáncer de mama

Se inoculan ratones BALB/c con 5×10^4 células de cáncer de mama 4T1 en la glándula mamaria el día 0. El tratamiento se inicia el día 10 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores se vuelven claramente visibles y palpables a un tamaño de $\approx 15-20$ mm². El Acm anti-CTLA-4 (100 µg/ratón, clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o el Acm anti-PD-1 (250 µg/ratón, clon RPM1-14, n.º BE0146) o el Acm anti-PD-L1 (200 µg/ratón, clon: 10F.9G2) se proporciona en cuatro puntos de tiempo únicos (día 10, 13, 16) y RLI (2 µg/ratón) se proporciona el día 10, 11, 13, 14, 16, 17, y 19, 20. Se compara el tratamiento con agentes individuales frente a combinaciones de doblete de cada anticuerpo con RLI. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo. Se miden los tumores tres veces por semana con un compás calibrador y se calcula el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrifican los ratones el día 27. Se cuentan los nódulos metastásicos de pulmón bajo un microscopio binocular.

55 6) Cáncer de ovario

60 Se desarrolló previamente la línea de células de carcinoma de ovario ID8-VEGF a partir de una línea de células de adenocarcinoma seroso papilar epitelial de ovario de ratón. Los ratones C57BL/6 se implantan por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^6 células tumorales ID8. El tratamiento se inicia el día 10 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores se vuelven claramente visibles y palpables a un tamaño de $\approx 15-20$ mm². El Acm anti-CTLA-4 (100 µg/ratón, clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o el Acm anti-PD-1 (250 µg/ratón, clon RPM1-14, n.º BE0146) o el Acm anti-PD-L1 (200 µg/ratón, clon: 10F.9G2) se proporciona en cuatro puntos de tiempo únicos (día 10, 13, 16) y RLI (2 µg/ratón) se proporciona el día 10, 11, 13, 14, 16, 17, y 19, 20. Se compara el

tratamiento con agentes individuales frente a combinaciones de doblete de cada anticuerpo con RLI, usando crecimiento del tumor medido dos veces por semana como criterio de valoración. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo. Se miden los tumores tres veces por semana con un compás calibrador y se calcula el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrifican los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceran.

7) Cáncer de próstata: RM-1

Se inoculan s.c. ratones hembra C57BL/6 con 2×10^5 células de cáncer de próstata murino RM-1. El tratamiento se inicia el día 3 después de la inoculación del tumor que corresponde a cuando los tumores se vuelven claramente visibles y palpables a un tamaño de $\approx 15-20$ mm². El Acm anti-CTLA-4 (100 µg/ratón, clon: UC10-4F10-11 100 o clon: 9D9) o el Acm anti-PD-1 (250 µg/ratón, clon RPM1-14, n.º BE0146) o el Acm anti-PD-L1 (200 µg/ratón, clon: 10F.9G2) se proporciona en tres puntos de tiempo únicos (día 3, 6, 9), y RLI (2 µg/ratón) se proporciona el día 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 y 18, 19. Se compara el tratamiento con agentes individuales frente a combinaciones de doblete de cada anticuerpo con RLI, usando crecimiento del tumor medido dos veces por semana como criterio de valoración. Los grupos de control recibieron una dosis correspondiente de isotipo de anticuerpo. Se miden los tumores tres veces por semana con un compás calibrador y se calcula el área del tumor de la siguiente manera: longitud x ancho. Se sacrificaron los ratones cuando el tamaño del tumor alcanzó 300 mm² o se ulceraron.

20 **Lista de secuencias**

<110> IGR

CYTUNE

BECHARD, David

25 DESBOIS, Mélanie

CHAPUT, Nathalie

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA COMBINADA

30 <130> CYT-B-0007-PCT1

<150> Documento EP 13003964.7

<151> 08-08-2013

35 <160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 114

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

45 <223> secuencia consenso de interleucina 15 de mamífero

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

50 <223> X= N, S, T o I

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

55 <223> X= V, H, I, Q o E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

60 <223> X= N, Y, F o D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

65 <223> X= I o R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X= S, N, L, Y, K o R
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> X= K, E, R o Q
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> X= K, T o R
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> X= E, D o Q
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> X= D, H, S o N
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> X= I o T
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> X=Q, R o K
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X= S o F
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> X= M, I o L
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> X= I, V o M
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> X=A o T
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X=E o D
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> X= D o G
 65
 <220>

- <221> MISC_FEATURE
- <222> (31)..(31)
- <223> X= V, F, A o I

- 5 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (34)..(34)
- <223> X= S, N o R

- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (37)..(37)
- <223> X= V o I

- 15 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (39)..(39)
- <223> X= A o T

- 20 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (41)..(41)
- <223> X= K, Q o N

- 25 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (48)..(48)
- <223> X= Q, G, R, H o E

- 30 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (51)..(51)
- <223> X= S o L

- 35 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (52)..(52)
- <223> X= L, Q o H

- 40 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (54)..(54)
- <223> X= S, F o Y

- 45 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (55)..(55)
- <223> X= G, K, S, N o R

- 50 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (56)..(56)
- <223> X= D, H, S o N

- 55 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (57)..(57)
- <223> X= A, H, M, E, G, S o T

- 60 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (58)..(58)
- <223> X= S, V, P, T, N o D

- 65 <220>
- <221> MISC_FEATURE

- <222> (59)..(59)
<223> X= I o L

- <220>
5 <221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> X= H, S, K, N, Y o E

- <220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> X= D o E

- <220>
15 <221> MISC_FEATURE
<222> (62)..(62)
<223> X= T, I o A

- <220>
20 <221> MISC_FEATURE
<222> (63)..(63)
<223> X= V o I

- <220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (64)..(64)
<223> X= E, T, Q, R o K

- <220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(66)
<223> X= L o V

- <220>
35 <221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> X= I, T o L

- <220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(68)
<223> X=I, M, F, Y o L

- <220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> X= N, T, R, D o S

- <220>
50 <221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(73)
<223> X= S, N, R, T o I

- <220>
55 <221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> X= S o N

- <220>
60 <221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> X= S o A

- <220>
65 <221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)

<223> X= N, I o K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (78)..(78)
 <223> X= G, E o K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (79)..(79)
 <223> X= N, Y, D o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (80)..(80)
 <223> X= V, K o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (81)..(81)
 <223> X= T, A o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (83)..(83)
 <223> X= S, L o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (87)..(87)
 <223> X= E o V
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (93)..(93)
 <223> X= E o K
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (94)..(94)
 <223> X= K o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (95)..(95)
 <223> x= N, T o S
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (96)..(96)
 <223> X= I o F
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (97)..(97)
 <223> X= K, N, A, o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (101)..(101)
 <223> X= Q, K o E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (104)..(104)
 <223> X= V, I o K

ES 2 760 249 T3

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
5 <223> X= H o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
10 <223> X= N o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (113)..(113)
15 <223> X= = T, S, P, L o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(114)
20 <223> X= = S o P

<400> 1

Xaa Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa His Xaa Asp Xaa Thr Leu Tyr Thr Xaa Ser Xaa Xaa His
25

20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Xaa Thr Xaa Met Xaa Cys Phe Leu Leu Glu Leu Xaa
35 40 45

Val Ile Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Asn Xaa Xaa Xaa Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Glu Xaa Gly Cys Lys Xaa Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Glu Phe Leu Xaa Ser Phe Xaa Xaa Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa
100 105 110

Xaa Xaa

<210> 2
30 <211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> secuencia consenso de interleucina 15 de primate

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
40 <223> X = N o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)

```

<223> X = N o D
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (10)..(10)
 <223> X = K o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (11)..(11)
 <223> X = K o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (13)..(13)
 <223> X = E o Q
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (16)..(16)
 <223> X = I o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (19)..(19)
 <223> X = M o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (30)..(30)
 <223> X = D o G
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (31)..(31)
 <223> X = V o I
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (34)..(34)
 <223> X = S o R
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (52)..(52)
 <223> X = L o H
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (55)..(55)
 <223> X = G o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (56)..(56)
 <223> X = D o N
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (57)..(57)
 <223> X = A o T
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (58)..(58)
 <223> X = S, N o D

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (60)..(60)
 <223> X = H o N

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (63)..(63)
 <223> X = V o I

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (67)..(67)
 <223> X = I o L

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> X = N o R

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X = S o I

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> X = S o A

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> X = N o T

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (80)..(80)
 <223> X = V o I

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> X = E o K

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (112)..(112)
 <223> X = N o Y

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> X = T o A

<400> 2

ES 2 760 249 T3

Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Ser Xaa His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Xaa Xaa His
20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Asp Thr Xaa Glu
50 55 60

Asn Leu Xaa Ile Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Ser Xaa Asn Gly Xaa Xaa
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa
100 105 110

Xaa Ser

<210> 3

<211> 114

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (93)..(93)

<223> X= E o K

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

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

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

15

<210> 4

<211> 61

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> secuencia consenso de dominio sushi de mamífero

- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X= P o A

- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X= M o V

- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X= V o I

- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> X= W, R o Q

- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> X= S o N

- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> X= L o V

- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> X= Y, H o N

- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> X= I o V

- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (39)..(39)
<223> X= S o T

- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> X=T o I

- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X=T o I

- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X= L o I

- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE

ES 2 760 249 T3

<222> (48)..(48)
 <223> X= A o N

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> X= V o A

<220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= H o Y

<400> 4
 15
 Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30
 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn Lys Xaa
 35 40 45
 Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

<210> 5
 20 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> secuencia consenso de dominio sushi de mamífero agrandada

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 30 <223> X= T, V o I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 35 <223> X= P o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 40 <223> X= M o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 45 <223> X= V o I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 50 <223> X= W, R o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 55 <223> X= S o N

ES 2 760 249 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> X=L o V
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X=Y, H o N
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X= S o T
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X= T o I
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X= L o I
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X= A o N
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H o Y
 45
 <400> 5

 Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

 Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

 Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 50 <210> 6
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>

ES 2 760 249 T3

<223> secuencia consenso de dominio sushi de primate

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (3)..(3)
 <223> X= P o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (5)..(5)
 <223> X= M o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (13)..(13)
 <223> X= W, R o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (20)..(20)
 <223> X= Y o H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (26)..(26)
 <223> X= I o V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (51)..(51)
 <223> X= V o A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A

<400> 6

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser
 1 5 10 15

Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys
 20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
 35 40 45

40 Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

<210> 7
 <211> 63
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia consenso de dominio sushi de primate agrandada

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X= V o I

55 <220>

ES 2 760 249 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X= P o A

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X= M o V

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X= W, R o Q

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X= Y o H

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H o Y

35 <400> 7

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

40 <210> 8
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 8

ES 2 760 249 T3

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
1 5 15

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
35 40 45

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
50 55 60

<210> 9

<211> 64

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

10 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

15 <210> 10

<211> 77

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia consenso de dominios sushi de mamífero

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (1)..(1)

<223> X= T, V o I

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (5)..(5)

<223> X= P o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (7)..(7)

<223> X= M o V

<220>

<221> MISC_FEATURE

40 <222> (9)..(9)

<223> X= V o I

<220>

<221> MISC_FEATURE

45 <222> (15)..(15)

<223> X= W, R o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> X= S o N
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> X= L o V
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X= Y, H o N
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> X= S o T
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> X= T o I
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> X= L o I
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (50)..(50)
 <223> X= A o N
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H o Y
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H o Y
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X=A, S o L
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (70)..(70)
 <223> X= V, A, S o T
 65
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (71)..(71)
 <223> X= H o R

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> X= Q o H

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> X= R, S o K

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> X= A, V o P

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> X= P o S

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 <223> X= P o T

30 <400> 10

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val
 1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn
 35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa
 65 70 75

35 <210> 11
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia consenso de dominios sushi de primate

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 45 <223> X= V o I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 50 <223> X= P o A

<220>

ES 2 760 249 T3

<221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X= M o V
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> X= W, R o Q
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> X= Y o H
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> X= I o V
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> X= V o A
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> X= H o Y
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> X= A, S o L
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (70)..(70)
 <223> X= V, A o T
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (71)..(71)
 <223> X= H o R
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> X= A o V
 50 <400> 11
 xaa Thr Cys Pro xaa Pro xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile xaa Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu xaa Ser Arg Glu Arg Tyr xaa Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn xaa Ala xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro xaa Leu xaa xaa Gln Arg Pro xaa Pro Pro
 65 70 75

ES 2 760 249 T3

<210> 12
 <211> 77
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 12
 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 10 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro
 65 70 75
 15 <210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> ligador peptídico

 <400> 13
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Gln
 20
 25 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> ligador peptídico

 <400> 14
 35 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly ser Gly Gly
 20
 40 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ligador peptídico
 45 <400> 15

ES 2 760 249 T3

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

Gly Gly Ser Leu Gln
20

5 <210> 16
<211> 211
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> RLI2

<400> 16

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95

Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
100 105 110

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
195 200 205

Asn Thr Ser
210

15 <210> 17
<211> 211
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 760 249 T3

<220>

<223> RLI1

5 <400> 17

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60

Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu
 85 90 95

Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 100 105 110

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 115 120 125

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 130 135 140

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205

Asn Thr Ser
 210

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica combinada que comprende:

5 a) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana, un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo; y

10 b) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo,

15 en la que dicho anticuerpo es un antagonista de PD-1/PD-L1/PD-L2,

20 en la que dicho anticuerpo antagoniza o bien mediante la unión del receptor PD-1 o bien mediante la unión del ligando PD-L1 o PD-L2;

25 en la que dicho conjugado y el anticuerpo o fragmento del mismo no están ligados.

2. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende

25 (A) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana, un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo,

30 en la que el uso comprende la administración simultánea, por separado o secuencial de (a) dicha composición farmacéutica y (b) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo, o

35 (B) un anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T, o un fragmento del mismo que puede reaccionar con el mismo antígeno que su homólogo de anticuerpo, un polinucleótido que codifica para el mismo, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo,

40 en la que el uso comprende la administración simultánea, por separado o secuencial de (a) dicha composición farmacéutica y (b) un conjugado que comprende (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de interleucina 15 o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de IL-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, y (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio sushi de IL-15R α o derivados de la misma que tienen al menos el 10% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana a IL-15 humana, un polinucleótido que codifica para la misma, o un vector que comprende un polinucleótido de este tipo, y

45 en la que dicho anticuerpo es un antagonista de PD-1/PD-L1/PD-L2,

50 en la que dicho anticuerpo antagoniza o bien mediante la unión del receptor PD-1 o bien mediante la unión del ligando PD-L1 o PD-L2.

55 3. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2 o composición farmacéutica combinada según la reivindicación 1, adaptada para administración simultánea, por separado o secuencial para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

60 4. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que:

a) el conjugado se administra mediante inyección a una dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos, preferiblemente a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos y lo más preferiblemente a una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o menos; y

65 b) el anticuerpo que antagoniza una ruta inmunitaria implicada en la inhibición de la activación de células T,

o un fragmento del mismo se administra mediante inyección a una dosis de 500 µg/kg o menos, preferiblemente a una dosis de 100 µg/kg o menos y lo más preferiblemente a una dosis de 50 µg/kg o menos.

- 5 5. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho anticuerpo es un antagonista de PD-1/PD-L1.
- 10 6. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho derivado de interleucina 15 tiene al menos el 25% de la actividad de interleucina-15 humana sobre la inducción de proliferación de la línea celular kit225, más preferiblemente al menos el 50%, o
- 15 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92,5% con una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, preferiblemente de al menos el 96%, y más preferiblemente de al menos el 98,5% o de al menos el 99%.
- 20 7. Composición farmacéutica o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho derivado del dominio sushi de IL-15R α tiene al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50% de la actividad de unión del dominio sushi de IL-15R α humana, o
- 25 tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 92% con una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, preferiblemente de al menos el 96%, y más preferiblemente de al menos el 98%.
- 30 8. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho anticuerpo se selecciona de entre antagonistas de PD-1/PD-L1 y PD-1/PD-L2, preferiblemente nivolumab, Merck 3745, CT-01 1, lambrolizumab, AMP514, MDX-1 105 o YW243.55.S70.
- 35 9. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que los polipéptidos (i) y (ii) del conjugado se ligan de manera covalente en una proteína de fusión.
- 40 10. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha interleucina 15 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 45 11. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el dominio sushi de IL-15R α tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.
12. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de cáncer o composición farmacéutica combinada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el conjugado tiene la secuencia SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

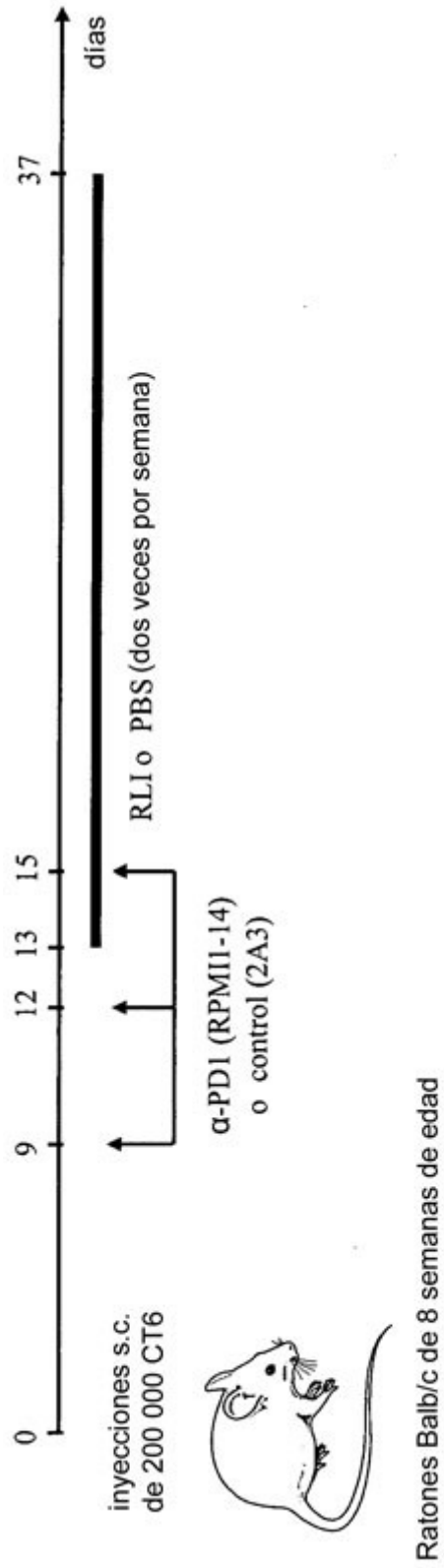


Figura 1

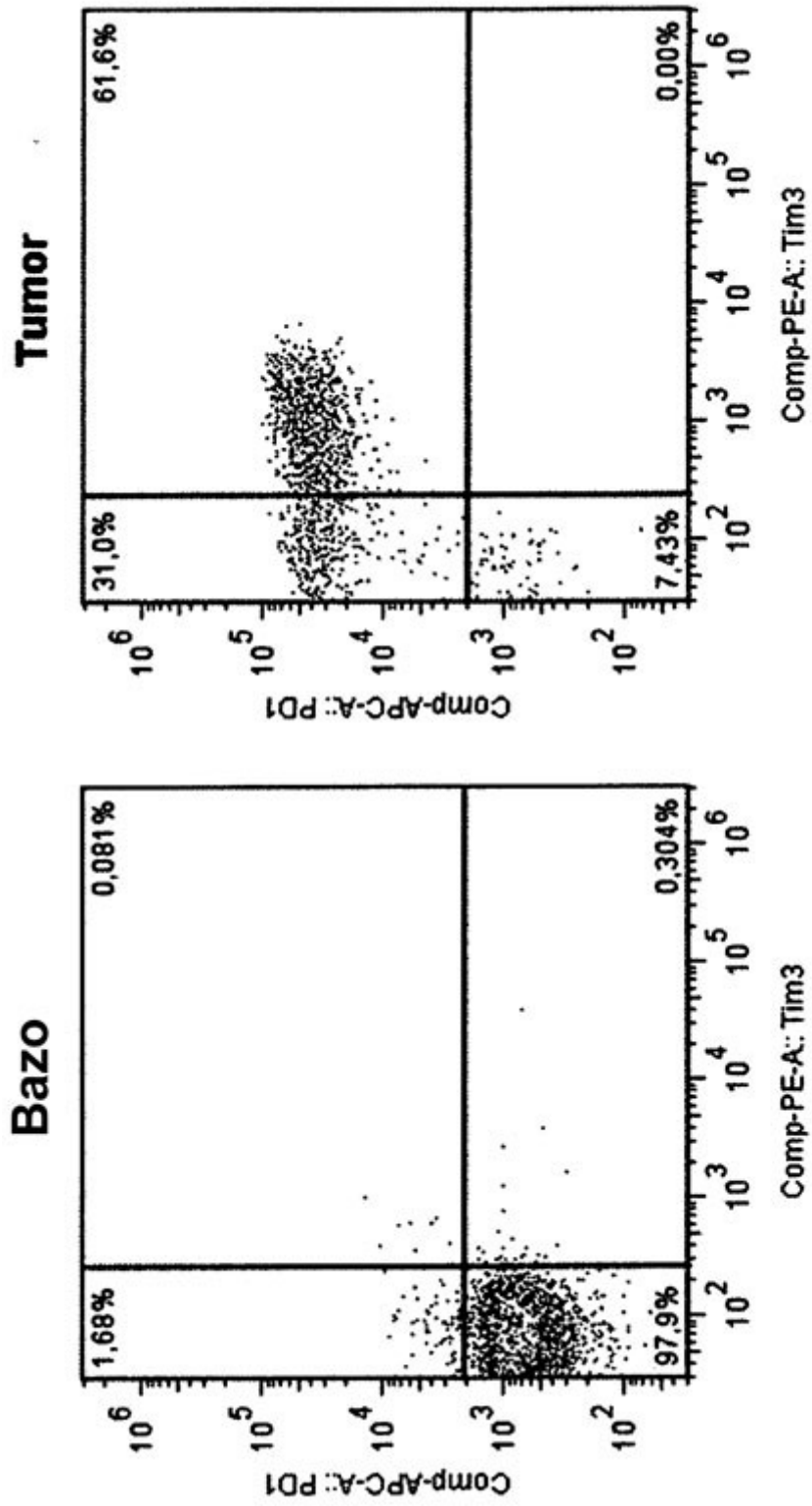


Figura 2

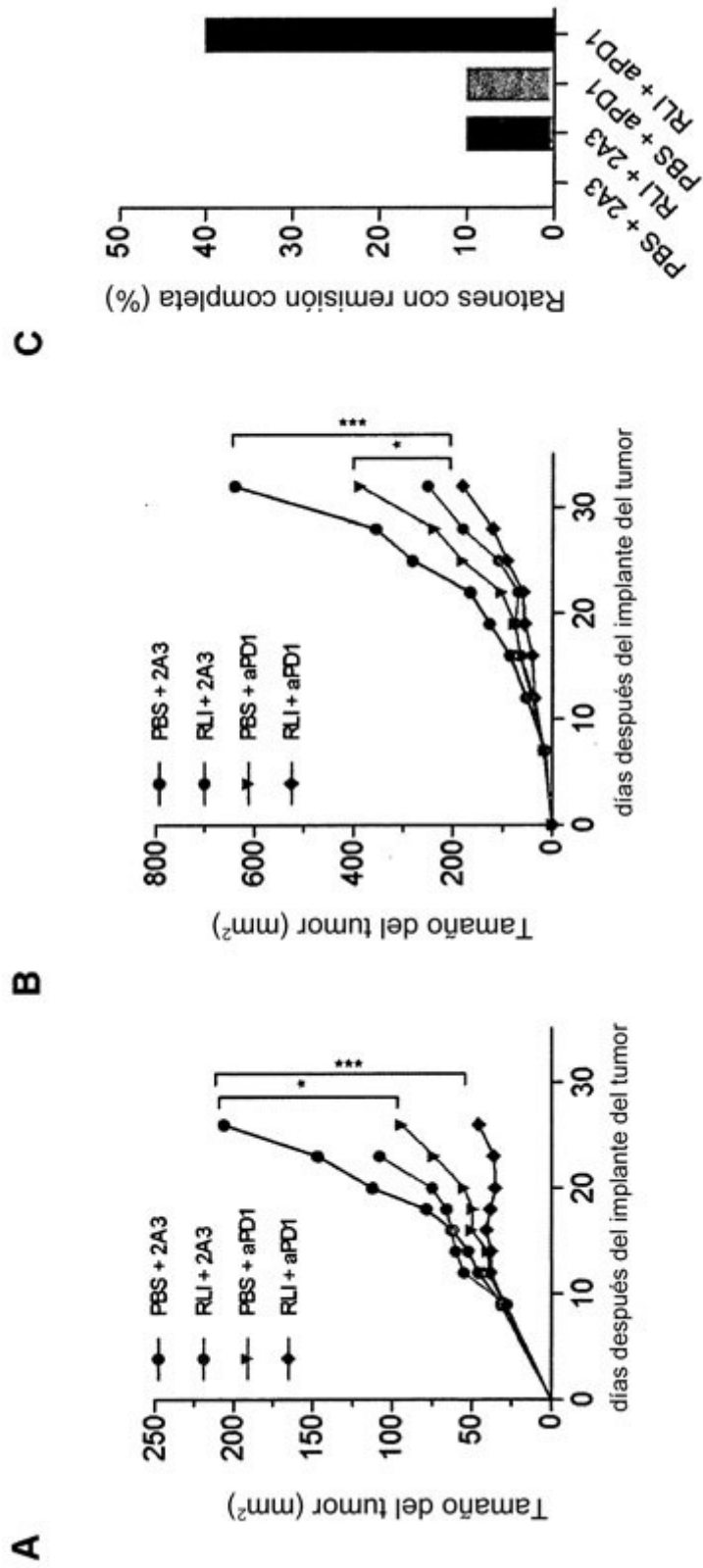
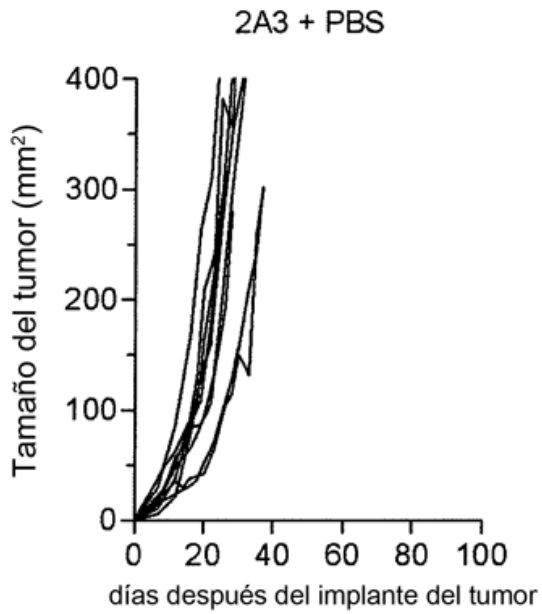
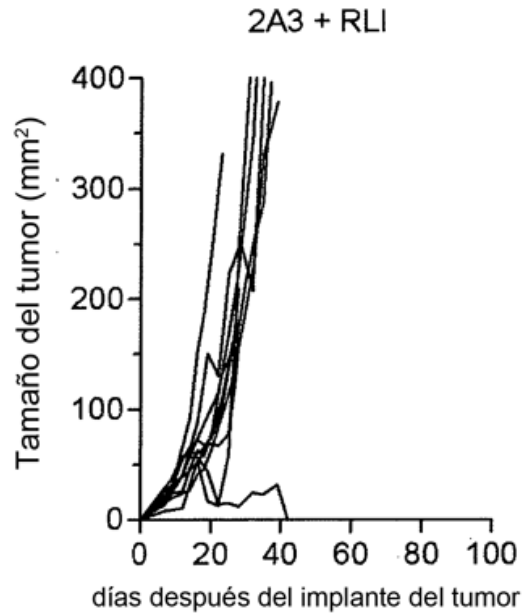


Figura 3

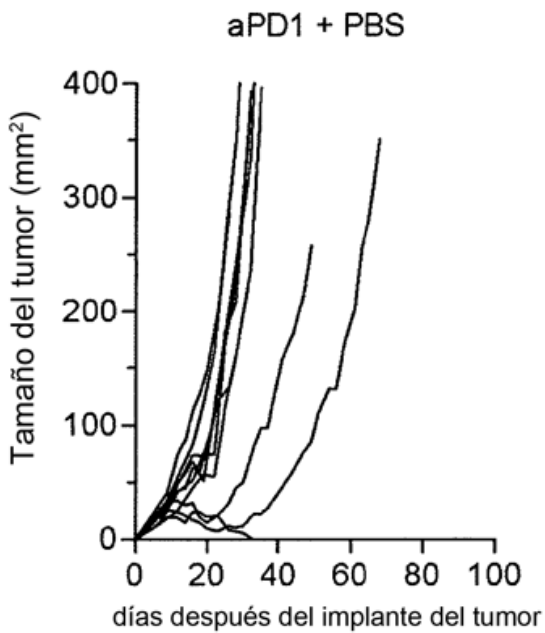
D



E



F



G

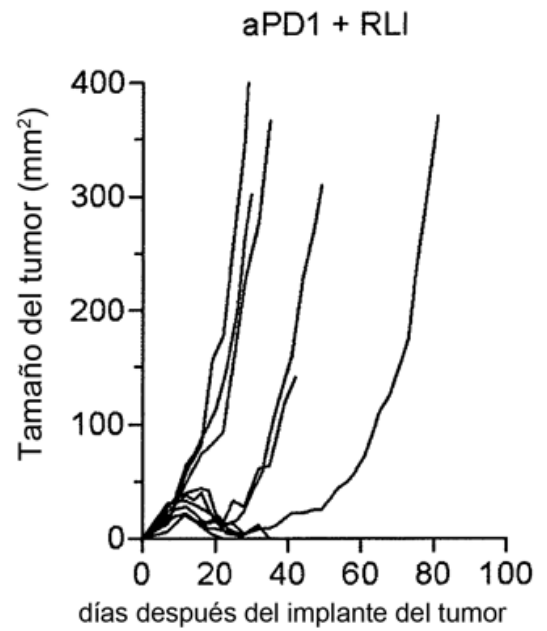


Figura 3 (fin)

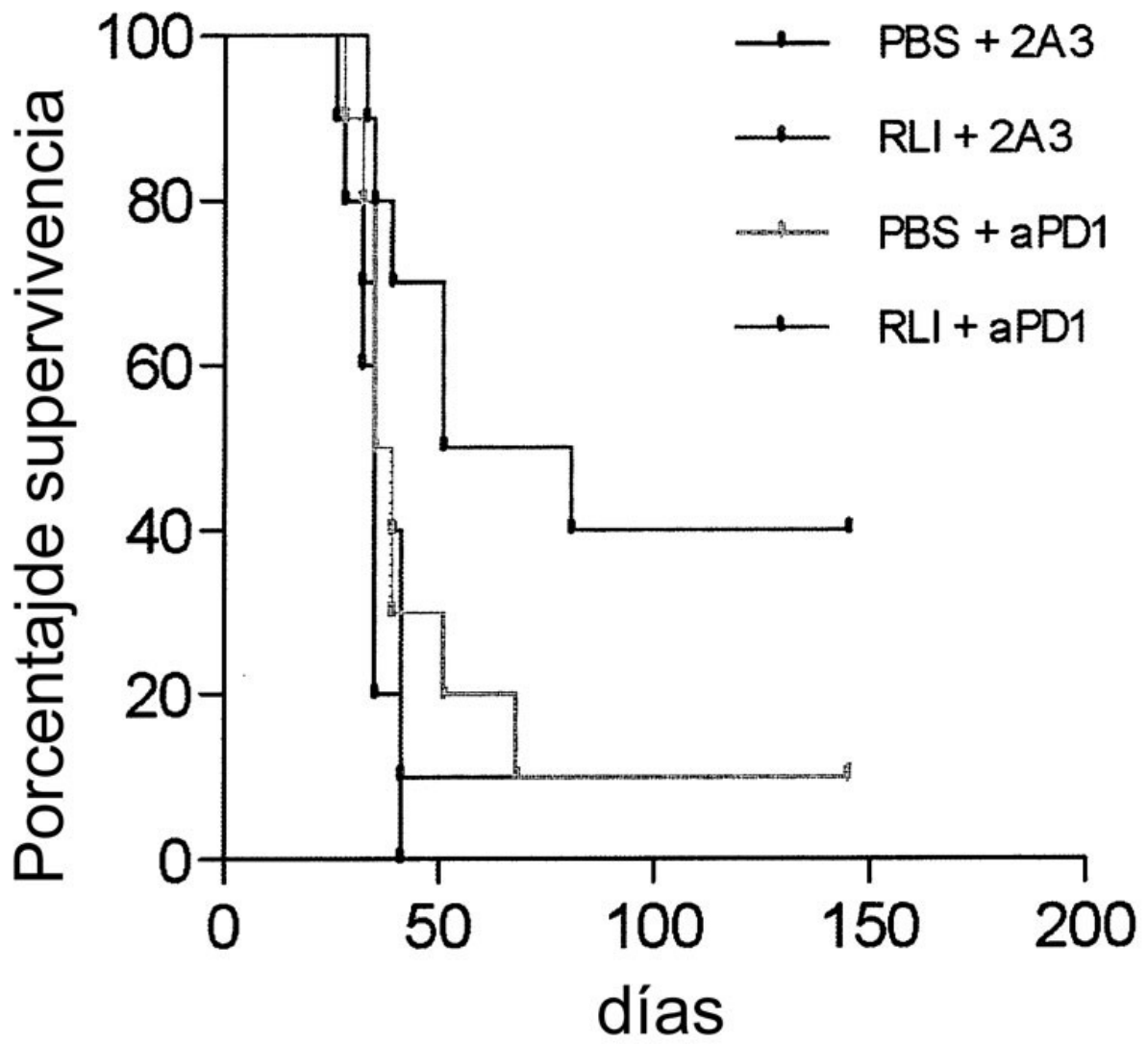


Figura 4

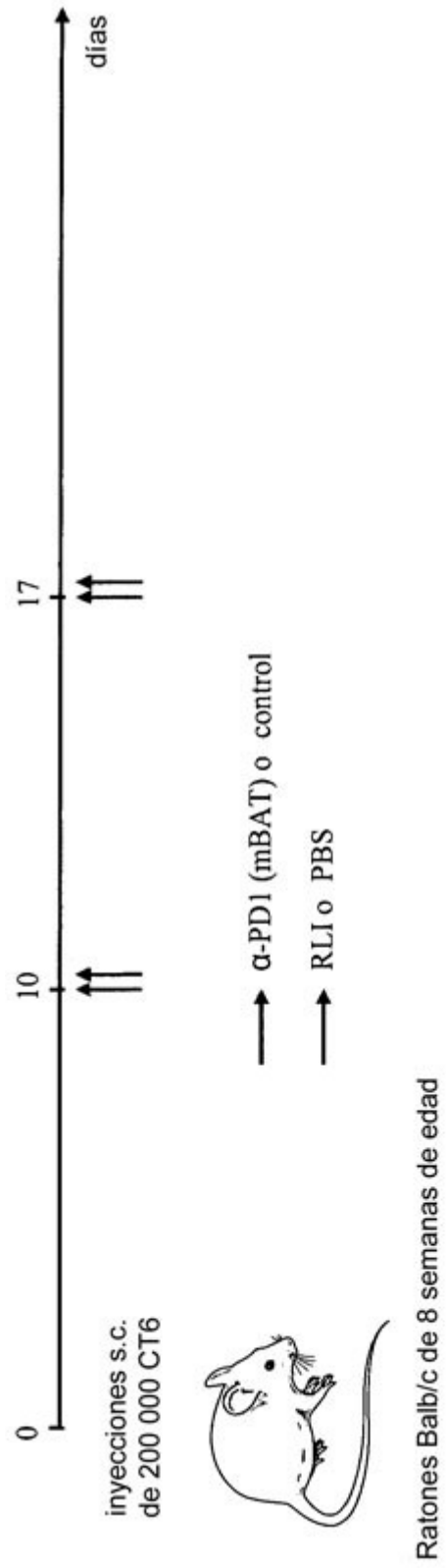


Figura 5

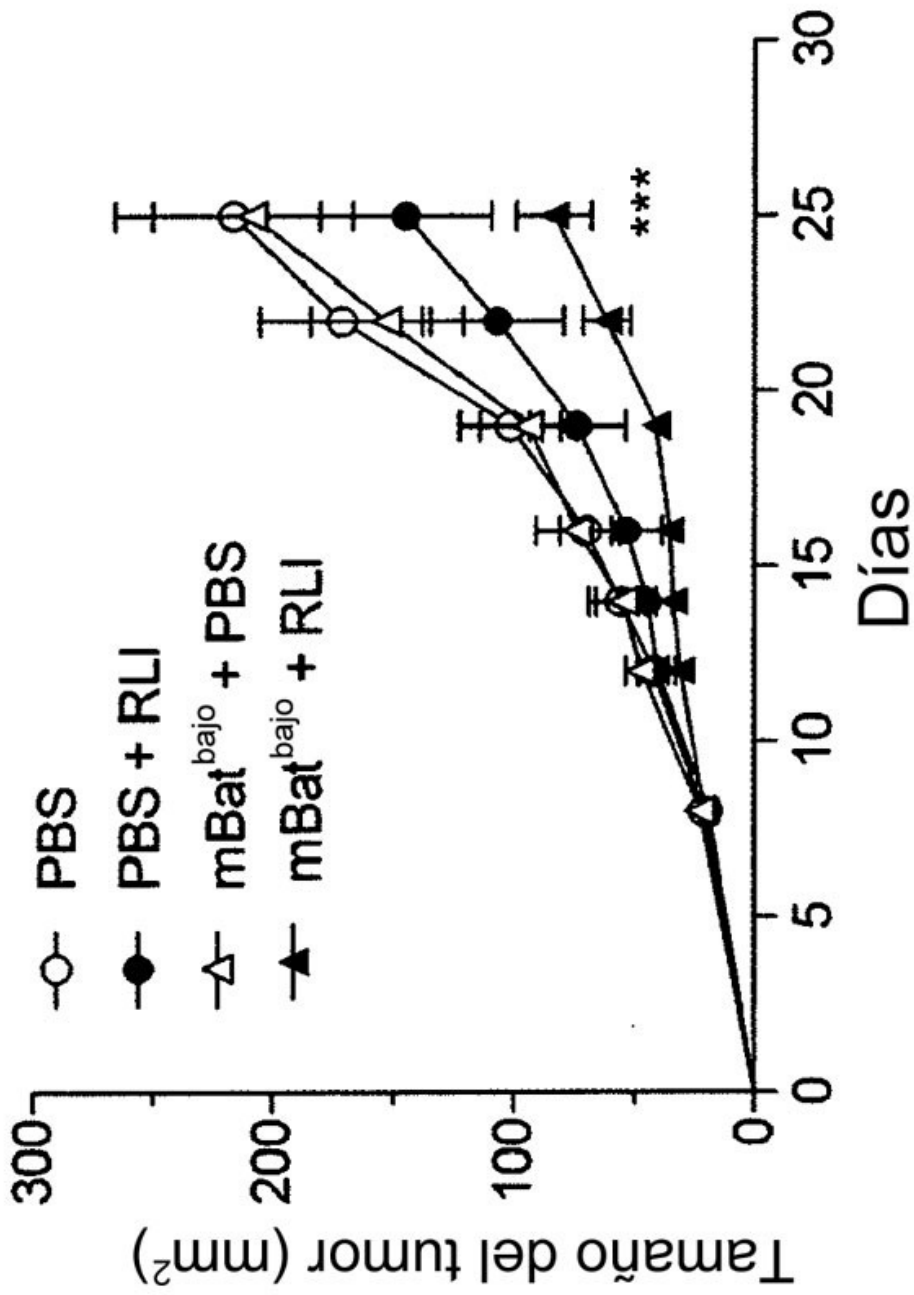


Figura 6