

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 598**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)

**C12N 15/24** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2016 PCT/EP2016/054729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16142314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2016 E 16708154 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3265478**

54 Título: **Proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión y un polipéptido de interleucina-15 que tiene una afinidad reducida por IL15RA, y usos terapéuticos de las mismas**

30 Prioridad:

**06.03.2015 EP 15157911**

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

**29.05.2020**

73 Titular/es:

**DKFZ DEUTSCHES  
KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (50.0%)  
Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer  
Feld 280  
69120 Heidelberg , DE y  
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUNDRAM, JUNG;  
SALIH, HELMUT;  
LINDNER, CORNELIA y  
LOCHMANN, BERIT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 763 598 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión y un polipéptido de interleucina-15 que tiene una afinidad reducida por IL15RA, y usos terapéuticos de las mismas

5

**Antecedentes**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión y un polipéptido IL-15 que tiene una afinidad reducida por IL15R $\alpha$ , así como a sus usos, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión y a un método de producción de dichas proteínas de fusión.

10

**Campo de la invención**

Los anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados de segunda generación, tales como Rituxan y Herceptin, han mejorado considerablemente el tratamiento de los pacientes con linfomas malignos y carcinomas mamarios positivos en Her2, respectivamente. En general, sin embargo, la actividad terapéutica de los anticuerpos de segunda generación es limitada y sigue existiendo la necesidad médica urgente de desarrollar reactivos a base de anticuerpos optimizados (véase, por ejemplo, Beck A., Wurch T., Bailly C., Corvaia N. "Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies". *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345-352).

15

20

La capacidad de reclutar células efectoras inmunitarias positivas en el receptor Fc (FcR), tales como linfocitos NK, se considera crucial para la actividad terapéutica de la mayoría de los anticuerpos. De este modo, muchas de las estrategias usadas para la optimización de anticuerpos se centran en la mejora de la parte Fc, produciendo una mayor actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC). En principio, esto se puede realizar mediante el diseño por ingeniería genética del patrón de glicosilación y/o la secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la parte Fc de la IgG1 que está contenida en la mayoría de los anticuerpos antitumorales en el uso clínico actual. (Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., *et al.* (2003) "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex- type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity". *J Biol Chem.* 278:3466-3473; Lazar G. A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng J. S., Hyun L., Chan C., Chung H. S., Eivazi A., Yoder S. C., Vielmetter J., Carmichael D. F., Hayes R. J., Dahiyat B. I., (2006) "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 103:4005-4010.

25

30

Ambas estrategias se usaron en la industria farmacéutica para el desarrollo de anticuerpos de tercera generación optimizados para Fc (Oflazoglu E., Audoly L. P. (2010) "Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology". *MAbs* 2:14-19); Roche (Basilea, Suiza) en cooperación con Glycart (Schlieren, Suiza) ha desarrollado un anticuerpo CD20 de glicosilación diseñada por ingeniería genética GA101 (Obinutuzumab). En un gran ensayo clínico reciente con pacientes que padecen leucemia linfática crónica (CLL), este anticuerpo fue superior al Rituxan (Goede V *et al.* (2014) "Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions". *N Engl J Med* 370:1101-1110).

35

40

Otros dos anticuerpos dirigidos a los antígenos asociados al linfoma CD19 (XmAb5574) y CD30 (XmAb2513), desarrollados por Xencor (Monrovia, CA EE.UU.) portan los intercambios de aminoácidos S239D e I332E (modificación SDIE). Como el GA101, se informó que estos anticuerpos ejercen una ADCC notablemente potenciada (Horton *et al.* (2008) "Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia". *Cancer Res*; 68:8049-8057; Foyil K. V., Bartlett N. L. (2010) "Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma". *Curr Hematol Malign Rep* 5:140-147) y actualmente se evalúan en ensayos clínicos.

45

Está bien establecido que las citocinas IL-2 e IL-15 potencian la actividad citolítica tanto de los linfocitos citolíticos naturales (NK) como de los linfocitos T. Ambas citocinas usan un receptor  $\beta\gamma$  común que se completa con una cadena  $\alpha$  diferente. La expresión diferencial de la cadena  $\alpha$  determina en gran medida la actividad biológica de las citocinas. Ambas son capaces de estimular los linfocitos NK y los linfocitos T. Sin embargo, considerando que la IL-2 estimula los linfocitos T reguladores (T reg), IL-15 parece potenciar la expansión de, por ejemplo, los linfocitos T con memoria CD8+ e inhibe los T reg (Ring *et al.* (2012) "Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15" *Nat Immunol*; 13:1187-1195; Waldmann (2006) "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design" *Nat Rev Immunol*; 6:595-601; Perna *et al.* (2013) "Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma" *Clin Cancer Res*; 19:106-117).

50

55

Hasta el momento, IL-2, el factor de necrosis tumoral (TNF), GM-CSF e IL-15 se han usado para la construcción de inmunocitocinas (Kaspar M., Trachsel E., Neri D. (2007) "The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis". *Cancer Res.* 15:67(10):4940- 8). Estas inmunocitocinas son proteínas de fusión de citocinas con anticuerpos, construidas y destinadas a permitir una actividad citocina enfocada. Sin embargo, tras la aplicación *in vivo*, la proporción de anticuerpo que se une específicamente a un tumor es inferior al 1 %. Además, la actividad de una proteína de fusión convencional no depende de su unión específica. Por consiguiente, los efectos secundarios de dichas proteínas de fusión ejercidos por la unión fuera de la

60

65

diana a las células inmunitarias que expresan los respectivos receptores de citocinas son considerables y limitan las dosis aplicables de forma segura. Véase, por ejemplo, List y Neri (2013) "Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy". *Clin Pharmacol*; 5:29-45, Gillies *et al.* (1992) "Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T cell killing of autologous tumor cells", *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*; 89:1428-1432, Albertini *et al.* (2012) "Phase II trial of hu14.18-11.2 for patients with metastatic melanoma". *Cancer Immunol Immunother*; 61:2261-2271, o Ribas *et al.* (2009) "Phase 1/11 open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma" *J Transl Med*; 7:68.

En principio, el mecanismo de acción particular de IL-15 podría proporcionar una solución a este problema: en contraste con IL-2, IL-15 genera su receptor en *trans*, es decir, la cadena  $\alpha$  del receptor, que se expresa en monocitos, y las células dendríticas estimulan en *trans* el receptor de  $\beta/\gamma$  en los linfocitos NK y T. Teóricamente, esta es una situación óptima para la construcción de una proteína de fusión restringida a la células diana, tal como una inmunocitocina que genera el complejo  $\beta\gamma$  del receptor de IL-15 (IL15R $\beta\gamma$ ) solo después de la unión específica del anticuerpo a una célula diana. Para este fin, sin embargo, se debe evitar la unión de IL-15 a la cadena  $\alpha$  de su receptor.

En principio, esto se puede realizar mediante el acoplamiento a complejos de proteínas de unión o proteínas de fusión de IL-15 e IL15R $\alpha$  recombinante soluble o fragmentos de los mismos (Bessard A *et al.* (2009) "High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer". *Mol Cancer Ther*; 8:2736-2745; Vincent M. *et al.* (2013) "Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency". *Int J Cancer*; 133:757-765; Kermer V *et al.* (2012) "An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site". *Mol Cancer Ther*; 11:1279-1288). De manera sorprendente, sin embargo, las proteínas de fusión o los complejos de IL-15 e IL-15R $\alpha$ Fc son más eficaces que la citocina sola, y se han denominado superagonistas de IL-15. De este modo, no se puede esperar que dichas proteínas ejerzan actividad restringida a la célula diana tras el acoplamiento a una proteína de unión que se dirige a esta célula.

Müller *et al.* (2012) "Targeted cancer immunotherapy", *Oncoimmunology*, 1 (7): 1213-1214 desvelan la inmunoterapia dirigida contra el cáncer mediante la presentación en *trans* de IL-15 mediada por anticuerpos usando una proteína de fusión que comprende (a) un anticuerpo que se une a un antígeno en una célula cancerosa y (b) IL-15.

En línea con este razonamiento, la actividad de los superagonistas de IL-15 no se ve reforzada por la reticulación de Fc (Rubinstein *et al.* "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ ", *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2006; 103:9166-9171). De este modo, es muy poco probable que la actividad de las inmunocitocinas que contienen dichos superagonistas se restrinja a las células diana en el sentido descrito anteriormente.

En resumen, todavía existe la necesidad de proporcionar proteínas de fusión, que puedan actuar de una manera específica de la célula diana y/o no provocar efectos secundarios y/o que se puedan administrar a dosis seguras. Este problema se resuelve mediante las realizaciones reflejadas en las reivindicaciones, descritas en la descripción e ilustradas en los ejemplos y en las figuras de la presente solicitud.

## Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas y las siguientes realizaciones.

Dicho lo anterior, La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

a) una proteína de unión que comprende al menos un sitio de unión, en donde el sitio de unión se une a un antígeno asociado con una célula diana; y

b) un polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, por lo que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de la IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 (número Uniprot: P40933-1) en donde el polipéptido IL-15 se une a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , en donde la proteína de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo divalente, un fragmento de anticuerpo monovalente o una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo.

Además, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de la presente invención para su uso en la activación restringida a la célula diana de células efectoras que expresan IL2/IL-15R $\beta\gamma$ .

Además, la presente invención se refiere a la proteína de fusión de la presente invención para su uso en la destrucción de células diana restringida a la célula diana mediada por células efectoras que expresan IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

La presente invención también se refiere a una proteína de fusión de la presente invención para su uso en la potenciación de la actividad citolítica de los linfocitos NK y los linfocitos T, preferentemente, los linfocitos NK, linfocitos T gamma delta, los linfocitos T NK y los linfocitos T CD8+ en comparación con la actividad citolítica de una proteína

de unión no modificada como la descrita en el presente documento.

Además, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

5 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la presente invención.

10 Además, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención.

Asimismo, la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención.

15 Además, la presente invención se refiere a un método de producción de la proteína de fusión de la presente invención, que comprende usar el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para la expresión de la proteína de fusión en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión.

20 También se desvela en el presente documento dentro del contexto de la invención un kit que comprende la proteína de fusión de la presente invención.

Estos aspectos de la invención se entenderán de manera más completa a la vista de la siguiente descripción, de los dibujos y de los ejemplos no limitantes.

## 25 Breve descripción de los dibujos

**Fig. 1.** Estimulación restringida a la célula diana del receptor IL-15R $\beta\gamma$  por una proteína de fusión ilustrativa de la presente invención. Una proteína de fusión de la presente invención comprende (i) una proteína de unión, que, por ejemplo, puede ser una molécula de anticuerpo dimérica intacta que se dirige a un antígeno diana, por ejemplo, a una célula tumoral (**Fig. 1A**). Dicho antígeno diana puede, por ejemplo, ser CD19 o PSMA. La proteína de fusión de la presente invención comprende además (ii) un polipéptido IL-15 que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 y/o que ya no es capaz de unirse a IL-15R $\alpha$ . Por consiguiente, dicha proteína de fusión de la invención tiene dos especificidades de unión; en concreto, a) un antígeno diana tal como CD19 o PSMA y b) IL-15R $\beta\gamma$ . Sin embargo, también es posible que la proteína de unión de la proteína de la invención sea una proteína biespecífica, por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario biespecífico que tiene un sitio de unión que se une, por ejemplo, a CD19, y un segundo sitio de unión que se une, por ejemplo, a CD3. Dicha proteína de fusión biespecífica puede fusionarse, ya sea en su extremo N o C con un polipéptido IL-15 que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, dando lugar a una molécula con tres sitios de unión.

Volviendo al ejemplo de la proteína de fusión de la invención mostrada en la **Fig. 1A** que contiene como molécula de unión una molécula de anticuerpo con dominios CH2 y CH3 constantes. Dicha proteína de unión puede modificarse además de modo que ejerza una actividad potenciada de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) en comparación con su homóloga no modificada. La **Fig. 1A** muestra un ejemplo de cómo se puede obtener dicha proteína de unión modificada, en concreto, mediante la inclusión de la denominada modificación SDIE del dominio CH2. Se sabe que esta mutación aumenta la actividad ADCC de las moléculas de anticuerpo. Como se ha mencionado anteriormente, además de la parte de proteína de unión, una proteína de fusión de la presente invención comprende un polipéptido IL-15 que tiene una afinidad reducida o cualquier afinidad por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1. Dicho polipéptido IL-15 también se representa esquemáticamente en la **Fig. 1A**. El polipéptido IL-15 se puede unir a la proteína de unión a través de un enlazador (peptídico o no peptídico). Como alternativa, el polipéptido IL-15 también se puede fusionar directamente a la proteína de unión. Además, en una proteína de fusión de la invención al menos una (es decir, uno, dos o más, por ejemplo, incluso tres) polipéptidos IL-15 se fusionan a la proteína de unión. En el ejemplo de la **Fig. 1A**, la proteína de fusión contiene dos polipéptidos IL-15 mutados, cada uno de los cuales está fusionado con el dominio CH3 de la cadena pesada de la molécula de anticuerpo que se usa como proteína de unión.

Una proteína de fusión de la presente invención permite una activación restringida a la célula diana del receptor de IL-15- $\beta\gamma$ . La razón de esto es la forma en que IL-15 ejerce sus funciones. En condiciones fisiológicas, IL-15 se une a dos dianas, que se expresan en diferentes células (presentación en *trans*). En primer lugar, la IL-15 de tipo silvestre se une con alta afinidad al receptor IL15R $\alpha$  que se expresa, por ejemplo, en monocitos y células dendríticas. En segundo lugar, IL15R $\alpha$  presenta luego la IL-15 unida (en *trans*) a las células opuestas que expresan a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ . En condiciones fisiológicas, el receptor  $\beta\gamma$  de IL-2/IL-15 se expresa, por ejemplo, en linfocitos T CD8+ de memoria, linfocitos T gamma delta, linfocitos T NK o linfocitos NK (**Fig. 1B**). Esto significa, en ausencia de células diana, que el receptor  $\beta\gamma$  no puede ser activado por las proteínas de fusión de la invención, ya que no se puede producir la presentación en *trans* por parte de la cadena  $\alpha$  (**Fig. 1C**).

La **Fig. 1B** y la **Fig. 1C** representan a modo de ejemplo el funcionamiento de una proteína de fusión de la presente invención. La proteína de unión se une a una célula diana. Con su parte de polipéptido IL-15, luego, una proteína de fusión de la presente invención es capaz de unirse simultáneamente a las células positivas en receptor  $\beta\gamma$ , tales como los linfocitos T CD8+ o linfocitos NK (véase lo anterior) y activar estas células. Esto imita la presentación de IL-15 a través de IL-15R $\alpha$ . Esto se debe a que la presentación en *trans* de IL-15 al complejo  $\beta\gamma$  de su receptor es realizada por la célula diana en lugar de por una célula que expresa la parte  $\alpha$  del receptor de IL-15. La afinidad endógena por IL-15R $\alpha$  se reduce en las proteínas de fusión de la presente invención. De este modo, si no hay una célula diana presente, la presentación mediada por IL-15R $\alpha$  no se produce y, por consiguiente, las células efectoras positivas en receptor  $\beta\gamma$  no se activan.

**Fig. 2.** Unión a IL-15R $\alpha$  (A) y actividad citolítica de distintas proteínas de fusión (B) que comprenden diferentes polipéptidos IL-15. (A): se incubaron células NALM16 positivas en CD19 con las concentraciones indicadas de distintas proteínas de fusión, teñidas con una proteína de fusión IL-15R- $\alpha$ -Fc marcada con His, recombinante, un anticuerpo anti-His marcado con biotina y, finalmente, un conjugado de estreptavidina PE. Las células se analizaron mediante citometría de flujo.

En particular, la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15wt (wt = tipo silvestre) comprendía el anticuerpo anti-CD19 4G7 con una región constante de IgG1 humana optimizada para Fc (mutación SDIE como se describe en el presente documento) fusionada con IL-15 humana de tipo silvestre (hIL-15), estando hIL-15 directamente unida al dominio CH3 a través de un enlazador de dos aminoácidos, en concreto, un enlazador de glicina-serina (también denominado en el presente documento "enlazador corto"). Esta proteína de fusión sirvió como control. Más proteínas de fusión probadas, denominadas  $\alpha$ CD19-IL15-E46K,  $\alpha$ CD19-IL15-V49D o  $\alpha$ CD19-IL15-I50D, comprendían el anticuerpo 4G7 con una región constante de IgG1 humana optimizada para Fc (SDIE) (mutación SDIE como se describe en el presente documento). El polipéptido IL-15 estaba mutado en las posiciones indicadas. Estas posiciones corresponden a las posiciones indicadas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, como se muestra en la Fig. 5. Estas posiciones de aminoácidos corresponden además a sustituciones de aminoácidos E94K (para E46K), V97D (para V49D) e I98D (para I50D) con respecto a SEQ ID NO: 1 (también descrita en el presente documento con más detalle). En todas estas proteínas de fusión, la hIL-15 está directamente unida al dominio CH3 a través del enlazador de dos aminoácidos de glicina-serina.

Para analizar si los polipéptidos IL-15 que comprenden las diferentes sustituciones de aminoácidos seguían conservando su capacidad de unirse a IL-15R $\alpha$ , se añadió a los cultivos una proteína de fusión IL-15R- $\alpha$ -Fc marcada con His (R&D systems). De este modo, si la parte del polipéptido IL-15 de las proteínas de fusión seguía conservando su capacidad para unirse a IL-15R $\alpha$ , la proteína de fusión IL-15R- $\alpha$ -Fc marcada con His añadida se uniría (a través de la proteína de fusión) a las células NALM 16. De este modo, tras la adición de un anticuerpo anti-His marcado con biotina (Qiagen) y un conjugado de estreptavidina PE (Life technologies) se generará una señal detectable. Esta señal se midió mediante citometría de flujo (intensidad de fluorescencia media; IFM); eje y de la Figura 2A).

La **Fig. 2A** muestra que la IFM detectada para la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-wt (4G7-IL15-wt; wt = tipo silvestre) (control) es una IFM de aproximadamente 300. Dado que IL-15 se une normalmente a ILR-15 $\alpha$ , esta señal proporciona evidencia de una unión de IL-15 a IL-15R $\alpha$ . La proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-V49D (4G7-IL15-V49D) presentó una señal similar en comparación con el control, lo que indica que esta proteína de fusión se une a ILR $\alpha$ , aunque con una afinidad ligeramente inferior. Las proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-E46K (4G7-IL15-E46K) y  $\alpha$ CD19-IL15-I50D (4G7-IL15-I50D) mostraron una señal de IFM de aproximadamente 150, lo que indica que la unión a IL-15R $\alpha$  está fuertemente disminuida (o incluso ausente). La línea discontinua de la Figura 2 A indica la tinción de fondo, es decir, la tinción de células por los anticuerpos de detección marcados (sin proteínas de fusión que contienen IL15). De este modo, los polipéptidos IL-15 que comprenden las sustituciones de aminoácidos E46K e I50D mostraron una disminución muy fuerte/o incluso carecían de unión a ILR-15 $\alpha$  si se usaban dentro de una proteína de fusión que comprendía una proteína de unión (Figura 2A).

En la **Fig. 2B**, se incubaron células NALM16 con las respectivas proteínas de fusión también usadas para los experimentos mostrados en la **Fig. 2A** y las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un voluntario sano. Después de 2 días, se evaluó la proliferación usando un ensayo de absorción de  $^3$ H-timidina. La proliferación en ausencia de proteínas de fusión y PBMC se definió como del 100 % de proliferación, lo que supone un 0 % de inhibición de la proliferación.

Por lo general, dichas células PBMC comprenden linfocitos, monocitos y macrófagos. Algunos de los linfocitos, en particular, los linfocitos NK, expresan los receptores Fc $\gamma$  así como la cadena  $\beta$  y la cadena  $\gamma$  común del receptor IL-2/IL-15 al que se puede unir IL-15 (véase lo anterior). De este modo, tras la unión de la/s proteína/s de fusión a ambos, las células NALM16 a través de la proteína de unión a CD19 (4G7: anticuerpo específico de CD19) y los linfocitos NK a través de IL15, se pueden destruir las células NALM16. La unión de IL-15 a IL-15R $\beta\gamma$  activa los linfocitos NK y potencia la destrucción mediada por los anticuerpos. Con los experimentos representados en la **Fig. 2A**, se analizó la actividad citolítica de las distintas proteínas de fusión.

Como se puede ver en la **Fig. 2B**, ambas proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-wt (4G7-IL15-wt, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) y  $\alpha$ CD19-IL15-E46K (4G7-IL15-E46K, en donde

4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) produjeron una inhibición de aproximadamente el 80-85 %. La proteína  $\alpha$ CD19-IL15-V49D (4G7-IL15-V49D, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) alcanzó un nivel similar, sin embargo, fue menos eficaz a concentraciones más bajas. La proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-I50D (4G7-IL15-I50D, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) y el anticuerpo  $\alpha$ CD19-SDIE (4G7-SDIE) no modificado sin una proteína IL-15 fusionada produjo una inhibición de aproximadamente el 60 % de la proliferación. De este modo, del grupo de proteínas de fusión con una IL-15 mutada, la proteína de fusión que contiene la sustitución de aminoácidos E46K en el polipéptido IL-15 mostró la mayor actividad citolítica contra las células diana que expresaban CD19 y, por lo tanto, se usó en experimentos posteriores.

Conclusiones de los datos presentados en la Fig. 2: dos de los tres polipéptidos IL-15 mutados evaluados, E46K y I50D, carecían de unión a ILR-15R $\alpha$  si se usaban dentro de una proteína de fusión dirigida a CD19 (A). La proteína de fusión que contenía la sustitución de aminoácidos E46K tuvo la mayor actividad citolítica contra las células diana que expresaban CD19 (B).

**Fig. 3.** Proliferación inducida por diferentes proteínas de fusión en linfocitos NK92 (**Fig. 3A**) y PBMC (**Fig. 3B**). Mientras que los experimentos representados en la Fig. 2 se realizaron con proteínas de fusión que contenían un enlazador corto, los experimentos presentados en la Fig. 3 hicieron uso además de proteínas de fusión que contenían un enlazador largo (L). Las proteínas de fusión con el enlazador largo comprenden un tramo de aminoácidos largo, de 20 aminoácidos (4-glicina 1-serina)<sup>4</sup>. En las proteínas de fusión que comprenden el enlazador corto, hIL-15 se une directamente al dominio CH3 a través del enlazador corto de glicina-serina. Las proteínas de fusión que contenían el enlazador largo o el corto se incubaron con linfocitos NK92 (**Fig. 3A**) o células PBMC (**Fig. 3B**) durante dos días. Después, las células se pulsaron con <sup>3</sup>H-timidina, se recogieron el día 3 en esteras filtrantes y se contaron en un contador de centelleo líquido.

En la **Fig. 3A**, los linfocitos NK92 se incubaron con diferentes concentraciones de las distintas proteínas de fusión como se indica (eje x y leyenda de las figuras en la Fig. 3A). Los linfocitos NK92 son células citolíticas naturales de linfoma, que no expresan CD19 a las que se une la proteína de unión a  $\alpha$ CD19 (Gong *et al.* (1994) "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells" *Leukemia*; 8(4):652-8). De este modo, este cultivo celular carece de células diana. Al medir la proliferación a través de los recuentos de <sup>3</sup>H-timidina como se representa en el eje y (**Fig. 3A**), se evalúa la capacidad de las proteínas de fusión para inducir la proliferación en las células efectoras en general.

$\alpha$ CD19-IL15-wt (4G7-IL15wt; que contiene el enlazador corto, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) y  $\alpha$ CD19-IL15-wt-L (4G7-IL15wt-L; que contiene el enlazador largo, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) dio lugar a un recuento de <sup>3</sup>H-timidina de aproximadamente 25.000. Sin embargo, la proteína con el enlazador largo fue considerablemente más activa a una concentración más baja, lo que indica que el enlazador corto afecta a la actividad de IL-15. Asimismo, las proteínas de fusión que contienen el polipéptido IL-15 de las proteínas de fusión de la presente invención han sido menos activas que las que contienen la proteína IL-15 de tipo silvestre. De este modo, la mutación E46K disminuye la actividad de IL-15 según lo esperado, ya que IL-15R $\alpha$  no puede presentar estas proteínas de fusión. Además, La actividad IL-15 se reduce aún más mediante la fusión a través de un enlazador corto.

También se obtuvieron resultados similares en los experimentos representados en la **Fig. 3B**. En este caso, se incubaron células PBMC con diferentes concentraciones de las distintas proteínas de fusión como se indica (eje x y leyenda de las figuras en la **Fig. 3B**). Algunas PBMC (tales como los linfocitos B) también expresan CD19, que es detectado por la proteína de unión a  $\alpha$ CD19 (en este caso 4G7). De forma destacable, un cultivo de PBMC también comprende algunas células efectoras potenciales, tales como, por ejemplo, los linfocitos NK. Como en la **Fig. 3A**, se determinó la proliferación mediante recuentos de <sup>3</sup>H-timidina como se representa en el eje y (**Fig. 3B**).

En estos experimentos,  $\alpha$ CD19-IL15-wt (4G7-IL15wt; enlazador corto) y  $\alpha$ CD19-IL15-wt-L (4G7-IL15wt-L; que contiene el enlazador largo y la IL-15 de tipo silvestre (wt)) dio lugar a un recuento de <sup>3</sup>H-timidina de aproximadamente 6.000 y 12.000, respectivamente. De nuevo,  $\alpha$ CD19-IL15-E46K (4G7-IL15-E46K, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) provista de una extensión menor de proliferación (aproximadamente 4.500 recuentos de <sup>3</sup>H-timidina), mientras que la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-E46K-L (4G7-IL15-E46K-L; que contiene el enlazador largo, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc que porta la modificación SDIE) dio lugar a una proliferación detectada similar a las proteínas de fusión de IL-15 de tipo silvestre (aproximadamente 8.500 recuentos; **Fig. 3B**). De este modo, en este experimento,  $\alpha$ CD19-IL15-E46K-L (4G7-IL15-E46K-L) indujo una mayor proliferación/activación de las células que la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-E46K (4G7-IL15-E46K), confirmando los resultados obtenidos con los linfocitos NK92.

Conclusiones de los datos presentados en la Fig. 3: (i) La proteína de fusión con la IL-15 que comprende la sustitución de aminoácidos E46K es menos activa que la proteína de fusión que comprende la IL-15 de tipo silvestre e (ii) la proteína de fusión con un enlazador largo (L) es más activa que aquellas con un enlazador corto. De este modo, las proteínas de fusión que contienen el enlazador largo se usaron en los experimentos posteriores.

**Fig. 4.** Activación de los linfocitos NK restringida a la célula diana (**Fig. 4A**) y destrucción de los linfocitos B (**Fig. 4B**) en los cultivos de PBMC por diferentes proteínas de fusión. Para evaluar la restricción a las células diana de las proteínas de fusión generadas, se incubaron PBMC normales con polipéptidos IL-15 e IL-15 de tipo silvestre que tenían una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la IL-15 de tipo silvestre comprendida en diferentes proteínas de fusión dirigidas al antígeno CD19 asociado a los linfocitos B y al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), respectivamente. Dado que hay linfocitos B presentes en los cultivos de PBMC, CD19 sirve como un antígeno diana relevante en esta configuración, mientras que PSMA está ausente y, por lo tanto, es irrelevante. Se incubaron PBMC durante tres días con las proteínas de fusión indicadas (0,1  $\mu$ g/ml) y luego se analizaron mediante citometría de flujo.

En la **Fig. 4A**, se evaluó la activación de los linfocitos NK y la muerte de los linfocitos B midiendo los números de células positivas en CD56 que expresaban CD69 (células doble positivas CD56+/CD69+). CD69 es expresada por los linfocitos NK activados, mientras que CD56 también es expresada por los linfocitos NK en reposo. Al seleccionarse células doble positivas (CD56+/CD69+), solo se miden los linfocitos NK activados.

En la **Fig. 4A**, los recuentos celulares se proporcionan en el eje y, y las diferentes proteínas de fusión utilizadas se representan en el eje x. En el cultivo de PBMC de control ("solo PBMC"), aproximadamente 12.000 células expresaron CD56 (CD56+) y aproximadamente 1.000 fueron de doble positivas en CD56 y CD69 (CD56+/CD69+). La aplicación de la proteína de unión a 4G7 dirigida a CD19 y que comprende las mutaciones SDIE ( $\alpha$ CD19-SDIE) aumentó ligeramente el número de linfocitos NK activados ( $\alpha$ CD19-SDIE: anticuerpo 4G7 optimizado para Fc portador de la modificación SDIE, sin polipéptido IL-15 unido al mismo). Por el contrario, el número de linfocitos NK activados dentro de los cultivos de PBMC aumentó enormemente como resultado de la adición de la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-SDIE-IL15wt-L (4G7-IL15wt-L, que contiene el enlazador largo, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc portador de la modificación SDIE). También se observó un aumento menos destacado pero aún notable en el número de linfocitos NK activados con la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-SDIE-IL15-E46K-L (4G7-IL15-E46K-L, que contiene el enlazador largo, en donde 4G7 es un anticuerpo 4G7 optimizado para Fc portador de la modificación SDIE).

Se realizaron experimentos adicionales con proteínas de fusión dirigidas a PSMA, que no es expresada por las células PBMC. En este caso, la adición de la proteína de fusión  $\alpha$ PSMA-IL15-E46K-L (que contiene el enlazador largo) no alteró significativamente la composición de las células. Por el contrario, la aplicación de la proteína de fusión  $\alpha$ PSMA-IL15wt (que contiene el enlazador largo) aumentó significativamente el número de linfocitos NK activados dentro del grupo de células positivas en CD56.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la activación de los linfocitos NK por las proteínas de fusión que contienen un polipéptido IL-15 de la presente invención está restringida a células diana, es decir, la proteína de unión dirigida a CD19, pero no la que se dirige a PSMA, activa los linfocitos NK y destruye los linfocitos B. Tras la aplicación de proteínas de fusión que comprenden IL-15 de tipo silvestre, la activación restringida a las células diana de los linfocitos NK es claramente menos prominente. Esto se debe a que la IL-15 de tipo silvestre es presentada en *trans* por IL-15R $\alpha$  y no requiere la unión de la proteína de fusión a las células diana.

En la **Fig. 4B**, se evaluó la activación de los linfocitos NK y la muerte de los linfocitos B midiendo los números de linfocitos B CD20+. CD20 es expresada exclusivamente por los linfocitos B. En este experimento, sirvió como control un cultivo celular que solo contenía células PBMC sin la adición de ninguna proteína de fusión. En este caso, se contaron aproximadamente 12.000 linfocitos B positivos en CD20 (CD20+). La adición del control de  $\alpha$ CD19-SDIE produjo una disminución de los linfocitos B positivos en CD20 (a aproximadamente 4.000 células). De forma destacable, las proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-SDIE-IL15wt-L (que comprende el enlazador largo) y  $\alpha$ CD19-SDIE-IL-15E46K-L (que comprende el enlazador largo) produjeron la mayor disminución en los linfocitos B positivos en CD20 (aproximadamente 2.000 células). Por el contrario, la adición de una proteína de fusión PSMA-IL-15wt mostró una disminución de aproximadamente 6.000 células. De forma destacable, la proteína de fusión PSMA-IL-15-E46K-L no alteró el número de linfocitos B positivos en CD20 en comparación con el control de "solo PBMC".

De este modo, la reducción del número de linfocitos CD20+ (agotamiento de linfocitos B) por las proteínas de fusión de la proteína de unión-polipéptido IL-15 fue más destacada que la del anticuerpo CD19 optimizado para Fc ( $\alpha$ CD19SDIE) solo (**Fig. 4B**). Asimismo, las proteínas de fusión dirigidas a PSMA mostraron que la proteína de fusión IL-15-E46K-L no mostró ningún efecto sobre los linfocitos B positivos en CD20. De este modo, la destrucción de los linfocitos B restringida a las células diana es más destacada usando las proteínas de fusión IL-15-E46K-L, mientras que las proteínas de fusión que comprenden IL-15 de tipo silvestre mostraron una destrucción de los linfocitos B restringida a las células diana menos destacada o incluso ausente (**Fig. 4B**).

En la **Fig. 4C**, se evaluó la activación de los linfocitos NK en cultivos de PBMC empobrecidos en linfocitos B. Los linfocitos B se agotaron con la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) usando MicroBeads CD19 (Miltenyi Biotec). Como en las Fig. 4A y 4B, para la determinación del número de células, se añadió una cantidad igual de perlas negativas BD (perlas negativas de BD Biosciences) a cada muestra. Durante la medición de citometría de flujo, se adquirió el mismo número de perlas negativas BD para todas las muestras. Esto permitió la cuantificación de las células y la comparación directa del número de células entre diferentes muestras de un experimento. Estos experimentos demostraron que la activación de los linfocitos NK se reduce notablemente en presencia de la proteína

de fusión que contiene el polipéptido IL-15 mutado E46K, casi alcanzando el nivel de la proteína correspondiente dirigida a PSMA. Esto se debe a que las células portadoras del antígeno diana CD19 se habían agotado. La actividad de las proteínas de fusión que contenían IL-15 de tipo silvestre apenas se vio afectada.

5 Conclusiones de los datos presentados en la Fig. 4:

10 a. La activación de los linfocitos NK por las proteínas de fusión que contienen un polipéptido IL-15 de la presente invención está restringida a las células diana, es decir, la proteína que se dirige a CD19, pero no la que se dirige a PSMA, activa los linfocitos NK y mata los linfocitos B. La activación de los linfocitos NK por las proteínas de fusión dirigidas a CD19 que comprenden los polipéptidos IL-15 mutados disminuyó si los linfocitos B se empobrecían en PBMC (Fig. 4C).

15 b. La activación de los linfocitos NK por ambas proteínas de fusión que contienen IL-15 de tipo silvestre no se restringe a las células diana, es decir, ambas proteínas de fusión inducen la activación de los linfocitos NK y al menos cierta destrucción de los linfocitos B, independientemente del antígeno diana.

c. El agotamiento de los linfocitos B por las proteínas de fusión de la invención es más destacado que el del anticuerpo CD19 optimizado para Fc (4G7SDIE) solo (Fig. 4B).

20 **Fig. 5.** Representación de diferentes secuencias. La secuencia de hIL-15 de tipo silvestre se representa en SEQ ID NO: 1. Los 48 primeros aminoácidos de esta secuencia que están subrayados comprenden el péptido señal de 48 aminoácidos de longitud, que se escinde durante la secreción de hIL-15 y no forma parte de las proteínas de fusión de IL-15. En SEQ ID NO: 1, los aminoácidos correspondientes, que son importantes para la unión de la IL-15 de tipo silvestre a IL-15R $\alpha$  (mostrado en SEQ ID NO: 2, 3 y SEQ ID NO: 4, como se muestra en la Fig. 5) están resaltados en gris. También están resaltados en gris en SEQ ID NO: 1 los aminoácidos importantes para la unión del receptor  $\beta\gamma$  como se describe en Ring *et al.* (2012) (Ring *et al.* (2012) "Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15" *Nat Immunol*; 13:1187-1195). En particular, los aminoácidos importantes para la unión del receptor  $\beta\gamma$  son los aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 55, 56, 58, 59, 109, 113, 116, 117, 156, 157, 160 de SEQ ID NO: 1. Las posiciones de aminoácidos importantes para la unión de IL15R $\alpha$  o del receptor de  $\beta\gamma$  también se representan en las siguientes Tablas 1 y 2.

25 También se muestran secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada monocatenario del anticuerpo anti-CD19 4G7 (SEQ ID NO: 5), dominio variable de cadena ligera monocatenario del anticuerpo anti-CD19 4G7 (SEQ ID NO: 6), dominio variable de cadena pesada monocatenario del anticuerpo anti-FLT3 BV10 (SEQ ID NO: 7), dominio variable de cadena ligera monocatenario del anticuerpo anti-FLT3 BV10 (SEQ ID NO: 8), dominio variable de cadena pesada monocatenario del anticuerpo anti-FLT3 4G8 (SEQ ID NO: 9), dominio variable de cadena ligera monocatenario del anticuerpo anti-FLT3 4G8 (SEQ ID NO: 10), dominio variable de cadena pesada monocatenario del anticuerpo anti-PSMA J591 (SEQ ID NO: 11), dominio variable de cadena ligera monocatenario del anticuerpo anti-PSMA J591 (SEQ ID NO: 12), dominio variable de cadena pesada monocatenario del anticuerpo anti-endoglina Kro23 (SEQ ID NO: 25), dominio variable de cadena ligera monocatenario del anticuerpo anti-endoglina Kro23 (SEQ ID NO: 26). Las secuencias de CDR están subrayadas.

30 **Fig. 6.** Representación de una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-endoglina (Kro23) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante (SEQ ID NO: 27), así como la cadena ligera de IgG1 anti-endoglina (Kro23) (SEQ ID NO: 28). En la representación de la SEQ ID NO: 27, la región VH está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, seguida de la región CH1 sin resaltar. La región bisagra está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva, mientras que la siguiente región CH2 está nuevamente sin resaltar. La región CH3 posterior está resaltada en gris y se representa con letras en negrita, seguida de una secuencia enlazadora, que no está resaltada. La parte final es la IL15 mutante (IL15mut), que está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva y en negrita, y en donde el aminoácido mutado de la IL15 mutante está subrayado. Esta mutación corresponde a una mutación E46K de SEQ ID NO: 4. En SEQ ID NO: 26, la región VL está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, mientras que la región CL no está resaltada.

35 **Fig. 7.** Representación de una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 de tipo silvestre con enlazador de glicina-serina (enlazador corto) (SEQ ID NO: 29), una proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante E46K con enlazador corto (SEQ ID NO: 30), una proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante V49D con enlazador corto (SEQ ID NO: 31), una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante I50D con enlazador corto (SEQ ID NO: 32), una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 de tipo silvestre con enlazador (glicina4-serina<sub>1</sub>)<sub>4</sub> (enlazador largo) (SEQ ID NO: 33), una proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante E46K con enlazador largo (SEQ ID NO: 34), una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante V49D con enlazador largo (SEQ ID NO: 35), una proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante I50D con enlazador largo (SEQ ID NO: 36), así como la cadena ligera de IgG1 anti-CD19

(4G7) (SEQ ID NO: 37). En la descripción de las SEQ ID NO: 30-37, la región VH está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, seguida de la región CH1 sin resaltar. La región bisagra está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva, mientras que la siguiente región CH2 está nuevamente sin resaltar. La región CH3 posterior está resaltada en gris y se representa con letras en negrita, seguida de una secuencia enlazadora, que no está resaltada. La parte final es la IL15 mutante (IL15mut), que nuevamente está resaltada en gris y se representa con letras en cursiva y en negrita, y en donde el aminoácido mutado está subrayado en las proteínas de fusión que comprenden las IL-15 mutantes. Estas mutaciones corresponden a una mutación E46K (SEQ ID NO: 30 y 34), V49D (SEQ ID NO: 31 y 35) o I50D (SEQ ID NO: 32 y 36) de SEQ ID NO: 4, respectivamente. En SEQ ID NO: 37, la región VL está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, mientras que la región CL no está resaltada.

**Fig. 8.** Representación de una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-FLT3 (BV10) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante (SEQ ID NO: 38), así como la cadena ligera de IgG1 anti-FLT3 (BV10) (SEQ ID NO: 39). En la representación de la SEQ ID NO: 38, la región VH está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, seguida de la región CH1 sin resaltar. La región bisagra está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva, mientras que la siguiente región CH2 está nuevamente sin resaltar. La región CH3 posterior está resaltada en gris y se representa con letras en negrita, seguida de una secuencia enlazadora, que no está resaltada. La parte final es la IL15 mutante (IL15mut), que está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva y en negrita, y en donde el aminoácido mutado de la IL15 mutante está subrayado. Esta mutación corresponde a una mutación E46K de SEQ ID NO: 4. En SEQ ID NO: 39, la región VL está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, mientras que la región CL no está resaltada.

**Fig. 9.** Representación de una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-FLT3 (4G8) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante (SEQ ID NO: 40), así como la cadena ligera de IgG1 anti-FLT3 (4G8) (SEQ ID NO: 41). En la representación de la SEQ ID NO: 40, la región VH está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, seguida de la región CH1 sin resaltar. La región bisagra está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva, mientras que la siguiente región CH2 está nuevamente sin resaltar. La región CH3 posterior está resaltada en gris y se representa con letras en negrita, seguida de una secuencia enlazadora, que no está resaltada. La parte final es la IL15 mutante (IL15mut), que está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva y en negrita, y en donde el aminoácido mutado de la IL15 mutante está subrayado. Esta mutación corresponde a una mutación E46K de SEQ ID NO: 4. En SEQ ID NO: 41, la región VL está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, mientras que la región CL no está resaltada.

**Fig. 10.** Representación de una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-PSMA (J591) que comprende la modificación SDIE y una IL15 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 42), una proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-PSMA (J591) que comprende la modificación SDIE y una IL15 mutante E46K (SEQ ID NO: 43), así como la cadena ligera de IgG1 anti-PSMA (J591) (SEQ ID NO: 44). En la descripción de las SEQ ID NO: 42 y 43, la región VH está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, seguida de la región CH1 sin resaltar. La región bisagra está nuevamente resaltada en gris y se representa con letras en cursiva, mientras que la siguiente región CH2 está nuevamente sin resaltar. La región CH3 posterior está resaltada en gris y se representa con letras en negrita, seguida de una secuencia enlazadora, que no está resaltada. La parte final es la IL15 mutante (IL15mut), que nuevamente está resaltada en gris y se representa con letras en cursiva y en negrita, y en donde el aminoácido mutado está subrayado en la proteína de fusión que comprende la IL-15 mutante. Esta mutación corresponde a una mutación E46K (SEQ ID NO: 43) de SEQ ID NO: 4. En SEQ ID NO: 44, la región VL está resaltada en gris, donde las CDR están subrayadas, mientras que la región CL no está resaltada.

Tabla 1:

Posiciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1	92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115, 116
Posiciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 4	44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 64, 65, 66, 67, 68

Tabla 1: Secuencias importantes para la unión a IL-15R $\alpha$

Tabla 2:

Posiciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1	55, 56, 58, 59, 109, 113, 116, 117, (unión a la cadena $\beta$ ) 156, 157, 160 (unión a la cadena $\gamma$ )
Posiciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 4	7, 8, 10, 11, 61, 65, 68, 69 (unión a $\beta$ ), 108, 109, 112 (unión a $\gamma$ )

Tabla 2: Secuencias importantes para la unión a IL-15R $\beta\gamma$

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 es un fragmento de SEQ ID NO: 1, en la que las posiciones de aminoácidos importantes para la unión a IL-15R $\alpha$  y IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  también se destacan en la Fig. 5.

## 55 Descripción detallada

La presente solicitud proporciona proteínas de fusión que son capaces de destruir de forma restringida a las células diana (de estas células diana), en donde estas proteínas de fusión contienen dos "partes funcionales diferentes", en concreto, como primera parte, una proteína de unión (como se describe en detalle en el presente documento) y, como segunda parte, un polipéptido IL-15, preferentemente, un polipéptido IL-15 humano que tiene una afinidad reducida por la "IL-15R $\alpha$  humana en comparación con la afinidad de la IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 (número de acceso de UniProt: P40933). Los inventores han descubierto que dicho polipéptido IL-15 comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Se observa en este contexto que el término "IL-15R $\alpha$ " se usa en su significado normal para referirse al receptor de interleucina 15, subunidad alfa, eso significa la subunidad del receptor de interleucina 15 que se une a IL-15 con alta afinidad e independientemente de las otras dos subunidades del receptor IL-15, CD122 y CD132 (que el receptor IL-15 comparte con el receptor de IL-2). La secuencia de aminoácidos de "IL-15R $\alpha$ " es conocida para muchas especies, la secuencia del "IL-15R $\alpha$ " humano se ha depositado con el número de acceso UniProt Q13261.

También el término "IL-15" o "IL15" se usa en su significado normal para referirse a la Interleucina 15. La secuencia de aminoácidos de "IL-15" es conocida para muchas especies, la secuencia de la "IL-15" humana se ha depositado como la Isoforma IL15-S48AA con el número de acceso UniProt P40933 y el número de acceso de GeneBank DQ893709, respectivamente, y se representa en SEQ ID NO: 1).

En principio, en las proteínas de fusión que comprenden dicho polipéptido IL-15, la proteína de unión a la diana reemplaza la función de la cadena  $\alpha$  del receptor IL-15, generando así una estimulación restringida a las células diana de la cadena  $\beta$  que depende de la unión de la proteína de unión a su antígeno diana, expresado, por ejemplo, en una célula tumoral. De este modo, los efectos fuera de la diana se reducen, y es posible la aplicación de dosis más altas, capaz de lograr, por ejemplo, suficiente activación de los linfocitos NK y T *in vivo*. Una vez activados, por ejemplo, los linfocitos NK pueden ser reclutados de manera eficaz por, por ejemplo, una proteína de unión dirigida optimizada para Fc comprendida en una proteína de fusión de la presente invención (Fig. 1).

Las proteínas de fusión de la presente invención son una alternativa ventajosa frente a los complejos conocidos o las proteínas de fusión de IL-15 y IL-15R $\alpha$  recombinante soluble, o fragmentos de los mismos. véase en este sentido, por ejemplo, Bessard *et al.* (2009) "High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)-IL-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer" *Mol Cancer Ther*, 8:2736-2745, Vincent *et al.* (2013) "Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency". *Int J Cancer*, 133:757-765, o Kermer *et al.* (2012) "An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site" *Mol Cancer Ther*, 11:1279-1288). La IL-15R $\alpha$  recombinante o sus fragmentos descritos en estas referencias comprenden el denominado "dominio Sushi", que es importante para la unión de IL-15 al IL-15R $\alpha$  (véase Wei *et al.* (2001) "The Sushi Domain of Soluble IL-15 Receptor  $\alpha$  Is Essential for Binding IL-15 and Inhibiting Inflammatory and Allogenic Responses *In Vitro* and *In Vivo*" *The Journal of Immunology*; vol. 167, n.º 1, pág. 277-282). Para las construcciones que solo comprenden IL-15, es evidente que solo funcionan mediante la unión a IL-15 $\alpha$ R y L-2/IL-15R $\beta$ . Sin limitarse a la teoría, se cree que esta doble dependencia en dos receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) hace que la acción de estas construcciones de IL-15 de tipo silvestre sea menos específica de la célula diana. Esto también se demuestra en los ejemplos de la presente solicitud, donde se muestra que las proteínas de fusión de la presente invención actúan de una manera mucho más restringida a la diana que las proteínas de fusión que comprenden IL-15 de tipo silvestre.

También se ha demostrado que las proteínas de fusión o los complejos de IL-15 e IL-15R $\alpha$ Fc son más eficaces para estimular la proliferación de las células CD8+ del fenotipo de memoria y los linfocitos NK que la citocina sola. Por tanto, esas proteínas de fusión se han denominado "superagonistas de IL-15". Debido a la inesperada función superagonística de los complejos IL15/IL-15R $\alpha$ , es altamente improbable que su efecto pueda convertir la célula diana restringida por la fusión a, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a un antígeno asociado a un tumor. Que la actividad de los "superagonistas de IL-15" no se vea más reforzada por la reticulación de Fc (Rubinstein *et al.* (2006)) apoya esta noción. "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R $\alpha$ " *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*; 103:9166-9171). Por el contrario, las proteínas de fusión de la invención descritas en el presente documento que comprenden una proteína de unión y variantes de IL-15 mutadas presentan una actividad de IL-15 marcadamente reducida a menos que estén unidas a una célula diana a través de la proteína de unión.

En particular, La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

a) una proteína de unión que comprende al menos un sitio de unión, en donde el sitio de unión se une a un antígeno asociado con una célula diana; y

b) un polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, por lo que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de la IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 (número Uniprot: P40933-1),

en donde el polipéptido IL-15 se une a IL-2/IL-15R $\beta$ , en donde la proteína de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo divalente, un fragmento de anticuerpo monovalente o una

molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo.

La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente divulgación puede ser cualquier proteína que pueda unirse a un antígeno que esté asociado con una célula diana. La proteína de unión es una molécula de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo intacto, un fragmento de anticuerpo divalente o un fragmento de anticuerpo monovalente. Como alternativa, la proteína de unión es una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo.

Una "molécula de anticuerpo" como se usa en el presente documento puede ser un anticuerpo de longitud completa, una molécula de anticuerpo recombinante o una molécula de anticuerpo completamente humana. Un anticuerpo de longitud completa es cualquier anticuerpo natural. El término "anticuerpo" también incluye inmunoglobulinas (Ig) de diferentes clases (es decir, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (tales como IgG1, IgG2). Dichos anticuerpos de longitud completa pueden aislarse de diferentes animales, tales como, por ejemplo, diferentes especies de mamíferos. Una "molécula de anticuerpo recombinante" se refiere a una molécula de anticuerpo cuyos genes se han clonado, y que se produce de forma recombinante en una célula u un organismo hospedador, usando metodologías bien conocidas de ingeniería genética. Por lo general, una molécula de anticuerpo recombinante ha sido genéticamente modificada para comprender una secuencia de aminoácidos, que no se encuentra en la naturaleza. De este modo, una molécula de anticuerpo recombinante puede ser una molécula de anticuerpo quimérico o una molécula de anticuerpo humanizado. En realizaciones preferidas, la proteína de fusión comprende la cadena pesada de una inmunoglobulina descrita en el presente documento y una IL-15 mutante descrita en el presente documento, que puede conectarse a través de un enlazador descrito en el presente documento. Con esta configuración, se prefiere que la fracción de inmunoglobulina se localice en el extremo N de la IL-15 mutante. En dicha proteína de fusión, la cadena ligera de la molécula de anticuerpo está emparejada con la cadena pesada del anticuerpo como en cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo normal (véase en este sentido también la Fig. 1A).

La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede ser un "fragmento de anticuerpo". Dichos fragmentos de anticuerpo comprenden al menos esas partes de un anticuerpo, que forman el sitio de unión (al antígeno). Los ejemplos ilustrativos de dicho fragmento de anticuerpo son fragmentos variables monocatenario (scFv), fragmentos Fv, anticuerpos de un solo dominio, tales como, por ejemplo, anticuerpos VHH (camélidos), di-scFv, fragmentos de regiones de unión al antígeno (Fab), fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab', diacuerpos, anticuerpos de dominio, (Holt L. J., Herring C., Jaspers L. S., Woolven B. P., Tomlinson I. M., "Domain antibodies: proteins for therapy". *Trends Biotechnol.* noviembre de 2003; 21 (11): 484-90), o moléculas de anticuerpos "Fabc" biespecíficos como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2013/092001, que comprenden un fragmento Fv monocatenario que está conectado a un fragmento Fab a través de un dominio CH2 por nombrar solo algunos.

Como se ha indicado anteriormente, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo divalente que comprenda dos sitios de unión con diferentes especificidades, por ejemplo, una especificidad contra un antígeno asociado al tumor tal como FLT3, CD20, CD10, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38 o CD44v6 (véase también más abajo) y un receptor tal como CD3 o CD16, que está presente en las células efectoras tales como los linfocitos T o los linfocitos NK. Los ejemplos de formatos que pueden usarse para dichos fragmentos de anticuerpos divalentes incluyen un fragmento (Fab)<sub>2</sub>, un fragmento Fv monocatenario biespecífico, un dímero bsFc-1/2 o un dímero bsFc-CFI3-1/2 como los descritos en la solicitud de patente internacional WO 2013/092001. También, por ejemplo, se pueden utilizar moléculas de anticuerpos biespecíficos (o trispecíficos) descritas, por ejemplo, en Lamerisa *et al.* (2014) "Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy" *Crit Rev Oncol Hematol.* S1040-8428(14)00135-8, Kontermann (2012) "Dual targeting strategies with bispecific antibodies" *Landes Bioscience mAbs* Vol. 4, Número 2 182-197. Como alternativa, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede ser una molécula de unión artificial proteica bivalente tal como una muteína de lipocalina, que también se conoce como "duocalina".

Sin embargo, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención solo puede tener un solo sitio de unión, es decir, puede ser monovalente. Los ejemplos de proteínas de unión monovalentes incluyen un fragmento de anticuerpo monovalente, una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo. Los ejemplos de dichos fragmentos de anticuerpos monovalentes incluyen un fragmento Fab, un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario (scFv) o un fragmento scFv-Fc.

Como se ha explicado anteriormente, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención puede ser, como alternativa, una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo. Los ejemplos ilustrativos de moléculas de unión proteicas con propiedades de unión de tipo anticuerpo que se pueden usar como proteínas de unión incluyen un aptámero, una muteína a base de un polipéptido de la familia de las lipocalinas (las muteínas de lipocalina ilustrativas que también se conocen con el nombre comercial "Anticalin®" son, por ejemplo, las que se describen en las solicitudes PCT WO 99/16873, WO 00/75308, WO 03/029471, WO 03/029462, WO 03/029463, WO 2005/019254, WO 2005/019255, WO 2005/019256, WO 2006/56464 o WO 2008/015239, o la revisión del artículo de Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 257-275), un glucuerpo, una proteína basada en el armazón de anquirina, una proteína basada en el armazón cristalino, una adnectina, un avímero, un dominio de tipo EGF, un dominio Kringle, un dominio de fibronectina de tipo I, un dominio de fibronectina de tipo II, un dominio de fibronectina de tipo III, un dominio PAN, un dominio G1a, un dominio SRCR, un dominio inhibidor de tripsina pancreática bovina/de Kunitz, tendamistat, un dominio inhibidor de la serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio

de factor de von Willebrand de tipo C, un dominio de tipo anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición de tiroglobulina de tipo I, dominio de receptor de LDL de clase A, un dominio Sushi (módulos de proteína de control del complemento (PCC)), un dominio de enlace, un dominio de trombospondina de tipo I, un dominio de inmunoglobulina o un dominio de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos de dominio o anticuerpos de cadena pesada de camello), un dominio

5 de lectina de tipo C, un dominio MAM, un dominio de factor de von Willebrand de tipo A, un dominio de somatomedina B, un dominio de cuatro núcleos disulfuro de tipo WAP, un dominio F5/8 de tipo C, un dominio de hemopexina, un dominio SH2, un dominio SH3, un dominio de tipo EGF de tipo laminina, un dominio C2, "Kappabodies" (Ill CR1, Gonzales J. N., Houtz E. K., Ludwig J. R., Melcher E. D., Hale J. E., Pourmand R., Keivens V. M., Myers L., Beidler K., Stuart P., Cheng S., Radhakrishnan R. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of

10 both heavy and light chain variable regions". *Protein Eng.* Agosto de 1997;10(8):949-57) "Minibodies" (Martin F1, Toniatti C., Salvati A. L., Venturini S., Ciliberto G., Cortese R., Sollazzo M. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6". *EMBO J.* 15 de noviembre de 1994;13(22):5303-9), "Janusins" (Traunecker A., Lanzavecchia A., Karjalainen K. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells". *EMBO J.* Diciembre de 1991;10(12):3655-9 y Traunecker A., Lanzavecchia A., Karjalainen K. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents". *Int J Cancer Suppl.* 1992;7:51-2), un

15 nanocuerpo, una adnectina, una tetranectina, un microcuerpo, una afillina, un aficuerpo o una anquirina, un cristalino, una knotina, ubiquitina, una proteína de dedo de cinc, una proteína autofluorescente, una anquirina o proteína de repetición de anquirina o una proteína de repetición rica en leucina, un avímero (Silverman J1, Liu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B. M., Smith R., Rivas A., Li P., Le H., Whitehorn E., Moore K. W., Swimmer C., Perloth V., Vogt M., Kolkman J., Stemmer W. P., "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". *Nat Biotechnol.* diciembre de 2005;23(12):1556-61. Epub 20 de noviembre de 2005); así como las proteínas avímeras multivalentes evolucionadas por la combinación de exones de una familia de dominios de receptores humanos como también se describe en Silverman *et al.* (Silverman J., Liu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B. M., Smith R., Rivas A., Li P., Le H., Whitehorn E., Moore K. W., Swimmer C., Perloth V., Vogt M., Kolkman J., Stemmer W. P., "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". *Nat Biotechnol.* diciembre de 2005;23(12):1556-61. Epub 20 de noviembre de 2005).

La expresión "proteína de unión" de la proteína de fusión de la presente invención también incluye un aptámero no proteico. Dicho aptámero es un ácido oligonucleico que se une a una molécula diana específica. Estos aptámeros

30 normalmente se crean seleccionándolos de un gran grupo de secuencias aleatorias, pero también existen aptámeros naturales. Más específicamente, los aptámeros se pueden clasificar como: aptámeros de ADN o ARN. Consisten en cadenas (en general, cortas) de oligonucleótidos. Por tanto, un aptámero proteico como se ha descrito anteriormente también puede incluir una parte de oligonucleótido además de una parte de proteína.

35 La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención puede ser, por lo tanto, una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo, que se selecciona del grupo de un aptámero, una muteína basada en un polipéptido de la familia de las lipocalinas, un glucuerpo, una proteína basada en el armazón de anquirina, una proteína basada en el armazón cristalino, una adnectina o un avímero.

40 La proteína (el receptor) que está unida por la proteína de unión puede ser cualquier antígeno asociado con una célula diana como se describe en el presente documento. Se prevé en este contexto por la presente invención que también un ligando de una proteína receptora que se selecciona en el presente documento como una diana de la proteína de unión sea una proteína (diana), que se asocia con una célula diana como se describe en el presente documento. Los ejemplos de dicho ligando recombinante o de origen natural que se une a una proteína receptora asociada con una

45 célula diana son CD135, también conocida como tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT-3), proteína tirosina quinasa de tipo receptor FLT3 o quinasa hepática fetal 2 (Flk2). CD135 es el receptor para el ligando de citocina Flt3 (FLT3L). De este modo, también se puede usar FLT3L como una proteína de unión para unirse a FLT-3. Por otro lado, también se puede usar el receptor FLT-3 como proteína de unión para unirse a FLT-3L.

50 Pasando ahora a la acción fisiológica de una proteína de fusión de la invención, la capacidad de reclutar células efectoras inmunitarias positivas en el receptor Fc (FcR), tales como linfocitos NK, se considera importante para la actividad terapéutica de las proteínas de fusión de la presente invención. Si bien se puede usar una proteína de fusión que contenga como proteína de unión ("parte a" de la proteína de fusión) una molécula de anticuerpo con los dominios CF12 y CF13 constantes para este fin, se observa que el experto en la materia conoce varias estrategias que se pueden

55 usar para potenciar la actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) de las proteínas de unión de las proteínas de fusión (resumidas a modo de ejemplo en Beck *et al.* (2010) y Natsume *et al.* (2009) (Beck A. *et al.* (2010) "Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies". *Nat Rev Immunol*; 10:345-352; Natsume A., Niwa R., Satoh M. "Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC" *Drug Des Devel Ther.* 2009;3:7-16). Sin embargo, la capacidad de reclutar células efectoras inmunitarias positivas en el receptor Fc no se limita en modo alguno a las proteínas de fusión en la proteína de unión, sino que se basa en un anticuerpo/una inmunoglobulina. En cambio, también es posible, por ejemplo, usar como proteína de unión otras moléculas proteicas, tales como una muteína de lipocalina que se fusiona con una parte de un polipéptido Fc (que puede comprender un dominio CF12 y/o CF13) que proporciona actividad ADCC. El polipéptido Fc se fusiona a su vez con un polipéptido IL-15 mutado como se describe en el presente documento. En dicha proteína de fusión, la

60 parte Fc/el polipéptido no solo sirve como la fracción que proporciona la "actividad ADCC", sino, al mismo tiempo, como un enlazador entre la proteína de unión y el polipéptido IL-15 mutado.

65

De este modo, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención puede modificarse de modo que tenga una actividad potenciada de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) en comparación con una proteína de unión no modificada. La actividad de ADCC se puede medir mediante pruebas bien conocidas, tales como, por ejemplo, aCella™-TOX, un ensayo de liberación de GAPDH, que se puede obtener, por ejemplo, en Promega o Interchim. Como alternativa, la ADCC también se puede medir como se describe en los ejemplos del presente documento. La proteína de unión modificada de la proteína de fusión de la presente invención puede tener, por lo tanto, una mayor actividad de ADCC en comparación con la (misma) proteína de unión (pero) no modificada que no comprenda la modificación. Por ejemplo, un anticuerpo 4G7 modificado como se describe en el presente documento en los ejemplos tiene una mayor actividad de ADCC que un anticuerpo 4G7 "normal" que no comprende las modificaciones SDIE en su parte Fc.

Una de las estrategias para mejorar la actividad de destrucción celular de las proteínas de fusión de la presente invención puede, por ejemplo, ser el uso de moléculas de anticuerpos quiméricos convencionales, así como de anticuerpos optimizados para Fc que contengan una "mutación SDIE". Se sabe que estos últimos anticuerpos median en la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) potenciada notablemente (Lazar *et al.* (2006) "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function". *Proc Nat Acad Sci EE.UU.*, 2006; 103:4005-4010; Horton *et al.* (2008) "Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia" *Cancer Res*; 68:8049-8057; Foyil y Bartlett (2010) "Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma" *Curr Hematol Malig Rep*; 5:140-147).

Por tanto, la proteína de unión a la proteína de unión modificada de la proteína de fusión de la presente invención puede optimizarse para Fc. Esta modificación produce una actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) potenciada en comparación con la actividad ADCC de la proteína de unión no modificada. La proteína de unión modificada puede, por ejemplo, ser un anticuerpo intacto, un fragmento scFv-Fc, un dímero bsFc-1/2 o un dímero bsFc-CH3-1/2. Los dos últimos formatos de anticuerpo se describen en la solicitud de patente internacional WO2013/092001.

En particular, la optimización de Fc puede comprender una sustitución de aminoácidos, que se selecciona del grupo que consiste en F243L y/o D270E y/o R292P y/o S298A y/o S298N y/o Y300L y/o 305I y/o A330V y/o A330L y/o I332E y/o E333A y/o K334A y/o P396L y/o S239D, en donde la numeración posicional es de acuerdo con el índice de la UE. La numeración de los aminoácidos usados corresponde a las posiciones de la secuencia de acuerdo con la numeración de Kabat [Índice de la UE]. La proteína de unión modificada optimizada para Fc también puede comprender una mutación "SDIE" como se describe en Fofmann *et al.* (2012) "Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia" *Leukemia*; 26:1228-1237. De este modo, la optimización de Fc puede comprender una sustitución de aminoácidos que comprende S239D e I332E, en donde la numeración posicional está de acuerdo con el índice de la UE. La optimización para Fc también puede comprender las sustituciones de aminoácidos F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L, en donde la numeración posicional está de acuerdo con el índice de la UE. La optimización para Fc también puede comprender las sustituciones de aminoácidos F243L, R292P e Y300L, en donde la numeración posicional está de acuerdo con el índice de la UE.

También se prevé que las sustituciones de aminoácidos indicadas correspondan a las posiciones de aminoácidos indicadas. Eso significa que, por ejemplo, en fragmentos de anticuerpos o proteínas de unión que comprenden un dominio Fc, la numeración posicional de los aminoácidos indicados puede diferir, pero aún puede tener aminoácidos vecinos similares, como también se describe a continuación en más detalle.

Como se ha explicado anteriormente, la capacidad de reclutar células efectoras inmunitarias positivas en el receptor Fc (FcR), tales como linfocitos NK, se considera crucial para la actividad terapéutica de la mayoría de los anticuerpos. Otra estrategia para obtener proteínas de unión modificadas con una actividad potenciada de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC), en comparación con la proteína de unión no modificada que se logra mediante ingeniería genética del patrón de glicosilación de la proteína de unión modificada.

De este modo, si se usan las moléculas de anticuerpos correspondientes como proteína de unión, dicha proteína de unión modificada de la proteína de fusión de la presente invención puede tener un patrón de glicosilación de oligosacáridos unidos a Fc que es diferente del patrón de glicosilación de oligosacáridos unidos a Fc de la proteína de unión no modificada. En particular, la proteína de unión modificada está menos fucosilada que la proteína de unión no modificada. La proteína de unión modificada también puede no estar fucosilada. Por ejemplo, los oligosacáridos unidos a Fc de la proteína de unión modificada pueden ser un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % menos fucosilados que los oligosacáridos unidos a Fc de la proteína de unión no modificada. En general, la fucosilación de una proteína se puede medir mediante técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede usar el alquino fucosa Click-iT® de Life Technologies o un método como el descrito en el documento EP 2483693.

La proteína de unión modificada de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender ambos, un patrón de optimización para Fc y un patrón de glicosilación de oligosacáridos unidos a Fc que sea diferente del patrón de glicosilación de los oligosacáridos unidos a Fc de la proteína de unión no modificada.

- De este modo, en principio, se puede lograr una ADCC potenciada de la proteína de unión de la presente invención mediante el diseño por ingeniería genética del patrón de glicosilación y/o la secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de la parte Fc de la IgG que está contenida en la mayoría de los anticuerpos antitumorales en el uso clínico actual
- 5 (Shinkawa *et al.* (2003) "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N- acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" *J Biol Chem*; 278:3466- 3473; Lazar *et al.* (2006) "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function" *Proc Nat Acad Sci EE.UU.*; 103:4005-4010).
- 10 Ambas estrategias se usado en la industria farmacéutica para el desarrollo de anticuerpos de tercera generación optimizados para Fc (Oflazoglu y Audoly (2010) "Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology" *MAbs*; 2:14-19): Roche (Basilea, Suiza) en cooperación con Glycart (Schlieren, Suiza) ha desarrollado un anticuerpo CD20 de glicosilación diseñada por ingeniería genética GA101 (Obinutuzumab). En un gran ensayo clínico reciente con pacientes que padecían leucemia linfática crónica (LLC), este anticuerpo fue superior al Rituxan (Goede *et al.*
- 15 (2014) "Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions" *N Engl J Med*; 370:1101-1110). Otros dos anticuerpos dirigidos a los antígenos asociados al linfoma CD19 (XmAb5574) y CD30 (XmAb2513), desarrollados por Xencor (Monrovia, CA EE.UU.) portan los intercambios de aminoácidos S239D e I332E (modificación SDIE). Como el GA101, se informó que estos anticuerpos ejercen una ADCC notable (Horton *et al.* (2008) "Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia" *Cancer Res*; 68:8049-8057; Foyil y Bartlett (2010) "Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma" *Curr Hematol Malig Rep*; 5: 140-147) y actualmente se evalúan en ensayos clínicos). Dichas proteínas de unión disponibles en el mercado incluyen veltuzumab (anticuerpo anti-CD20), ocrelizumab (anti-CD20), ocratuzumab (anticuerpo anti-CD20), obinutuzumab (anticuerpo anti-CD20), XmAb5574 (anticuerpo anti-CD19) y XmAb2513 (anticuerpo anti-CD20).
- 25 En principio, aunque se puede usar cualquier proteína de unión disponible en el mercado para la proteína de fusión de la presente invención. Otras proteínas de unión de ejemplo y puramente ilustrativas que se pueden usar en la proteína de fusión de la presente invención incluyen rituximab (anticuerpo anti-CD20), ibritumomab (anticuerpo anti-CD20), tiuxetan (anticuerpo anti-CD20), tositumomab (anticuerpo anti-CD20), ofatumumab (anticuerpo anti-CD20), brentuximab vedotina (anticuerpo anti-CD30), gemtuzumab (anticuerpo anti-CD33), ozogamicina (anticuerpo anti-CD33), IGN101 (anticuerpo anti-EpCAM), adecatumumab (anticuerpo anti-EpCAM), labetuzumab (anticuerpo anti-CEA), minretumomab (anticuerpo anti-TAG-72), J591 (anticuerpo anti-PSMA), hu3S193 (anticuerpo anti-Lewis Y), IgN311 (anticuerpo anti-Lewis Y), IM-2C6 (anticuerpo anti-VEGF), CDP791 (anticuerpo anti-VEGF), brevacizumab (anticuerpo anti-VEGF), trastuzumab (anticuerpo anti-ERBB2), pertuzumab (anticuerpo anti-ERBB2), MM-121 (anticuerpo anti-ERBB3), cetuximab (anticuerpo anti-EGFR), panitumumab (anticuerpo anti-EGFR), nimotuzumab (anticuerpo anti-EGFR), 806 (anticuerpo anti-EGFR), sibrotuzumab (anticuerpo anti-FAP), F19 (anticuerpo anti-FAP) y 81C6 (anticuerpo anti-tenascina). La presente invención contempla además que las proteínas de unión disponibles en el mercado pueden modificarse de modo que tengan una actividad de ADCC potenciada en comparación con sus homólogas no modificadas.
- 40 Como se ha mencionado anteriormente, también se prevén proteínas de unión biespecíficas con un sitio de unión que se une a un antígeno que está asociado con una célula diana como se describe en el presente documento, mientras que el segundo sitio de unión de las proteínas de unión biespecíficas se une a un antígeno asociado con una célula efectora o una célula diana. Los antígenos asociados con una célula efectora pueden incluir, por ejemplo, CD3 o CD16.
- 45 Ya se han usado diferentes anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpos divalentes en entornos clínicos. Los ejemplos de dichos anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpos divalentes que también pueden usarse para las proteínas de fusión de la presente invención incluyen BiMAB (anticuerpo monoclonal biespecífico anti-CD16 x anti-CD30), HRS-3/A9 (anticuerpo anti-CD16 x anti-CD30), catumaxomab (removab, anti-EpCAM x anti-CD3), ertumaxomab (anti-HER2 x anti-CD3), SHR-1 (anti-CD3 x anti-CD19), blinatumomab, CBA-CEACD3 (CD3 x CEA), BIS-1 (anti-EGP-2 x anti-CD3), MT-110 (anti-EpCAM x anti-CD3), EGFRBi (BiAb anti-CD3 x anti-EGFR), CD20Bi (BiAb anti-CD3 x anti-CD20), MGD006 (anti-CD123 x anti-CD3), FBTA05 (anti-CD20 x anti-CD3), MGD007 (anti-gpA33 x anti-CD3), MOR209/ES414 (anti-PSMA x anti-CD3), BAY2010112 (anti-PSMA x anti-CD3), anticuerpos triomab tales como triomab anti-CD3 x anti-EpCAM y bsFab<sub>2</sub> EGFRxCD3 (Jung *et al.* *Int J Cancer* "Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ
- 55 T-cell activation and therapeutic efficacy". 15 de enero; 91(2):225-30, 2001). En un ejemplo concreto, la molécula de anticuerpo biespecífico se une a CD3 y CD19. Los ejemplos de dichas moléculas de anticuerpos biespecíficos CD3 x CD19 incluyen aquellas moléculas de anticuerpos monocatenarios que se describen en las solicitudes de patentes internacionales WO 99/54440 y WO 2004/106381. Dichas proteínas de unión disponibles en el mercado también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.
- 60 Cabe señalar en el presente documento que es competencia del experto medio en el campo de la expresión y purificación de proteínas la construcción de una fusión de cualquiera de dichas proteínas de unión descritas en el presente documento (molécula de anticuerpo o una proteína de unión proteica) con propiedades de tipo anticuerpo
- 65 tales como "Anticalin®) con un polipéptido IL-15 mutado como se usa en el presente documento. Por lo general, para este fin, se genera un ácido nucleico que permite, tras la expresión, la fusión del polipéptido IL-15 mutado en el extremo

C o N de la proteína de unión. Está dentro del conocimiento del experto medio en la materia la determinación (empíricamente) de cómo fusionar el polipéptido IL-15 mutado con la proteína de unión mientras se mantiene la funcionalidad de ambas fracciones en la proteína de fusión de la invención.

5 Se prevé además que, en una realización específica, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprende un sitio de unión del anticuerpo 4G7, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 5 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de 4G7). La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender además o como alternativa un sitio de unión del anticuerpo 4G7, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO. 6 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de 4G7). Además, estas proteínas de unión también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.

15 También se prevé que la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprenda un sitio de unión del anticuerpo BV10, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 7 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de BV10). La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender además o como alternativa un sitio de unión del anticuerpo BV10, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO. 8 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de BV10). Además, estas proteínas de unión también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.

25 También se prevé que la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprenda un sitio de unión del anticuerpo 4G8, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 9 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de 4G8). La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender además o como alternativa un sitio de unión del anticuerpo 4G8, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO. 10 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de 4G8). Además, estas proteínas de unión también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.

35 Se prevé además que la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprende un sitio de unión del anticuerpo J591, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 11 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de J591). La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender además o como alternativa un sitio de unión del anticuerpo J591, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO. 12 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de J591). El anticuerpo J591 se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.107.090 y también se ha depositado con el número de acceso ATCC HB-12126. Además, estas proteínas de unión también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.

40 Como se ha mencionado anteriormente, la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprende al menos un sitio de unión. Sin embargo, la proteína de unión también puede comprender dos o más (por ejemplo, tres o cuatro) sitios de unión.

50 Se prevé además que la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención comprende un sitio de unión del anticuerpo K-ro23, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 25 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de K-ro23). La proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención también puede comprender además o como alternativa un sitio de unión del anticuerpo K-ro23, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 26 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de K-ro23). Además, estas proteínas de unión también pueden modificarse de modo que presenten una actividad de ADCC potenciada en comparación con la proteína de unión no modificada como se describe en el presente documento.

60 El sitio de unión de la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención se une a un antígeno asociado con una célula diana. La célula diana puede, por ejemplo, expresar un antígeno asociado al tumor (TAA) y/o un antígeno asociado con enfermedades autoinmunitarias. Los ejemplos de dicho TAA incluyen CD19, CD20, CD10, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38, CD44v6, CD45, CDw52, tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R, (CD115), CD123, CD133, PDGFR- $\alpha$  (CD140a), PDGFR- $\beta$  (CD140b), proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4, proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma), Muc-1, EGFR,

de2-7-EGFR, EGFRVIII, Proteína de bloqueo del folato, Fler2neu, Fler3, PSMA, PSCA, PSA, TAG-72, HLA-DR, IGFR, CD133, IL3R, proteína activadora de fibroblastos (FAP), Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), EpCAM, CDCP1, Derlin1, tenascina, frizzled 1-10, los antígenos vasculares VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), Endogлина, CLEC14, Tem1-8, Tie2, mesotelina, glicoproteína epitelial 2 (EGP2), glicoproteína epitelial 40 (EGP40), antígeno canceroso 72-4 (CA72-4), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13, IL13R $\alpha$ 2, cadena ligera kappa de Ig ( $\kappa$ ), gangliósido de GD3 (GD3), gangliósido de GD2 (GD2), variantes acetiladas de GD2 y GD3, CD171, NCAM, receptor de folato alfa ( $\alpha$ FR), Lewis (Y), receptor de acetilcolina fetal (FAR), homólogo oncogénico vírico de la leucemia eritroblástica aviar 3 (ERBB3), homólogo oncogénico vírico de la leucemia eritroblástica aviar 4 (ERBB4), homólogo oncogénico vírico 2 de la leucemia eritroblástica aviar (ERBB2), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/c-Met), claudina 18.2, claudina 3, claudina 4, claudina 1, claudina 12, claudina 2, claudina 5, claudina 8, claudina 7, claudina 6, CEA unido a la membrana, Robo4 y CD138.

Los antígenos ilustrativos asociados con enfermedades autoinmunitarias incluyen CD20, CD22, CD52 y TNFR, CD19, CD25, CD40. La célula diana puede ser una célula tumoral/cancerosa y/o un linfocito B.

La proteína de fusión de la presente invención también comprende un polipéptido IL-15 mutado, en donde el polipéptido IL-15 comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1. Dicha mutación da lugar a un polipéptido IL-15 que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 (número de Uniprot: P40933-1). El polipéptido IL-15 también puede no unirse en absoluto a IL-15R $\alpha$ . El polipéptido IL-15 se une a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ . En principio, sin embargo, la presente invención contempla cualquier sustitución/eliminación de aminoácidos que dé lugar a un polipéptido IL-15 que tenga una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de la IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.

El término "posición" cuando se usa de acuerdo con la presente invención significa la posición de un aminoácido dentro de una secuencia de aminoácidos representada en el presente documento. El término "correspondiente", como se usa en el presente documento, también incluye que una posición no solo está determinada por el número de aminoácidos anteriores. La posición de un aminoácido dado de acuerdo con la presente invención que puede estar sustituido puede variar debido a eliminaciones o nucleótidos adicionales en otras partes, por ejemplo, el polipéptido IL-15 (mutante o fragmento). De manera similar, la posición de un aminoácido dado de acuerdo con la presente invención que puede estar sustituido puede variar debido a la eliminación o adición de aminoácidos en otras partes de, por ejemplo, el polipéptido IL-15 (mutante, fragmento o tipo silvestre).

De este modo, por una "posición correspondiente", como se usa en la presente invención, se entiende que los aminoácidos pueden diferir en el número indicado pero seguir teniendo aminoácidos vecinos similares. Los aminoácidos que pueden intercambiarse, eliminarse y añadirse también están comprendidos por la expresión "posición correspondiente". Específicamente, El experto puede, al alinear la secuencia de referencia (secuencia objeto), por ejemplo, SEQ ID NO: 1 con una secuencia de aminoácidos de interés (secuencia de consulta), por ejemplo, examinar una secuencia de interés para la secuencia de SEQ ID NO: 4 (o la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica esta proteína, respectivamente) cuando se busca la posición del aminoácido como se especifica en el presente documento (es decir, una posición correspondiente a la posición 93 y/o 112 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1).

Más específicamente, el aminoácido "L" o "E" respectivamente de dicha posición está sujeto a la sustitución. Dicho "L" o "E" se reemplaza luego por otro aminoácido. Por ejemplo, "L" de dicha posición está sustituido por un aminoácido distinto de "L". O, por ejemplo, "E" de dicha posición está sustituido por un aminoácido distinto de "E".

Para determinar si un resto de aminoácido de una secuencia de polipéptido IL-15 dada (mutante, fragmento) corresponde a una cierta posición de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, el experto puede usar medios y métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, alineamientos, ya sea manualmente o mediante el uso de programas informáticos tales como BLAST2.0, que corresponde a Basic Local Alignment Search Tool o ClustalW, o cualquier otro programa adecuado que sea adecuado para generar alineamientos de secuencia.

El polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención puede tener al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con el polipéptido IL-15 como se muestra en SEQ ID NO: 1.

La expresión "identidad de secuencia" o el término "identidad" como se usan en la presente invención significa el porcentaje de restos idénticos por pares, opcionalmente, después del alineamiento (homología) de una secuencia de un polipéptido IL-15 de la invención con una secuencia en cuestión - con respecto al número de restos en la más larga de estas dos secuencias. La identidad se mide dividiendo el número de restos idénticos entre el número total de restos y multiplicando el producto por 100. Por lo general, la identidad de secuencia de una secuencia de polipéptido IL-15 identificada en el presente documento se define como el porcentaje de aminoácidos de una secuencia candidata (secuencia de interés) que son idénticos a los aminoácidos de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO: 1.

La identidad de secuencia puede determinarse tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para

lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible para el público en general, tal como los programas BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Por ejemplo, se puede usar BLAST2.0 (Altschul, *Nucl. Acids Res.* 25 (1997), 3389-3402; Altschul, *J. Mol. Evol.* 36 (1993), 290-300; Altschul, *J. Mol. Biol.* 215 (1990), 403-410; véase también [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)), para buscar los alineamientos de secuencias locales.

El polipéptido IL-15 también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 93, 94, 97, 98, 99, 100, 114 y/o 115 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. El polipéptido IL-15 también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a la/s posición/es 94, 97, 99 y/o 100 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1. El polipéptido IL-15 también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 94, 97 y/o 98 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. El polipéptido IL-15 también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a la/s posición/es 94 y/o 98 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

La sustitución de aminoácidos puede ser cualquier sustitución de aminoácidos que produzca un cambio del aminoácido en esta posición. En una realización, el aminoácido está sustituido con un aminoácido ácido, tal como ácido aspártico, ácido glutámico o un aminoácido básico tal como lisina. La presente invención también prevé que el aminoácido correspondiente a la posición 94 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 esté sustituido con un aminoácido básico. El aminoácido básico puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en arginina, lisina o histidina, preferentemente, lisina.

La presente invención contempla además que la al menos una sustitución de aminoácidos se seleccione del grupo que consiste en L44D, E46K, L47D, V49D, I50D, L66D, L66E, I67D y I67E. La numeración de estas sustituciones de aminoácidos corresponde a las secuencias de polipéptidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 (Figura 5). De este modo, estas sustituciones de aminoácidos corresponden a las sustituciones de aminoácidos L92D, E94K, L95D, V97D, I98D, L114D, L114E, I115D e I115E con respecto a SEQ ID NO: 1, véanse las Tablas 3 y 4 que figuran a continuación.

Tabla 3:

Posición de aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1	Posición correspondiente del aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 en la Fig. 5
L92D	L44D
E94K	E46K
L95D	L47D
V97D	V49D
I98D	I50D

Tabla 3: Posición de aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a diferentes SEQ ID NO.

Tabla 4:

Posición de aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1	Posición correspondiente del aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 en la Fig. 5
L114D	L66D
L114E	L66E
I115D	I67D
I115E	I67E

Tabla 4: Posición de aminoácido de la sustitución de aminoácidos con respecto a diferentes SEQ ID NO.

La al menos una sustitución de aminoácidos también se puede seleccionar del grupo que consiste en E46K, V49D y/o I50D en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 como se representa en la Fig. 5. La al menos una sustitución de aminoácidos también se puede seleccionar del grupo que consiste en E46K y/o I50D en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 como se representa en la Fig. 5. La al menos una sustitución de aminoácidos se puede seleccionar además del grupo que consiste en E46K en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 como se

representa en la Fig. 5.

La al menos una sustitución de aminoácidos también se puede seleccionar del grupo que consiste en E94K, V97D y/o I98D en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La al menos una sustitución de aminoácidos también se puede seleccionar del grupo que consiste en E94K y/o I98D en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La al menos una sustitución de aminoácidos se puede seleccionar además del grupo que consiste en E94K en correspondencia con las posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención puede ser la proteína IL-15 de longitud completa, o cualquier fragmento o mutante de la misma, en donde el fragmento y/o mutante tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1. El fragmento o mutante tiene además la capacidad de unirse a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ .

De este modo, los polipéptidos IL-15, así como sus mutantes o fragmentos, tienen dos funciones; por un lado, se unen a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  y, por otro lado (y al mismo tiempo), tienen una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.

Un fragmento de polipéptido IL-15 puede ser cualquier fragmento del polipéptido IL-15 que se una a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  y, por otro lado (y al mismo tiempo), que tenga una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1. El fragmento puede comprender menos aminoácidos que el polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención. Dicho fragmento también puede incluir eliminaciones de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 1. El fragmento de polipéptido IL-15 puede tener una longitud de menos de 162 aminoácidos, por ejemplo, una longitud de menos de 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100 o incluso menos de 50 aminoácidos. Un fragmento ilustrativo puede ser el polipéptido IL-15, que consiste en o comprende al menos la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 60, 61, 62, 63 y/o 64 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4. Dicho fragmento de IL-15, puede, por supuesto, incluir las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento con respecto a SEQ ID NO: 1, 2 o 3 (correspondientes a las respectivas posiciones de secuencia de SEQ ID NO: 4). Un fragmento de polipéptido IL-15 también puede comprender al menos los aminoácidos importantes para la unión al receptor  $\beta\gamma$  de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, un fragmento de polipéptido IL-15 puede tener una secuencia de aminoácidos que incluya las posiciones de aminoácidos 55, 56, 58, 59, 116, 117, 156, 157, 160 de SEQ ID NO: 1.

Un mutante del polipéptido IL-15 puede comprender sustituciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto al polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención. Por lo tanto, los polipéptidos IL-15 pueden tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con el polipéptido IL-15 como se muestra en SEQ ID NO: 1.

En general, el término "afinidad" significa la fuerza de interacción entre un epítipo y un sitio de unión a proteínas de unión. Los expertos en la materia conocen bien los métodos de determinación de la afinidad de una proteína de unión/polipéptido IL-15 dado. La afinidad de unión de un polipéptido IL-15 mutante puede medirse mediante una multitud de métodos tales como la titulación de fluorescencia, ELISA de competición o resonancia de plasmón superficial (BIAcore™). Un polipéptido IL-15 que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  tiene una menor afinidad por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 por IL-15R $\alpha$ . La presente invención también prevé que el polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención tenga una afinidad por IL-15R $\alpha$  que sea un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % inferior a la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 por IL-15R $\alpha$ .

Para las proteínas de unión y los polipéptidos IL-15 descritos en el presente documento, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es superior a  $10^{-7}$  M. En particular, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de aproximadamente  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$  M ( $K_D$ ), o de aproximadamente  $10^{-9}$  a  $10^{-11}$  M o incluso superior. De este modo, las proteínas de unión con una afinidad del primer sitio de unión y/o el segundo sitio de unión y los polipéptidos IL-15 en el intervalo picomolar (con una  $K_D$  de  $10^{-12}$  M) también se incluyen en la presente invención.

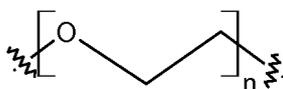
La presente invención también prevé que IL-2/IL-15R $\beta\gamma$  puede ser expresado por una célula efectora que se base en los usos farmacéuticos de la invención. Esto significa que la célula efectora puede expresar IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ . Las células efectoras ilustrativas incluyen un linfocito NK o un linfocito T, tal como un linfocito T CD8+, un linfocito T gamma delta o un linfocito T NK. Una célula efectora también puede ser un linfocito T CD8+ o un linfocito NK.

La proteína de unión y el polipéptido IL-15 de la proteína de fusión de la presente invención pueden comprender además un enlazador. Esto también significa que puede no haber un enlazador presente y que el polipéptido IL-15 puede estar conectado directamente a la proteína de unión. Sin embargo, también puede estar presente un enlazador para conectar la proteína de unión con el polipéptido IL-15.

En este último caso, en principio, el enlazador puede unirse a la proteína de unión y al polipéptido IL-15, normalmente, entre el extremo C de una parte de la proteína de fusión y el extremo N de la otra parte. Los enlazadores adecuados

son conocidos en la técnica y, por ejemplo, se describen en Chen *et al.* (2013) "Fusion protein linkers: property, design and functionality" *Adv Drug Deliv Rev*; 65(10):1357-69. Por lo tanto, el enlazador puede ser cualquier enlazador conocido en la técnica.

- 5 El enlazador puede, por ejemplo, ser una fracción basada en hidrocarburos lineales o ramificados que esté acoplada a ambas parejas a través de grupos laterales de cadena activados tales como grupos amino, tiol o hidroxilo. El enlazador también puede comprender fracciones cíclicas. Si la fracción enlazadora es una fracción basada en hidrocarburos, la cadena principal del enlazador puede comprender solo átomos de carbono, pero también puede contener heteroátomos tales como oxígeno (O), nitrógeno (N) o azufre (S). El enlazador puede incluir, por ejemplo,
- 10 una cadena de átomos de carbono C1-C20 o una cadena basada en poliéter tal como una cadena basada en polietilenglicol con unidades de repetición  $-(O-CH_2-CH_2)$ . En realizaciones típicas de enlazadores basados en hidrocarburos, la fracción enlazadora puede comprender de 1 a aproximadamente 150, 1 a aproximadamente 100, 1 a aproximadamente 75, 1 a aproximadamente 50, o 1 a aproximadamente 40, o 1 a aproximadamente 30, o 1 a aproximadamente 20, incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 átomos de la cadena principal. Por ejemplo, el enlazador puede comprender:



- 20 en donde n es un número entero de 0 a 20, o de 1 a 10, o de 1 a 5, o en donde n es 3. De este modo, por ejemplo, n puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

- Sin embargo, el enlazador también puede ser un enlazador peptídico de cualquier longitud adecuada siempre que el enlazador no interfiera con la función de una o ambas partes de la proteína de fusión. El enlazador puede comprender dos o más, cinco o más, 10 o más, 15 o más, o 20 o más restos de aminoácidos. El enlazador peptídico puede comprender cualquier resto de aminoácido. En una realización, el enlazador peptídico puede ser rico en aminoácidos pequeños o polares tales como Gly y Ser, pero puede contener aminoácidos adicionales tales como Thr y Ala para mantener la flexibilidad, así como aminoácidos polares tales como Lys y Glu para mejorar la solubilidad. Los enlazadores flexibles ilustrativos incluyen  $(GGGGS)_n$ , en donde n puede ser un número entre 1-7 (SEQ ID NO: 13), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 14) y EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 15),  $(Gly)_8$  (SEQ ID NO: 16), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 17),  $(Gly)_6$  (SEQ ID NO: 18).

- Los enlazadores rígidos ilustrativos incluyen  $A(EAAAK)_nA$ , en donde n puede ser un número entre 1-7 (SEQ ID NO: 19),  $(XP)_n$  en donde n puede ser un número entre 1-13, designando X cualquier aminoácido, preferentemente, Ala, Lys o Glu,  $(Ala-Pro)_7$  (SEQ ID NO: 20), o péptidos de 33 restos que contienen -Glu-Pro- o -Lys-Pro- de repetición. Los enlazadores escindibles *in vivo* ilustrativos incluyen, por ejemplo, LEAGCKNFFRSFTSCGSLE (SEQ ID NO: 21), G-S-S-T (SEQ ID NO: 22), CRRRRRREAEAC (SEQ ID NO: 23).

- En una realización, la proteína de fusión de la presente invención comprende un enlazador, que comprende glicina y serina. El enlazador puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ((4-glicina 1-serina)<sub>4</sub>; SEQ ID NO: 24). Es posible que, ya sea N-terminal y/o C-terminalmente, que el enlazador "glicina-serina" contenga aminoácidos adicionales que estén dispuestos entre el polipéptido IL-15 y/o la proteína de unión. Estos aminoácidos adicionales pueden, por ejemplo, estar presente debido a la estrategia de clonación que se usa para generar la proteína de fusión de la invención. En uno de esos ejemplos ilustrativos, un enlazador de "glicina-serina" tal como un enlazador  $(GGGGS)_4$  puede tener una serina N-terminal adicional (véase, por ejemplo, la proteína de fusión mostrada en la Fig. 6).

- Sin embargo, el enlazador no se unirá al sitio de unión real ni a los sitios de unión de la proteína de unión y del polipéptido IL-15. Por ejemplo, el/los enlazador/es normalmente no se unirán a las regiones CDR3 de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

- Para una proteína de unión basada en anticuerpos, el/los enlazadores puede/n, por ejemplo, estar unido/s a la parte Fab a la parte Fc de la molécula de anticuerpo (proteína de unión). Más en particular, el/los enlazador/es puede/n estar unido/s al dominio CH3, CH2 o CH1 de la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención. De este modo, el/los enlazador/es también se puede/n adjuntar a la región, que es más externa en una proteína de unión. Esto significa que, por ejemplo, el/los enlazador/es se pueden unir al dominio CH2 en, por ejemplo, proteínas de unión con CH3 eliminado, o al OH 1 en proteínas de unión con CH2/CH3 eliminado. La presente invención también prevé que dos enlazadores estén unidos a dos regiones CH3 de una proteína de unión tal como un anticuerpo, para que cada dominio CH3 tenga un enlazador adjunto. Sin embargo, el enlazador también puede estar unido a solo una región CH3 de una proteína de unión dada. En una realización, el polipéptido IL-15 está unido al dominio CH3 de la proteína de unión a través del enlazador.

Sin embargo, también puede ser, por ejemplo, en el caso de las proteínas de unión que consisten en las cadenas  $V_H$

y  $V_L$  de un anticuerpo que el/los enlazador/es esté/n unido/s a la región bisagra que conecta las dos cadenas. En el caso de las proteínas de unión biespecíficas tales como, por ejemplo, construcciones de BiTE como Blinatumomab, el/los enlazador/es también se puede/n unir al enlazador que conecta los dos sitios de unión diferentes.

5 Como se señala en el presente documento, normalmente los enlazadores se unen al dominio Fc de proteínas de unión como se describe en el presente documento. De forma destacable, también es posible fusionar un dominio CH1, CH2 y/o CH3 a una proteína de unión que normalmente no comprende dichos dominios. Por ejemplo, esto se puede realizar para la molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo como se describe en el presente documento o con inmunorreceptores o sus ligandos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, dichos dominios CH1, CH2 y/o CH3 pueden fusionarse con una molécula de lipocalina a través de, por ejemplo, la clonación de estos dominios a la secuencia que codifica la molécula de unión proteica. En dichos casos, también se puede unir un enlazador o más de un enlazador a estos dominios CH1, CH2 y/o CH3.

15 En una realización ilustrativa, la proteína de fusión de la presente invención puede unirse a la endoglina (CD105) como antígeno y, por lo tanto, puede comprender una proteína de unión que se una a la endoglina. La proteína de unión puede, por ejemplo, ser una molécula de anticuerpo o una muteína de lipocalina. La endoglina es una proteína que se sobreexpresa en las células endoteliales y que es esencial para la angiogénesis, por lo tanto, es una proteína importante para el crecimiento tumoral, la supervivencia y la metástasis de células cancerosas a otros lugares del cuerpo. La endoglina se expresa selectivamente a alta densidad en células endoteliales angiogénicas y se regula al alza por hipoxia mediante la inducción del factor inducible por hipoxia 1-a (HIF-1-a). La expresión de endoglina también se regula al alza en las células endoteliales tumorales después de la inhibición de la vía VEGF. En los pacientes con tumores sólidos, la alta densidad de microvasos tumorales, según lo evaluado por la inmunohistoquímica de la endoglina, se ha correlacionado con un mal pronóstico. Un anticuerpo de unión a endoglina ilustrativo que se puede usar en la proteína de fusión de la invención es K-ro23, que se ha descrito en Schwartz, K., Tesis doctoral, 2013, Eberhard Karls University, Tubingen, Alemania, "Generierung, präklinische Charakterisierung und Optimierung monoklonaler Antikörper zur anti-angiogenetischen Therapie solider Tumoren". Otro ejemplo de anticuerpo de unión a endoglina que puede usarse en la proteína de fusión de la invención es el anticuerpo denominado TRC05, cuyos dominios variables se describen en Seon *et al.*, (2011), "Endoglin targeted cancer therapy", *Curr Drug Deliv*, 8(1):135-143. El anticuerpo TRC105 se está estudiando actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de múltiples tipos de tumores sólidos, con ensayos clínicos de fase 1 y fase 2 que se están completando. Por consiguiente, una proteína de fusión de la presente invención puede comprender preferentemente el sitio de unión de los anticuerpos K-ro23 o TRC105. Este sitio de unión de anticuerpos puede comprender o preferentemente consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, preferentemente al menos un 98 %, preferentemente al menos un 99 % y preferentemente un 100 % con SEQ ID NO. 27. Dicha proteína de fusión puede unirse además, preferentemente unirse covalentemente a una cadena ligera de IgG que comprende o preferentemente que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, preferentemente al menos un 98 %, preferentemente al menos un 99 % y preferentemente un 100 % con SEQ ID NO. 28.

Otra pareja de unión preferida para el sitio de unión comprendido en las proteínas de fusión de la invención es la fibronectina, preferentemente, el dominio B adicional de fibronectina. El dominio B adicional que contiene fibronectina (EDB-FN) es una glicoproteína de alto peso molecular que media la adhesión y la migración celular. La expresión de EDB-FN está asociada con una serie de procesos biológicos relacionados con el cáncer, tales como la tumorigénesis, la angiogénesis y la transición epitelial a mesenquimal (EMT). Una realización preferida de la proteína de fusión de la invención puede comprender además una molécula de anticuerpo que se une específicamente a la fibronectina, preferentemente el dominio B adicional de fibronectina, y una IL-15 mutante descrita en el presente documento. En otra realización preferida, la pareja de unión puede ser una muteína de lipocalina descrita en la solicitud de patente internacional WO2011/069992 que se une al dominio B adicional de fibronectina.

Una pareja de unión preferida adicional para el sitio de unión comprendido en las proteínas de fusión de la invención es la tenascina, preferentemente distintas isoformas de tenascina C. La tenascina C (TN-C) es una glicoproteína que, en los seres humanos, está codificada por el gen TNC. Está implicada en distintos tipos de cáncer diferentes, tales como los osteosarcomas, condrosarcomas, cáncer de vejiga y glioblastomas. En las células de glioblastoma, la expresión de tenascina C tiene mucha importancia clínica y funcional en términos de pronóstico del cáncer y progresión tumoral. Una realización preferida de la proteína de fusión de la invención puede comprender una molécula de anticuerpo que se una específicamente a la tenascina, preferentemente la a tenascina c, y una IL-15 mutante descrita en el presente documento.

Otras parejas de unión preferidas comprendidas en las proteínas de fusión de la invención son antígenos de carbohidrato, tales como gangliósidos GD2 y GD3 y variantes acetiladas de los mismos. Dichos antígenos se expresan en la superficie celular de la mayoría de los cánceres, y su expresión en el tejido normal suele ser limitada. Los anticuerpos GD2, así como las inmunocitocinas derivadas de los mismos, se han usado con éxito para el tratamiento de niños con neuroblastoma (véase, por ejemplo, Navid *et al.*, "Immune Therapies for Neuroblastoma", *Cancer Biol Ther*. Mayo de 2009; 8(10): 874-882, que presenta los resultados de ensayos clínicos para anticuerpos anti-GD2 tales

como el anticuerpo monoclonal murino anti-GD2 3F8 o el anticuerpo quimérico Ch14.18 y la inmunocitocina ch14.18-IL-2, en la que la parte Fab del anticuerpo 14.18 estaba enlazada a la IL-2.

La presente invención también se refiere a la proteína de fusión de la presente invención para su uso en la activación restringida a las células diana de células efectoras que expresan IL2/IL-15R $\beta$ . La expresión "activación restringida a células diana de células efectoras" significa que las células efectoras que expresan IL2/IL-15R $\beta$  se activan en presencia de células diana. Esto se consigue mediante las proteínas de fusión de la presente invención. Por un lado, la proteína de fusión de la presente invención comprende un polipéptido IL-15 como se describe en el presente documento, que se une a las células efectoras que expresan IL2/IL-15R $\beta$ . Además, la proteína de fusión de la presente invención comprende una proteína de unión, que comprende al menos un sitio de unión, que se une a un antígeno asociado con una célula diana. De este modo, sin quedar ligados a la teoría, al acercarse la célula efectora y la célula diana entre sí, la célula efectora puede mediar su función tal como la destrucción de la célula diana de una manera específica de la célula diana. De este modo, la presente invención también se refiere a la proteína de fusión de la presente invención para su uso en la destrucción de células diana restringida a células diana mediada por células efectoras que expresan IL-2/IL-15R $\beta$ . Por ejemplo, la proteína de fusión de la presente invención se puede usar para potenciar la actividad citolítica de los linfocitos NK y los linfocitos T, preferentemente, los linfocitos NK, linfocitos T gamma delta, los linfocitos T NK y los linfocitos T CD8+ en comparación con la actividad citolítica de una proteína de fusión que comprende una proteína de unión no modificada que no tiene una actividad ADCC potenciada como se define en el presente documento.

La presente invención también se refiere a la proteína de fusión de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. Este tratamiento puede ser cualquier tratamiento que se base en el acoplamiento de las células efectoras. Asimismo, esta expresión significa cualquier terapia dirigida a antígenos específicos asociados a células diana que implique el acoplamiento de las células efectoras. Por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad puede ser el tratamiento de una enfermedad proliferativa o de una enfermedad autoinmunitaria.

Los ejemplos de enfermedades proliferativas incluyen cáncer suprarrenal, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, tumores de cerebro y de médula espinal, cáncer de mama, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI), enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, leucemia, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer microcítico de pulmón, tumor carcinomate pulmonar, linfoma, linfoma de piel, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores de la pituitaria, cáncer de próstata, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomioma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de células basales y escamosas, melanoma, cáncer de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom o tumor de Wilms. La enfermedad proliferativa también puede ser leucemia o linfoma.

Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Goodpasture, sarcoidosis, esclerodermia, artritis reumatoide, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerodermia, dermatomiositis, psoriasis, vitiligo, alopecia areata, diabetes mellitus tipo 1, pancreatitis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, esclerosis múltiple, miastenia grave, poliarteritis nodosa, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia perniciosa, enfermedades gastrointestinales, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis autoinmunitaria o cirrosis biliar primaria.

Con la proteína de fusión de la presente invención, se pretende reducir, en general, los efectos secundarios observados tras la aplicación de IL-15 a pacientes humanos (Conlon et al. (2015) "Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer". *J Clin Oncol*. 33(1):74-82). Especialmente, estos "efectos secundarios" son efectos secundarios negativos, que no son beneficiosos para los pacientes. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que dichos efectos secundarios negativos se deben a la activación de células efectoras inespecíficas (es decir, no específicas de la célula diana). De este modo, dado que las proteínas de fusión de la presente invención proporcionan una activación restringida a las células diana de células efectoras, estos efectos secundarios se pueden reducir o incluso disminuir.

Por lo tanto, una "activación inespecífica de células efectoras" o una "activación fuera de la diana" de las células efectoras podría ser cualquier activación de células efectoras que no esté relacionada con la unión de la proteína de unión como se describe en el presente documento a un antígeno asociado con una célula diana. Por ejemplo, una activación de la célula efectora fuera de la diana podría ser, por lo tanto, una activación de la célula efectora independiente de la célula diana. En una realización, la activación inespecífica de células efectoras comprende la

activación de células efectoras en ausencia de células diana.

Los ejemplos ilustrativos de efectos secundarios incluyen reacción a la infusión, temperatura elevada/fiebre, disnea, problemas del sistema circulatorio, inmunogenicidad, reacciones hipersensibles, inmunosupresión, infecciones, anemia, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia, trombopenia, pancitopenia, citopenia, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, lisis tumoral, síndrome de liberación de citocinas, trastornos de la tiroides, cardiotoxicidad, reacción local de la piel, alto nivel de transaminasas hepáticas, hipotensión, enfermedad del suero, reacciones mucocutáneas, reactivación de la hepatitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), toxicidad renal y arritmias cardíacas.

La proteína de fusión de la presente invención también se puede usar para aumentar la dosis de la proteína de fusión administrada en comparación con la dosis usada para una proteína de fusión que comprende la proteína de unión de la proteína de fusión de la presente invención y un polipéptido IL-15 que no comprenda al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

La razón subyacente a dicha aplicación es nuevamente el modo de acción restringido a la célula diana de las proteínas de fusión de la invención. Cuanto más restringida es la actividad de una molécula de fusión a la célula diana, menores son los efectos secundarios esperados, y por lo tanto, más alta puede ser la dosis aplicable. De este modo, la proteína de fusión de la presente invención se puede usar en el tratamiento de manera que la dosis de la proteína de fusión administrada de la presente invención se aumente en comparación con la dosis usada para las proteínas de fusión que comprenden la proteína de unión descrita en el presente documento y el polipéptido IL-15 de tipo silvestre (por ejemplo, de SEQ ID NO: 1).

Una "dosis" de la proteína de fusión de la presente invención aplicada puede variar dentro de amplios límites para lograr el efecto preventivo o la respuesta terapéutica que se deseen. Dependerá, por ejemplo, de la afinidad de una proteína de unión por una diana seleccionada, así como de la semivida del complejo entre una proteína de unión/polipéptido IL-15 y el antígeno diana *in vivo*. Además, la dosis óptima dependerá de la biodistribución de la proteína de fusión de la presente invención, del modo de administración, de la gravedad de la enfermedad/trastorno que se esté tratando, así como del estado médico del sujeto/paciente. Por ejemplo, cuando se usa en una pomada para aplicaciones tópicas, se puede usar una alta concentración de la proteína de fusión de la invención.

Se puede usar cualquier dosis adecuada de la proteína de fusión de la presente invención. Es competencia del experto medio en la materia, por ejemplo, determinar empíricamente una dosis adecuada de la proteína de fusión de la presente invención. En realizaciones ilustrativas, la proteína de fusión se puede usar a una dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg de peso corporal del paciente, de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal, de hasta 20 mg/kg o incluso una dosis superior. La dosis también puede ser como máximo de 20 mg/m<sup>2</sup>/día, 15 mg/m<sup>2</sup>/día, 10 mg/m<sup>2</sup>/día, 7,5 mg/m<sup>2</sup>/día, 6 mg/m<sup>2</sup>/día, 4 mg/m<sup>2</sup>/día o inferior.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la presente invención y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, la proteína de fusión de la presente invención puede formularse en composiciones usando ingredientes farmacéuticamente aceptables, así como métodos de preparación establecidos (Gennaro, A. L. y Gennaro, A. R. (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20<sup>a</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Para preparar las composiciones farmacéuticas, se pueden usar excipientes inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente inertes. Para preparar, por ejemplo, píldoras, polvos, cápsulas de gelatina o supositorios, por ejemplo, lactosa, talco, ácido esteárico y sus sales, grasas, ceras, polioles sólidos o líquidos, se pueden usar aceites naturales y endurecidos. Los excipientes adecuados para la producción de soluciones, suspensiones, emulsiones, mezclas de aerosoles o polvos para su reconstitución en soluciones o mezclas de aerosoles antes de su uso incluyen agua, alcoholes, glicerol, polioles y mezclas adecuadas de los mismos, así como aceites vegetales.

La composición farmacéutica también puede contener aditivos, tales como, por ejemplo, cargas, aglutinantes, agentes humectantes, emolientes, estabilizantes, conservantes, emulsionantes y, además, disolventes o solubilizantes, o agentes para lograr un efecto de depósito. Estos últimos suponen que las proteínas de fusión pueden incorporarse a sistemas de liberación lenta o sostenida, o de administración dirigida, tales como liposomas y microcápsulas.

Las formulaciones pueden esterilizarse mediante numerosos medios, incluyendo la filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio estéril justo antes de su uso. Existen numerosas aplicaciones posibles para la proteína de fusión de la presente invención en medicina.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención. La molécula de ácido nucleico puede ser ADN o ARN, y puede ser de origen genómico o sintético, pudiendo ser monocatenaria o bicatenaria. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ARNm, ARNc, ARN sintético, ADN genómico, ADN sintético de ADNc, un copolímero de ADN y ARN, oligonucleótidos. Un ácido nucleico respectivo

puede contener además análogos de nucleótidos no naturales y/o estar unido a un marcador de afinidad o a otro marcador, que también puede comprender la proteína de fusión. Dicho marcador de afinidad puede ser un marcador de His, marcador flag, marcador de strep, marcador de HA, marcador de calmodulina o marcador de GFP. La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede estar comprendida, por ejemplo, en un vector. La presente divulgación también se refiere a una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención o el vector como se describe en el presente documento.

La presente invención también se refiere a un método de producción de la proteína de fusión de la presente invención, que comprende usar el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para la expresión de la proteína de fusión en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión. En una realización, la proteína de fusión es expresada por una célula hospedadora o en un sistema libre de células.

La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de la presente invención a un sujeto. La enfermedad puede ser, por ejemplo, una enfermedad proliferativa o autoinmunitaria como se describe en el presente documento.

El término "administración" significa administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión a un sujeto. El término "administrar" también se refiere a un método de incorporación de la proteína de fusión a los tejidos de un organismo. Son posibles diferentes vías de administración. La proteína de fusión o la composición farmacéutica de la presente invención pueden, por ejemplo, administrarse a través de diferentes formas, tal como por cualquier vía parenteral o no parenteral (enteral o tópica) que sea terapéuticamente eficaz para fármacos (preferentemente proteicos). Los métodos de aplicación parenteral incluyen, por ejemplo, técnicas de inyección o infusión subcutánea, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular, intratecal, intranasal, intra-atrial, intraperitoneal o intravenosa, por ejemplo, en forma de soluciones inyectables, soluciones de infusión o tinturas. Los modos de administración no parenteral son, por ejemplo, modos de administración enteral tales como la administración oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, cápsulas, soluciones o suspensiones, o por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios. Sin embargo, se prefiere la administración no oral. Las vías de aplicación tópica incluyen aplicaciones epicutáneas o por inhalación. Se puede encontrar una visión general sobre la administración de fármacos pulmonares, es decir, ya sea por inhalación de aerosoles (que también se pueden usar en la administración intranasal) o por instilación intratraqueal en Patton *et al.* (2004) por ejemplo (J. S. Patton *et al.* "The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery". *Proc. Amer. Thoracic Soc.* 2004 Vol. 1 páginas 338-344). En general, las proteínas de fusión y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en formulaciones que contengan excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, aditivos y vehículos según lo deseado y descrito en el presente documento.

De forma destacable, el término "terapéutico" o la expresión "efecto terapéutico" se refiere a la inhibición o activación de factores que causan o contribuyen a un estado anómalo. Por ejemplo, un efecto terapéutico puede ser la destrucción de las células diana mediada por las células efectoras. De este modo, se puede medir dicho efecto terapéutico midiendo una disminución en, por ejemplo, el tamaño del tumor o la disminución de la cantidad de linfocitos B en un sujeto que recibió la proteína de fusión o la composición farmacéutica de la presente invención en comparación con el sujeto antes de la aplicación de la proteína de fusión o la composición farmacéutica de la presente invención.

Las proteínas de fusión o las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden usar en el tratamiento junto con otras terapias. Dicho tratamiento conjunto puede incluir la administración de las proteínas de fusión o composiciones farmacéuticas de la presente invención, preferentemente en forma de un medicamento, a un sujeto que padezca una enfermedad, tal como una enfermedad proliferativa o autoinmunitaria, y la administración de otro medicamento/fármaco. Los ejemplos de dichos fármacos adicionales son los fármacos usados en quimioterapia, radioterapia, inhibidores de la angiogénesis o vacunas contra el cáncer. Otros ejemplos de dichos fármacos adicionales son los suplementos para la tiroides, vitaminas tales como B12 o inyecciones de insulina, inmunosupresores, tales como el cortisol, natalizumab o Infiximab.

Las proteínas de fusión o composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden aplicar a un sujeto. El término "sujeto" también puede significar ser humano o animal. El sujeto también puede ser un sujeto que padezca cáncer o una enfermedad autoinmunitaria. El sujeto puede ser un vertebrado, más preferentemente, un mamífero. Los mamíferos incluyen animales de granja, animales para el deporte, mascotas, primates, ratones y ratas. Preferentemente, un mamífero es un ser humano, un perro, un gato, una vaca, un cerdo, un ratón, una rata, prefiriéndose en particular un ser humano. De este modo, en una realización, el sujeto es un vertebrado, preferentemente un ser humano.

La presente divulgación también se refiere a un uso de la proteína de fusión de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto que tenga una enfermedad.

La presente divulgación también se refiere a un kit que comprenda la proteína de fusión de la presente invención. Dicho kit puede comprender además

- a) uno o más tampones;
- b) uno o más protocolos.

Los tampones adecuados incluyen tampones en los que pueden almacenarse las proteínas de fusión o composiciones farmacéuticas de la presente invención o en los que pueden administrarse directamente al sujeto. En este último caso, dicho tampón es tampón fisiológicamente aceptable, no tóxico.

La presente divulgación también se refiere a un método de reducción de la activación inespecífica de células diana en terapia, comprendiendo la terapia la administración a un sujeto de una proteína de fusión de la presente invención.

Además, la presente divulgación se refiere a un método de reducción de un efecto secundario en la terapia, comprendiendo la terapia la administración a un sujeto de una proteína de fusión de la presente invención. Los ejemplos ilustrativos de un efecto secundario incluyen al menos uno de entre reacción a la infusión, temperatura elevada/ fiebre, disnea, problemas del sistema circulatorio, inmunogenicidad, reacciones hipersensibles, inmunosupresión, infecciones, anemia, leucopenia, trombopenia, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca, lisis tumoral, síndrome de liberación de citocinas, trastornos de la tiroides, cardiotoxicidad, reacción local de la piel, trastornos de la tiroides, alto nivel de transaminasas hepáticas, hipotensión, enfermedad del suero, reacciones mucocutáneas, reactivación de la hepatitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), toxicidad renal o arritmias cardíacas.

La presente divulgación también se refiere a un método de aumento de la dosis de una proteína de fusión en terapia, comprendiendo la terapia la administración a un sujeto de una proteína de fusión de la presente invención.

La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplo 1: Generación de proteínas de fusión**

La construcción de anticuerpos con modificación SDIE optimizados para Fc se describen en Hofmann *et al.* (2012) "Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia" *Leukemia* 26:1228-1237. Se obtuvo un plásmido que contenía la secuencia de IL-15 humana del equipo DKFZ Genomics and Proteomics Core (vector: pENTR221, Número de acceso del GeneBank de hIL-15: DQ893709, también representado en SEQ ID NO: 1). De forma destacable, los primeros 48 aminoácidos de esta secuencia comprenden el péptido señal de 48 aminoácidos de longitud, que se escinde durante la secreción de hIL-15 y no forma parte de las proteínas de fusión de IL-15. Se añadieron sitios de restricción de BspEI y SpeI mediante PCR en el extremo 5' y 3' de la secuencia de IL-15 que luego se clonó en el vector como pJet1.2. En una primera etapa, se eliminó el sitio de restricción de BspEI dentro de la secuencia de IL-15 mediante PCR de mutagénesis. En una segunda etapa, se generaron los 3 polipéptidos IL-15 diferentes mediante PCR de mutagénesis (E46K, V49D e I50D: estas mutaciones corresponden a las sustituciones de aminoácidos E94K, V97D e I98D con respecto a SEQ ID NO: 1, véase también la Tabla 3 que se describe en el presente documento). Los cuatro polipéptidos IL-15 diferentes se introdujeron a través de los sitios de restricción de BspEI y SpeI en un vector de expresión que contenía el dominio variable para 4G7 (anti-CD19/ $\alpha$ CD19) y la región constante de IgG1 humana optimizada para Fc, es decir, el dominio constante portaba los intercambios de aminoácidos S239D e I332E (numeración de la UE). En estas construcciones, la hIL-15 está directamente unida al dominio CH3 a través de glicina-serina (enlazador corto) (Figura 1).

Las construcciones PSMA-IL-15wt y PSMA-IL-15-E46K se generaron, por consiguiente, con un vector de expresión que contenía la secuencia para J591 (anti-PSMA). Las construcciones con el enlazador largo se generaron de la siguiente manera: se sintetizaron una secuencia codificante del enlazador de 20 aminoácidos de longitud (4-glicina 1-serina)<sub>4</sub> más los 39 primeros nucleótidos de la secuencia de IL-15 como fragmentos de ADN (que contenían sitios de restricción de BspEI 5' y BglII 3') en Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania. La secuencia de IL-15 contiene un sitio de restricción de BglII en la posición de nucleótido 39, por tanto, se ligó el enlazador (4G-1S)<sub>4</sub> a los diferentes vectores de expresión que contenían IL-15 a través de BspEI y BglII. Asimismo, las construcciones de endoglina-IL-15wt y endoglina-IL-15-E46K se generaron por consiguiente usando un vector de expresión que contenían la secuencia para K-ro23 (anticuerpo anti-endoglina quimérico).

Todos los plásmidos de cadena pesada se transfectaron junto con vectores de cadena ligera apropiados en células SP2/0. Los clones productores de anticuerpos individuales se expandieron y los anticuerpos se purificaron del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

#### **Ejemplo 2: Unión a IL-15R $\alpha$**

Se incubaron células NALM16 positivas en CD19 con diferentes concentraciones de distintas proteínas de fusión, teñidas con una proteína de fusión IL-15R- $\alpha$ -Fc marcada con His, recombinante (R&D systems), un anticuerpo anti-His marcado con biotina (Qiagen) y, finalmente, un conjugado de estreptavidina PE (Life technologies). Las células se analizaron mediante citometría de flujo (BD FACS Calibur). Para seleccionar las proteínas de fusión más adecuadas, se incubaron células NALM16 positivas en CD19 con las concentraciones indicadas de distintas proteínas de fusión (en el eje y de la Figura 2 A y B).

La proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15wt comprendía un anticuerpo 4G7 (anticuerpo anti-CD19) con una región constante de IgG1 humana optimizada para Fc (mutación SDIE como se describe anteriormente) fusionada con IL-15 humana de tipo silvestre, estando la hIL-15 directamente unida al dominio CH3 a través de glicina-serina (enlazador corto).  
 5 Esta proteína de fusión sirvió como control. Otras proteínas de fusión probadas, denominadas  $\alpha$ CD19-IL15-E46K (4G7-IL15-E46K),  $\alpha$ CD19-IL15-V49D (4G7-IL15-V49D) o  $\alpha$ CD19-IL15-I50D (4G7-IL15-I50D) comprendían el anticuerpo 4G7, con una región constante de IgG1 humana optimizada para Fc (SDIE). El polipéptido IL-15 comprendía la sustitución de aminoácidos indicada, respectivamente. Estas sustituciones de aminoácidos corresponden a la numeración de SEQ ID NO: 2 (mostrada en la Fig. 5). En todas estas proteínas de fusión, la hIL-15 está directamente  
 10 unida al dominio CH3 a través de la glicina-serina (enlazador corto).

Dado que la proteína de unión a CD19 (en el presente documento, el anticuerpo 4G7) se dirige contra CD19, se unirá a las células NALM16 en este ensayo. Para saber si los polipéptidos IL-15 de las proteínas de fusión seguían conservando su capacidad para unirse a IL-15R $\alpha$ , se añadió a los cultivos una proteína de fusión IL-15R $\alpha$ -Fc marcada con His (R&D systems). De este modo, si el polipéptido IL-15 de las proteínas de fusión seguía conservando su capacidad para unirse a IL-15R $\alpha$ , la proteína de fusión IL-15R $\alpha$ -Fc marcada con His añadida permanecería unida a través de la proteína de fusión a las células NALM 16. De este modo, tras la adición de un anticuerpo anti-His marcado con biotina (Qiagen) y un conjugado de estreptavidina PE (Life technologies) se generará una señal detectable. Esta señal se midió mediante la intensidad de fluorescencia media (IFM; eje y de la Fig. 2A).  
 15  
 20

La Figura 2 A muestra que la IFM detectada para la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-wt (4G7-IL-15-wt) es una IFM de aproximadamente 300. Dado que IL-15 se une normalmente a ILR-15 $\alpha$ , esta señal proporciona evidencia de una unión de IL-15 a ILR-15 $\alpha$ . La proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-V49D (4G7-IL15-V49D) no tuvo un rendimiento tan destacado como el control, lo que indica que esta proteína de fusión se unió a ILR-15 $\alpha$  con una proteína de fusión ligeramente reducida en comparación con la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL-15-wt. Por el contrario, las proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-E46K y  $\alpha$ CD19-IL15-I50D mostraron una señal de IFM de aproximadamente 150, lo que indica que la unión a ILR-15 $\alpha$  está muy disminuida (o incluso ausente) en comparación con la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL-15-wt. De este modo, dos de los tres polipéptidos IL-15 evaluados, E46K y I50D, tuvieron una disminución/fueron desprovistos de la unión a IL-15R $\alpha$  al usarse dentro de una proteína de fusión de la presente invención (Figura 2A).  
 25  
 30

### Ejemplo 3: Actividad citolítica de diferentes proteínas de fusión que contienen diferentes polipéptidos IL-15

En el siguiente experimento, se analizó la actividad citolítica de las proteínas de fusión analizadas en el Ejemplo 2. Para realizar esto, se incubaron células NALM16 con las proteínas de fusión respectivas. Además, se añadieron a este cultivo las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un voluntario sano. Por lo general, dichas células PBMC comprenden linfocitos, monocitos y macrófagos. Algunos de los linfocitos tales como, por ejemplo, linfocitos NK, linfocitos T CD8+ o linfocitos T NK expresan la cadena  $\beta$  y  $\gamma$  común del receptor IL-2/IL-15 al que se puede unir IL-15 (además de la cadena  $\alpha$  de IL-15). De este modo, tras la unión de las proteínas de fusión tanto a las células NALM16 a través de la proteína de unión a  $\alpha$ CD19 (4G7) como a la célula positiva en  $\beta\gamma$  a través del polipéptido IL-15, puede destruirse la célula diana NALM16 (que expresa CD19).  
 35  
 40

Para analizar esta actividad citolítica, se evaluó la proliferación de las células diana NALM16 usando un ensayo de absorción de  $^3$ H-timidina tras 2 días. En este sentido, la proliferación en ausencia de proteínas de fusión y PBMC se definió como una proliferación del 100 %, lo que significa el 0 % de inhibición de la proliferación. De este modo, cuanto mayor sea la cantidad de inhibición de la proliferación detectada, menor proliferación tendrá lugar en este ensayo. De manera similar, cuanto menor es la cantidad de proliferación, mayor será la actividad citolítica de la proteína de fusión.  
 45

Como se puede ver en la Figura 2B, las proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-wt y  $\alpha$ CD19-IL15-V49D funcionaron ambas a aproximadamente el 80-85 %, sin embargo, en el caso de la proteína mutante, se requirieron mayores concentraciones para lograr una actividad comparable. La proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-I50D produjo una inhibición de aproximadamente el 60 % de la proliferación comparable a la obtenida por el anticuerpo parental  $\alpha$ CD19-SDIE (4G7SDIE) sin una fracción IL-15 fusionada la mismo. De forma destacable, la proteína de fusión  $\alpha$ CD19-IL15-E46K junto con la proteína de tipo silvestre proporcionó la inhibición más alta de la proliferación (Figura 2 B). De este modo, la proteína de fusión que contenía el polipéptido IL-15 con la sustitución de aminoácidos E46K mostró la mayor actividad citolítica de todas las proteínas mutadas contra células diana que expresaban CD19 y, por lo tanto, se usó en experimentos posteriores.  
 50  
 55

### Ejemplo 4: Proliferación inducida por diferentes proteínas de fusión en linfocitos NK92 y células PBMC

Para comprobar la importancia de un enlazador largo (L) frente a un enlazador corto, se evaluó la proliferación de células sensibles a IL15 usando el ensayo de absorción de  $^3$ H-timidina descrito en el Ejemplo 3. Las células sensibles eran linfocitos NK92 (Figura 3A) o PBMC (Figura 3B). En las proteínas de fusión que comprenden el enlazador corto, hIL-15 se une directamente al dominio CH3 mediante glicina-serina (enlazador corto). Las proteínas de fusión con el enlazador largo comprenden un enlazador largo de 20 aminoácidos (4-glicina 1-serina) $_4$ , que une directamente hIL-15 con el dominio CH3.  
 60  
 65

Las proteínas de fusión que contenían el enlazador largo o el corto se incubaron con linfocitos NK92 (Figura 3A) o células PBMC (Figura 3B) durante dos días. Después, las células se pulsaron con <sup>3</sup>H-timidina, se recogieron el día 3 en esteras filtrantes y se contaron en un contador de centelleo líquido.

5 En la Figura 3A, se incubaron linfocitos NK92 con diferentes concentraciones de las distintas proteínas de fusión como se indica (eje x y leyenda de la Figura). Los linfocitos NK92 son células citotóxicas naturales de linfoma, que no expresan CD19 a las que se une la proteína de unión a αCD19 (4G7) (Gong *et al.* (1994) "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells" *Leukemia*; 8(4):652-8). De este modo, este cultivo celular carece de células diana. Al medir la proliferación a través de los recuentos de <sup>3</sup>H-timidina como se representa en el eje y (Figura 3A), se evalúa la capacidad de las proteínas de fusión para inducir la proliferación en las células efectoras en general.

15 La αCD19-IL15wt y la αCD19-IL15wt-L (que contenían el enlazador largo) produjeron un recuento de <sup>3</sup>H-timidina de aproximadamente 25.000, sin embargo, en el caso de la proteína mutante, se requirieron mayores concentraciones para lograr una actividad comparable. La αCD19-IL15-E46K proporcionó una menor cantidad de proliferación en el cultivo celular (aproximadamente 5.000 recuentos de <sup>3</sup>H-timidina). De forma destacable, la proteína de fusión αCD19-IL15-E46K-L (que contenía el conector largo) indujo una proliferación de aproximadamente 20.000 recuentos (Figura 3A). De este modo, la proteína de fusión αCD19-IL15-E46K-L indujo una mayor proliferación/activación que la proteína de fusión αCD19-IL15-E46K.

20 También se obtuvieron resultados similares en la Figura 3B. En este caso, se incubaron células PBMC con diferentes concentraciones de las distintas proteínas de fusión como se indica (eje x y leyenda de las figuras en la Fig. 3B). Algunas PBMC (tales como los linfocitos B) también expresan CD19, que es detectado por la proteína de unión a 4G7. De forma destacable, un cultivo de PBMC también comprende algunas células efectoras potenciales, tales como, por ejemplo, los linfocitos NK. Como la Figura 3A, se determinó la proliferación mediante recuentos de <sup>3</sup>H-timidina como se representa en el eje y (Figura 3B).

30 En estos experimentos, la αCD19-IL15wt y la αCD19-IL15wt-L (que contienen el enlazador largo y la IL-15 de tipo silvestre (wt)) produjeron un recuento de <sup>3</sup>H-timidina de aproximadamente 6.000 y 12.000, respectivamente. De nuevo, la αCD19-IL15-E46K proporcionó un menor grado de proliferación (aproximadamente 4.500 recuentos de <sup>3</sup>H-timidina), mientras que la proteína de fusión αCD19-IL15-E46K-L (que contenía el enlazador largo) produjo una proliferación detectada similar a las proteínas de fusión de IL-15 de tipo silvestre (aproximadamente 8.500 recuentos; Figura 3B). Por lo tanto, en este experimento, la αCD19-IL15-E46K-L indujo una mayor proliferación/activación de las células que la proteína de fusión αCD19-IL15-E46K.

35 **Ejemplo 5: Activación de los linfocitos NK restringida a las células diana y destrucción de células diana**

Para evaluar la actividad restringida a las células diana de las proteínas de fusión generadas, se incubaron PBMC normales con polipéptidos IL-15 de tipo silvestre e IL-15 mutados comprendidos en proteínas de fusión dirigidas al antígeno CD19 asociado a los linfocitos B y al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). Dado que los linfocitos B están presentes en los cultivos de PBMC, CD19 sirve como un antígeno diana relevante en este contexto, mientras que PSMA está ausente y, por lo tanto, es irrelevante. Se incubaron PBMC n durante tres días con las proteínas de fusión indicadas (0,1 μg/ml) y luego se analizaron mediante citometría de flujo.

45 En la Fig. 4A, se evaluó la activación de los linfocitos NK midiendo los números de células positivas en CD56 que expresaban CD69 (células doble positivas CD56+/CD69+). CD69 es expresada por los linfocitos T y B activados, macrófagos activados y linfocitos NK, mientras que CD56 solo es expresada por los linfocitos NK. Al seleccionarse células doble positivas (CD56+/CD69+), solo se miden los linfocitos NK activados.

50 En la Fig. 4A, los recuentos celulares se proporcionan en el eje y, y las diferentes proteínas de fusión utilizadas se representan en el eje x. En el cultivo de PBMC de control ("solo PBMC"), aproximadamente 15000 células expresaron CD56 (CD56+) y aproximadamente 1.000 fueron de doble positivas en CD56 y CD69 (CD56+/CD69+). La aplicación de αCD19-SDIE (anticuerpo 4G7 que comprende las mutaciones SDIE; 4G7-SDIE) cambió la composición de las células solo marginalmente (a aproximadamente 2.500 linfocitos NK activados). Por el contrario, el número de linfocitos NK activados dentro de los cultivos de PBMC aumentó masivamente como resultado de la adición de la proteína de fusión αCD19-SDIE-IL15wt-L a aprox. 20.000 linfocitos NK activados). Se observó un aumento menos destacado, pero aún notable, en el número de linfocitos NK activados (aproximadamente 12.000) con la construcción αCD19-SDIE-IL15-E46K-L.

60 Se realizaron experimentos adicionales con proteínas de fusión dirigidas a PSMA, que no es expresada por las células PBMC. En este caso, la adición de la proteína de fusión PSMA-IL-15-E46K-L no activó los linfocitos NK. Por el contrario, la aplicación de la construcción PSMA-IL-15wt también aumentó significativamente el número de linfocitos NK activados dentro del grupo de células positivas en CD56. A partir de estos resultados, se puede concluir que la activación de los linfocitos NK por las construcciones que contienen el polipéptido IL-15 con afinidad reducida por IL-15Rα está restringida a las células diana, es decir, la proteína de fusión que se dirige a CD19, pero no la que se dirige a PSMA, activa los linfocitos NK y mata los linfocitos B. Por el contrario, tras la aplicación de proteínas de fusión que

comprenden IL-15 de tipo silvestre (con afinidad normal por IL-15R $\alpha$ ), la activación restringida a las células diana de el linfocito NK es menos destacada o incluso está ausente. Esto se debe a que la IL-15 de tipo silvestre es presentada en *trans* por  $\alpha$ IL15R $\alpha$  y, por lo tanto, no requiere la unión de células diana para ejercer su actividad.

5 En la Fig. 4B, se evaluó la muerte de los linfocitos B midiendo los números de linfocitos B CD20+. CD20 se expresa exclusivamente en los linfocitos B, por tanto, cuanto menos linfocitos B estén presentes en el cultivo celular, más eficaz es la destrucción de las proteínas de fusión por parte de los linfocitos B que comprenden una proteína de unión a CDCD19 (4G7; anticuerpo anti-CD19).

10 Además, en este experimento, sirvió como control un cultivo celular que solo contenía células PBMC sin la adición de ninguna proteína de fusión. En este caso, se contaron aproximadamente 12.000 linfocitos B positivos en CD20 (CD20+). La adición del control de  $\alpha$ CD19-SDIE produjo una disminución de los linfocitos B positivos en CD20 (a aproximadamente 5000 células). De forma destacable, las proteínas de fusión  $\alpha$ CD19-15wt-L y  $\alpha$ CD19-IL15-E46K-L produjeron la mayor disminución en los linfocitos B positivos en CD20 (aproximadamente 2.000 células). Por el  
15 contrario, la adición de una proteína de fusión PSMA-IL-15wt mostró una disminución de aproximadamente 6.000 células. De forma destacable, la proteína de fusión PSMA-IL15-E46K-L no alteró el número de linfocitos B positivos en CD20 en comparación con el control de "solo PBMC".

20 De este modo, la reducción del número de células CD20+ (agotamiento de linfocitos B) por las proteínas de fusión de proteína de unión/IL-15 fue más destacada que la lograda por el anticuerpo CD19 optimizado para Fc ( $\alpha$ CD19-SDIE; 4G7SDIE) solo (Fig. 4B). Asimismo, la proteína de fusión dirigida por PSMA PSMA-IL15-E46K-L no tuvo ningún efecto sobre los linfocitos B positivos en CD20 y la proteína de fusión de PSMA-IL15-wt tuvo un efecto moderado. De este modo, la destrucción de los linfocitos B restringida a las células diana es más destacada usando las proteínas de fusión IL-15-E46K-L, mientras que las proteínas de fusión que comprenden IL-15 de tipo silvestre mostraron una  
25 destrucción de los linfocitos B restringida a las células diana menos destacada o incluso ausente (Fig. 4 B).

30 En la Fig. 4C, se evaluó la activación de los linfocitos NK en cultivos de PBMC empobrecidos en linfocitos B. Los linfocitos B se agotaron con la clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) usando MicroBeads CD19 (Miltenyi Biotec). Como en la Fig. 4B, para la determinación del número de células, se añadió una cantidad igual de perlas negativas BD (perlas negativas de BD Biosciences) a cada muestra. Durante la medición de citometría de flujo, se adquirió el mismo número de perlas negativas BD para todas las muestras. Esto permitió la cuantificación de las células y la comparación directa del número de células entre diferentes muestras de un experimento. Dado que CD69 es expresada por los linfocitos T y B activados, macrófagos activados y linfocitos NK, y CD56 solo es expresada por los linfocitos NK, el agotamiento de los linfocitos B restringió estos grupos de células a los linfocitos T y los linfocitos  
35 NK. Debido a que las células que expresan CD19 se agotan en estos experimentos, se reduce enormemente la actividad de la proteína de fusión dirigida a CD19 que contiene IL-15 mutada, pero no la de la que contiene proteína de tipo silvestre.

40 Conclusiones: la activación de los linfocitos NK por las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos IL-15 con una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  de IL-15 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) está restringida a las células diana, es decir, la proteína que se dirige a CD19, pero no la que se dirige a PSMA, activa los linfocitos NK y mata los linfocitos B. Por consiguiente, la activación de los linfocitos NK por la proteína de fusión dirigida a CD19 disminuía si los linfocitos B se agotaban de la PBMC (Fig. 4C).

45 a. La activación de los linfocitos NK por ambas proteínas de fusión que contienen IL-15 de tipo silvestre no se restringe a las células diana, es decir, ambas proteínas de fusión inducen la activación de los linfocitos NK y al menos cierta destrucción de los linfocitos B, independientemente del antígeno diana.

50 b. El agotamiento de los linfocitos B por las proteínas de fusión de proteína de unión/IL-15 (con afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con IL-15 de tipo silvestre) es más destacado que por el anticuerpo CD19 optimizado por Fc ( $\alpha$ CD19-SDIE) solo (Fig. 4B).

55 A menos que se indique otra cosa, los siguientes términos y expresiones usados en el presente documento, incluyendo la descripción y las reivindicaciones, tienen las definiciones proporcionadas a continuación.

A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

60 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que la siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, el término "comprenden" y sus variantes tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento integrante o de etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento integrante o etapa, o grupo de elementos integrantes o de etapas. Cuando se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" puede sustituirse con la expresión "que contiene" o, a veces, cuando se usa en el presente documento, con la expresión "que tiene".

65 Cuando se usa en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no

especificado en el elemento de las reivindicaciones. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye los materiales o las etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso, en el presente documento, cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazada por cualquiera de los otros dos términos.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos citados abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, cuando dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad del primer y del segundo elemento juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones se encuentra dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento. La aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones también se entiende dentro del significado, y por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor en particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar más/menos 1 o más de 1 desviación típica, según la práctica en la técnica. El término "aproximadamente" también se usa para indicar que la cantidad o el valor en cuestión puede ser el valor designado o algún otro valor que sea aproximadamente el mismo. El término pretende transmitir que valores similares promueven resultados o efectos equivalentes de acuerdo con la invención. En este contexto, "aproximadamente" puede referirse a un intervalo superior o inferior de hasta el 10 %. El término "aproximadamente" se refiere, en algunas realizaciones, a un intervalo por encima y por debajo de un cierto valor que es de hasta el 5 %, como de hasta el 2 %, de hasta el 1 % o de hasta el 0,5 % superior o inferior a ese valor. En una realización, "aproximadamente" se refiere a un intervalo de hasta un 0,1 % superior o inferior a un valor dado.

#### Lista de referencias

1. Beck A., Wurch T., Bailly C., Corvaia N. "Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies". *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345-352.
2. Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., *et al.* "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity". *J Biol Chem.* 2003; 278:3466-3473.
3. Lazar G. A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng J. S., Hyun L., Chan C., Chung H. S., Eivazi A., Yoder S. C., Vielmetter J., Carmichael D. F., Flayes R. J., Dahiyat B. I., "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2006; 103:4005-4010.
4. Oflazoglu E., Audoly L. P. "Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology". *MAbs.* 2010; 2:14-19.
5. Valentin Goede, M. D., Kirsten Fischer, M. D., Raymonde Busch, M. S., Anja Engelke, M. D., Barbara Eichhorst, M. D., Clemens M. Wendtner, M. D., Tatiana Chagorova, M. D., Javier de la Serna, M. D., Marie-Sarah Dilhuydy, M. D., Thomas Illmer, M. D., Stephen Opat, M. D., Carolyn J. Owen, M. D., Olga Samoylova, M. D., Karl-Anton Kreuzer, M. D., Stephan Stilgenbauer, M. D., Hartmut Döhner, M. D., Anton W. Langerak, Ph. D., Matthias Ritgen, M. D., Michael Kneba, Elina Asikanius, M. Sc., Kathryn Humphrey, B. Sc., Michael Wenger, M.D. y Michael Hallek, M. D. "Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Condition". *N Engl J Med* 2014; 370:1101-1110.
6. Horton H. M., Bennett M. J., Pong E., Peipp M., Karki S., Chu S. Y., Richards J. O., Vostiar I., Joyce P. F., Repp R., Desjarlais J. R., Zhukovsky E. A., "Potent *in vitro* and *in vivo* activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia". *Cancer Res* 2008; 68:8049-8057.
7. Foyil K. V., Bartlett N. L., "Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma". *Curr Hematol Malig Rep* 2010; 5:140-147.
8. Ring A. M., Lin J. X., Feng D., Mitra S., Rickert M., Bowman G. R., Pande V. S., Li P., Moraga I., Spolski R., Ozkan E., Leonard W. J., Garcia K. C., "Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15". *Nat Immunol* 2012; 13:1187-1195.
9. Waldmann T. A., "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design". *Nat Rev Immunol* 2006; 6:595-601.
10. Perna K., De Angelis B., Pagliara D., Hasan S. T., Zhang L., Mahendravada A., Heslop H. E., Brenner M. K., Rooney C. M., Dotti G. Savoldo B. "Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma". *Clin Cancer Res* 2013; 19:106-117.

11. Liu R. B., Engels B., Schreiber K., Ciszewski C., Schietinger A., Schreiber H., Jabri B. "IL-15 in tumor microenvironment causes rejection of large established tumors by T cells in a noncognate T cell receptor-dependent manner". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2013; 110:8158-8163.
- 5 12. List T, Neri D. "Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy". *Clin Pharmacol* 2013; 5:29-45.
- 10 13. Gillies S. D., Reilly E. B., Lo K. M., Reisfeld R. A., "Antibody-targeted interleukin 2 stimulates Tcell killing of autologous tumor cells". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1992; 89:1428-1432.
14. Albertini M. R., Hank J. A., Gadbow 8, Kostlevy J., Haldeman J., Schalch H., Gan J., Kim K., Eickhoff J., Gillies S. D., Sondel P. M., "Phase II trial of hu14.18-11.2 for patients with metastatic melanoma". *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:2261-2271.
- 15 15. Ribas A., Kirkwood J. M., Atkins M. B., Whiteside T. L., Gooding W., Kovar A., Gillies S. D., Kashala O., Morse M. A., "Phase 1/11 open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu 14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma". *J Transl Med* 2009; 7:68.
- 20 16. Bessard A., Sole V., Bouchaud G., Quernener A. "Jacques Y. High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (1L-15)-1 L-15 receptor alpha fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer". *Mol Cancer Ther* 2009; 8:2736-2745.
- 25 17. Vincent M., Bessard A., Cochonneau D., Teppaz G., Sold V., Maillasson M., Birkld S., Garrigue-Antar L., Quernener A., Jacques Y. "Tumor targeting of the 1 L-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency". *Int J Cancer* 2013; 133:757-765.
- 30 18. Kermer V., Baum V., Hornig N., Kontermann R. E., Muller D. "An antibody fusion protein for cancer immunotherapy mimicking IL-15 trans-presentation at the tumor site". *Mol Cancer Ther.* 2012; 11:1279-1288.
- 35 19. Rubinstein M. P., Kovar M., Purton J. F., Cho J. H., Boyman O., Surh C. D., Sprent J. "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}". *Proc Natl Acad Sci.* EE.UU. 2006; 103:9166-9171.
20. Bernard J., Harb C., Mortier E., Qudmener A., Meloen R. H., Vermot-Desroches C., Wijdeness J., van Dijken P., Grötzing J., Slootstra J. W., Plet A., Jacques Y. "Identification of an interleukin-15alpha receptor-binding site an human interleukin-15". *J Biol Chem* 2004; 279:24313-24322.
- 40 21. Quemener A., Bernard J., Mortier E., Plet A., Jacques Y., Tran V. "Docking of human interleukin-15 to its specific receptor alpha chain: correlation between molecular modeling and mutagenesis experimental data". *Proteins* 2006; 65:623-636
- 45 22. Hofmann M., Grosse-Hovest L., Nubling T., Pyz E. Bamberg M. L., Aulwurm S., Buhring H. J., Schwartz K., Haen S. P., Schilbach K., Rammensee H. G., Salih H. R., Jung G. "Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia". *Leukemia* 2012; 26:1228-1237.
- 50 23. Holt L. J., Herring C., Jespers L. S., Woolven B. P., Tomlinson I. M., "Domain antibodies: proteins for therapy". *Trends Biotechnol.* noviembre de 2003; 21 (11):484-90
24. III CR, Gonzales J. N., Houtz E. K., Ludwig J. R., Melcher E. D., Hale J. E., Pourmand R., Keivens V. M., Myers L., Beidler K., Stuart P., Cheng S., Radhakrishnan R. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions". *Protein Eng.* agosto de 1997;10(8):949-57
- 55 25. Martin F., Toniatti C., Salvati A. L., Venturini S., Ciliberto G., Cortese R., Sollazzo M. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6". *EMBO J.* 15 de noviembre de 1994;13(22):5303-9
26. Traunecker A., Lanzavecchia A., Karjalainen K. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells". *EMBO J.* Diciembre de 1991;10(12):3655-9
- 60 27. Traunecker A., Lanzavecchia A., Karjalainen K. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents". *Int J Cancer Suppl.* 1992;7:51-2
- 65 28. Silverman J., Liu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B. M., Smith R., Rivas A., Li P., Le H., Whitehorn E., Moore K. W., Swimmer C., Perloth V., Vogt M., Kolkman J., Stemmer W. P., "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". *Nat Biotechnol.* diciembre de 2005;23(12):1556-61. Epub 20 de noviembre de 2005.

29. Silverman J., Liu Q., Bakker A., To W., Duguay A., Alba B. M., Smith R., Rivas A., Li P., Le H., Whitehorn E., Moore K. W., Swimmer C., Perlroth V., Vogt M., Kolkman J., Stemmer W. P., "Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains". *Nat Biotechnol.* diciembre de 2005;23(12):1556-61. Epub 20 de noviembre de 2005.
- 5 30. Lamerisa *et al.* "Bispecific antibody platforms for cancer immunotherapy" *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014; S1040-8428(14)00135-8
- 10 31. Altschul, *Nucl. Acids Res.* 25 (1997), 3389-3402
32. Chen *et al.* "Fusion protein linkers: property, design and functionality" *Adv Drug Deliv Rev;* 2013; 65(10):1357-69
33. Gennaro, A. L. y Gennaro, A. R. (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA
- 15 34. J. S. Patton *et al.* "The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery". *Proc. Amer. Thoracic Soc.* 2004 Vol. 1 páginas 338-344
35. Jung *et al.* "Local immunotherapy of glioma patients with a combination of 2 bispecific antibody fragments and resting autologous lymphocytes: evidence for in situ t-cell activation and therapeutic efficacy" *Int J Cancer,* enero de 2001; 15; 91(2):225-30,
- 20 36. Natsume A., Niwa R., Satoh M. "Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC" *Drug Des Devel Ther.* 2009; 3:7-16.
- 25 37. Gong J. H., Maki G., Klingemann H. G., "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells" *Leukemia;* 1994,8(4):652-8
- 30 38. Altschul, *J. Mol. Evol.* 36 (1993), 290-300
39. Altschul, *J. Mol. Biol.* 215 (1990), 403-410
40. Kontermann (2012) "Dual targeting strategies with bispecific antibodies" *Landes Bioscience mAbs* Vol. 4, Número 2 182-197.
- 35 41. Kaspar M., Trachsel E., Neri D. "The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis". *Cancer Res.* 15 de mayo de 2007;67(10):4940-8.
- 40 42. Conlon K. C., Lugli E1, Welles H. C., Rosenberg S. A., Fojo A. T., Morris J. C., Fleisher T. A., Dubois S. P., Perera L. P., Stewart D. M., Goldman C. K., Bryant B. R., Decker J. M., Chen J., Worthy T. A., Figg W. D. Sr, Peer C. J., Sneller M. C., Lane H. C., Yovandich J. L., Creekmore S. P., Roederer M., Waldmann T. A. "Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer". *J Clin Oncol.* 1 de enero de 2015;33(1):74-82.
- 45 43. Navid *et al.*, "Immune Therapies for Neuroblastoma", *Cancer Biol Ther.* Mayo de 2009; 8(10): 874-8

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Eberhard Karls Universitaet Tuebingen Deutsches Krebsforschungszentrum
- <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN UNA PROTEÍNA DE UNIÓN Y UN POLIPÉPTIDO DE INTERLEUCINA-15 QUE TIENE UNA AFINIDAD REDUCIDA POR IL15R $\alpha$  Y USOS TERAPÉUTICOS DE LAS MISMAS
- 55 <130> DKF15230PCT
- <150> EP15157911.7
- <151> 06-03-2015
- 60 <160> 44
- <170> PatentIn versión 3.5
- 65 <210> 1
- <211> 162
- <212> PRT

ES 2 763 598 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IL-15

5

<400> 1

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr  
1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His  
20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala  
35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile  
50 55 60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His  
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln  
85 90 95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu  
100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val  
115 120 125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile  
130 135 140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn  
145 150 155 160

Thr Ser

10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia importante para la unión en alfa de IL-15

<400> 2

20

Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu  
1 5

ES 2 763 598 T3

5 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia importante para la unión en alfa de IL-15

10 <400> 3

Glu Asn Leu Ile Ile  
 1 5

15 <210> 4  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Fragmento de IL-15

<400> 4

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 Glu 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

25  
 30 <210> 5  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 763 598 T3

<223> Dominio variable VH monocatenario anti-CD19 (clon 4G7)

<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

5

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio variable VL monocatenario anti-CD19 (clon 4G7)

15 <400> 6

ES 2 763 598 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

<210> 7

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Dominio variable VH monocatenario anti-FLT3 (clon BV10)

<400> 7

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
65 70 75 80

ES 2 763 598 T3

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Dominio variable VL monocatenario anti-FLT3 (clon BV10)

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
100 105 110

**Lys**

<210> 9  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada de dominio variable VH monocatenario quimérico anti-FLT3 (clon 4G8)

<400> 9

ES 2 763 598 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Lys Asp Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala Ile Thr Thr Thr Pro Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera de dominio variable VL monocatenario quimérico anti-FLT3 (clon 4G8)

<400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn  
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr  
 65 70 75 80

ES 2 763 598 T3

Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 11  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena pesada de dominio variable VH monocatenario anti-PSMA (clon J591)  
 <400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

15 <210> 12  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cadena ligera de dominio variable VL monocatenario anti-PSMA (clon J591)  
 <400> 12

25 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly





ES 2 763 598 T3

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1

5

5 <210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> enlazador  
  
<400> 20

Ala Pro  
1 5 10

15  
  
20 <210> 21  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> enlazador  
  
25 <400> 21

Leu Glu Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Pro Arg Ser Phe Thr Ser Cys  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Glu  
20

30 <210> 22  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> enlazador  
  
<400> 22

Gly Ser Ser Thr  
1

40 <210> 23  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> enlazador  
  
<400> 23

ES 2 763 598 T3

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Glu Ala Glu Ala Cys  
 1 5 10

5 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> enlazador

<400> 24

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

Gly Gly Gly Ser  
 20

15 <210> 25  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cadena pesada de dominio variable VH monocatenario anti-endoglina (clon Kro23)

25 <400> 25

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

Ala Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe  
 50 55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Asn Thr Arg Tyr Gly Thr Ser Ser Ala Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

ES 2 763 598 T3

<210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> cadena ligera de dominio variable VL monocatenario anti-endoglina (clon Kro23)

<400> 26

10

```

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1                               5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
                20                25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
                35                40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50                55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65                70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
                85                90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100                105
    
```

<210> 27  
 <211> 582  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> proteína de fusión de la cadena pesada de IgG anti-endoglina (Kro23) con modificación SDIE e IL15 mutante

20

<400> 27

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1                               5 10 15

Ala Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
                20                25 30

Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35                40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50                55 60

Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
    
```



ES 2 763 598 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser  
 435 440 445  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile  
 465 470 475 480  
 Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu  
 485 490 495  
 Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu  
 500 505 510  
 Leu Lys Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His  
 515 520 525  
 Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser  
 530 535 540  
 Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln  
 565 570 575

ES 2 763 598 T3

Met Phe Ile Asn Thr Ser  
580

5 <210> 28  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cadena ligera del anticuerpo anti-endoglina Kro23

<400> 28

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

ES 2 763 598 T3

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

- <210> 29
- <211> 567
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre con enlazador corto
- <400> 29

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

ES 2 763 598 T3

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu  
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

ES 2 763 598 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys  
 450 455 460

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr  
 465 470 475 480

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe  
 485 490 495

Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile  
 500 505 510

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 515 520 525

Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
 530 535 540

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
 545 550 555 560 565

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 565

<210> 30

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (E46K) con enlazador corto

<400> 30

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

15

ES 2 763 598 T3

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

ES 2 763 598 T3

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys  
 450 455 460  
 Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr  
 465 470 475 480  
 Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe  
 485 490 495  
 Leu Leu Lys Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile  
 500 505 510  
 His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 515 520 525  
 Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
 530 535 540  
 Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
 545 550 555 560  
 Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 565

ES 2 763 598 T3

<210> 31  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (V49D) con enlazador corto

10 <400> 31

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

ES 2 763 598 T3

	195					200										205
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210					215					220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245					250					255		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			260					265					270			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275					280					285				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	290					295					300					
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	
				325					330					335		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340					345					350			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		355					360					365				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370					375					380					
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
385					390					395					400	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
				405					410					415		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			420					425					430			
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		435					440					445				

ES 2 763 598 T3

Pro Gly Lys Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys  
 450 455 460

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr  
 465 470 475 480

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe  
 485 490 495

Leu Leu Glu Leu Gln Asp Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile  
 500 505 510

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 515 520 525

Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
 530 535 540

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
 545 550 555 560

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 565

<210> 32

<211> 567

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (I50D) con enlazador corto

<400> 32

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

ES 2 763 598 T3

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu  
325 330 335

ES 2 763 598 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys  
 450 455 460  
 Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr  
 465 470 475 480  
 Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe  
 485 490 495  
 Leu Leu Glu Leu Gln Val Asp Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile  
 500 505 510  
 His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 515 520 525  
 Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
 530 535 540  
 Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
 545 550 555 560  
 Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 565

<210> 33  
 <211> 586  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 763 598 T3

<220>

<223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre con enlazador largo

5

<400> 33

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220

ES 2 763 598 T3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu  
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
435 440 445

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp





ES 2 763 598 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp  
 465 470 475 480

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr  
 485 490 495

Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met  
 500 505 510

Lys Cys Phe Leu Leu Lys Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp  
 515 520 525

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn  
 530 535 540

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys  
 545 550 555 560

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val  
 565 570 575

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 580 585

<210> 35  
 <211> 586

ES 2 763 598 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (V49D) con enlazador largo

<400> 35

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

10

ES 2 763 598 T3

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 260 265 270  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu  
 325 330 335  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 450 455 460

ES 2 763 598 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp  
465 470 475 480

Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr  
485 490 495

Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met  
500 505 510

Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Asp Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp  
515 520 525

Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn  
530 535 540

Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys  
545 550 555 560

Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val  
565 570 575

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
580 585

<210> 36

<211> 586

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (I50D) con enlazador largo

<400> 36

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

15

ES 2 763 598 T3

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu



ES 2 763 598 T3

His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
580 585

5 <210> 37  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cadena ligera de IgG1 (4G7) anti-CD19  
<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

ES 2 763 598 T3

195

200

205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

- <210> 38
- <211> 588
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-FLT3 (BV10) con modificaciones SDIE e IL15 mutante
- <400> 38

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe  
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Tyr Ala Asn His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val



ES 2 763 598 T3

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile  
 465 470 475 480

Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp  
 485 490 495

Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr  
 500 505 510

Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Lys Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser  
 515 520 525

Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala  
 530 535 540

Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys  
 545 550 555 560

Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser  
 565 570 575

Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 580 585

<210> 39  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cadena ligera de IgG1 (BV10) anti-FLT3

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val





ES 2 763 598 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr  
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys  
 465 470 475 480

Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr  
 485 490 495

Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe  
 500 505 510

Leu Leu Lys Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile  
 515 520 525

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 530 535 540

ES 2 763 598 T3

Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
545 550 555 560

Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
565 570 575

Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
580

<210> 41  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cadena ligera de IgG1 (4G8) anti-endoglina

<400> 41

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Thr Trp Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

ES 2 763 598 T3

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 42

<211> 580

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (J591) anti-PSMA con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre

<400> 42

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

5

10

15

ES 2 763 598 T3

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

ES 2 763 598 T3

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly  
 435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 450 455 460

Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp  
 465 470 475 480

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp  
 485 490 495

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu  
 500 505 510

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr  
 515 520 525

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly  
 530 535 540

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys  
 545 550 555 560

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe  
 565 570 575

Ile Asn Thr Ser  
 580

<210> 43

<211> 580

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-PSMA (J591) con modificaciones SDIE e IL15 (E46K) mutante

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr  
 1 5 10 15

15

ES 2 763 598 T3

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr  
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val  
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly  
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys  
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270

ES 2 763 598 T3

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly  
 435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 450 455 460

Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp  
 465 470 475 480

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp  
 485 490 495

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Lys  
 500 505 510

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr

ES 2 763 598 T3

515 520 525

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly  
 530 535 540

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys  
 545 550 555 560

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe  
 565 570 575

Ile Asn Thr Ser  
 580

5 <210> 44  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cadena ligera de IgG1 (J591) anti-PSMA

<400> 44

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr  
 20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

ES 2 763 598 T3

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

## REIVINDICACIONES

## 1. Una proteína de fusión que comprende

- 5 a) una proteína de unión que comprende al menos un sitio de unión, en donde el sitio de unión se une a un antígeno asociado con una célula diana; y  
 b) un polipéptido IL-15, en donde el polipéptido IL-15 comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 112, 113, 114, 115 y/o 116 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1

10 teniendo, por tanto, una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1 (número Uniprot: P40933-1), en donde el polipéptido IL-15 se une a IL-2/IL-15R $\beta\gamma$ , en donde la proteína de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo divalente, un fragmento de anticuerpo monovalente o una molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo.

20 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la molécula de unión proteica con propiedades de unión de tipo anticuerpo se selecciona del grupo de un aptámero, una muteína basada en un polipéptido de la familia de las lipocalinas, un glucocorticoide, una proteína basada en el armazón de anquirina, una proteína basada en el armazón cristalino, una adnectina, un avímero o una proteína receptora (recombinante).

25 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde la proteína de unión se modifica de modo que tenga una actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) potenciada en comparación con la misma proteína de unión no modificada, opcionalmente, en donde la proteína de unión modificada está optimizada para Fc y/o, opcionalmente, en donde la proteína de unión modificada es un anticuerpo, un fragmento scFv-Fc, un dímero bsFc-1/2 o un dímero bsFc-CH3-1/2.

30 4. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de unión comprende un sitio de unión del anticuerpo 4G7, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 5 (la secuencia de la cadena pesada del dominio variable de 4G7); y/o en donde la proteína de unión comprende un sitio de unión del anticuerpo 4G7, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, o al menos el 85 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % o 100 % con SEQ ID NO: 6 (la secuencia de la cadena ligera del dominio variable de 4G7).

35 5. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la célula diana expresa un antígeno asociado al tumor (TAA) y/o un antígeno asociado con enfermedades autoinmunitarias, en donde preferentemente el TAA se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD20, CD10, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD38, CD44v6, CD45, CDw52, tirosina quinasa de tipo Fms 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R, (CD115), CD123, CD133, PDGFR- $\alpha$  (CD140a), PDGFR- $\beta$  (CD140b), proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), proteoglicano de sulfato de condroitina asociado al melanoma, Muc-1, EGFR, de2-7- EGFR, EGFRvIII, Proteína de bloqueo del folato, Her2neu, Her3, PSMA, PSCA, PSA, TAG-72, HLA-DR, IGFR, CD133, IL3R, proteína activadora de fibroblastos (FAP), Carboanhidrasa IX (MN/CA IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), EpCAM, CDCP1, Derlin1, tenascina, frizzled 1-10, los antígenos vasculares VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), Endoglina, CLEC14, Tem1-8, Tie2, mesotelina, glicoproteína epitelial 2 (EGP2), glicoproteína epitelial 40 (EGP40), antígeno canceroso 72-4 (CA72-4), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina 13, IL13R $\alpha$ 2, cadena ligera kappa de Ig ( $\kappa$ ), gangliósido de GD3 (GD3), gangliósido de GD2 (GD2), variantes acetiladas de GD2 y GD3, CD171, NCAM, receptor de folato alfa ( $\alpha$ FR), Lewis (Y), receptor de acetilcolina fetal (FAR), homólogo oncogénico vírico de la leucemia eritroblástica aviar 3 (ERBB3), homólogo oncogénico vírico de la leucemia eritroblástica aviar 4 (ERBB4), homólogo oncogénico vírico 2 de la leucemia eritroblástica aviar (ERBB2), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR/c-Met), claudina 18.2, claudina 3, claudina 4, claudina 1, claudina 12, claudina 2, claudina 5, claudina 8, claudina 7, claudina 6, CEA unido a la membrana, Robo4, CD138, tenascina y el dominio B adicional de fibronectina; y/o

50 en donde, preferentemente, la célula diana expresa un antígeno asociado con enfermedades autoinmunitarias, antígeno que se selecciona del grupo que consiste en CD20, CD22, CD52 y TNFR, CD19, CD25, CD40, y/o en donde preferentemente la célula diana es una célula tumoral/cancerosa y/o un linfocito B.

60 6. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la al menos una sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en L92D, E94K, L95D, V97D, I98D, L114D, L114E, I115D, I115E y/o, preferentemente, E94K, V97D y/o I98D, más preferentemente, E94K.

65 7. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido IL-15 no se une a IL-15R $\alpha$ , y/o en donde el polipéptido IL-15 es la proteína IL-15 de longitud completa, o un fragmento o mutante de la misma, fragmento o mutante que tiene una afinidad reducida por IL-15R $\alpha$  en comparación con la afinidad de IL-15 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.

8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polipéptido IL-15 comprende al menos una secuencia de aminoácidos como la mostrada en SEQ ID NO: 4, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 64, 65, 66, 67 y/o 68 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.
9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la activación restringida a las células diana de células efectoras que expresan IL2/IL-15Rβγ y/o para su uso en la destrucción de células diana restringida a las células diana mediada por células efectoras que expresan IL-2/IL-15Rβγ.
10. La proteína de fusión para el uso de la reivindicación 9, en donde la célula efectora es un linfocito NK o un linfocito T, preferentemente, un linfocito NK, un linfocito T CD8+, un linfocito T gamma delta o un linfocito T NK.
11. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, en donde, preferentemente, se reducen los efectos secundarios del tratamiento.
12. La proteína de fusión para el uso de la reivindicación 11, en donde la enfermedad es una enfermedad proliferativa o una enfermedad autoinmunitaria, en donde, preferentemente, la enfermedad proliferativa se selecciona del grupo que consiste en cáncer suprarrenal, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, tumores de cerebro y de médula espinal, cáncer de mama, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI), enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, leucemia, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumor carcinoide pulmonar, linfoma, linfoma de piel, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no-Hodgkin, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores de la pituitaria, cáncer de próstata, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de células basales y escamosas, melanoma, cáncer de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de testículos, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom o tumor de Wilms; o en donde, preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Goodpasture, sarcoidosis, esclerodermia, artritis reumatoide, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerodermia, dermatomiositis, psoriasis, vitíligo, alopecia areata, diabetes mellitus tipo 1, pancreatitis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, esclerosis múltiple, miastenia gravis, poliarteritis nodosa, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia perniciosa, enfermedades gastrointestinales, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, hepatitis autoinmunitaria o cirrosis biliar primaria.
13. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, preferentemente, comprendida en un vector.
15. Un método de producción de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende usar el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión para la expresión de la proteína de fusión en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión.

Figura 1

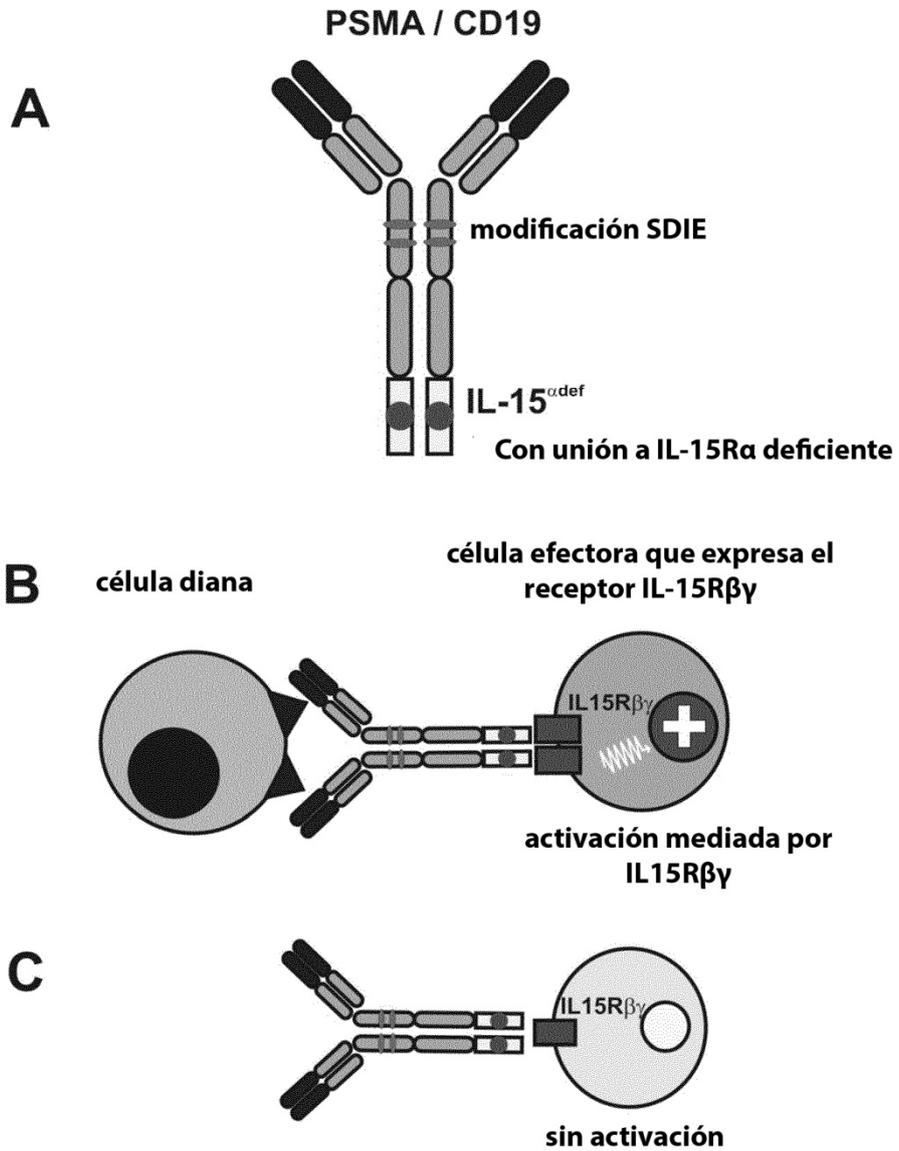


Figura 2: Unión a IL-15R $\alpha$  y actividad citolítica de las proteínas de fusión

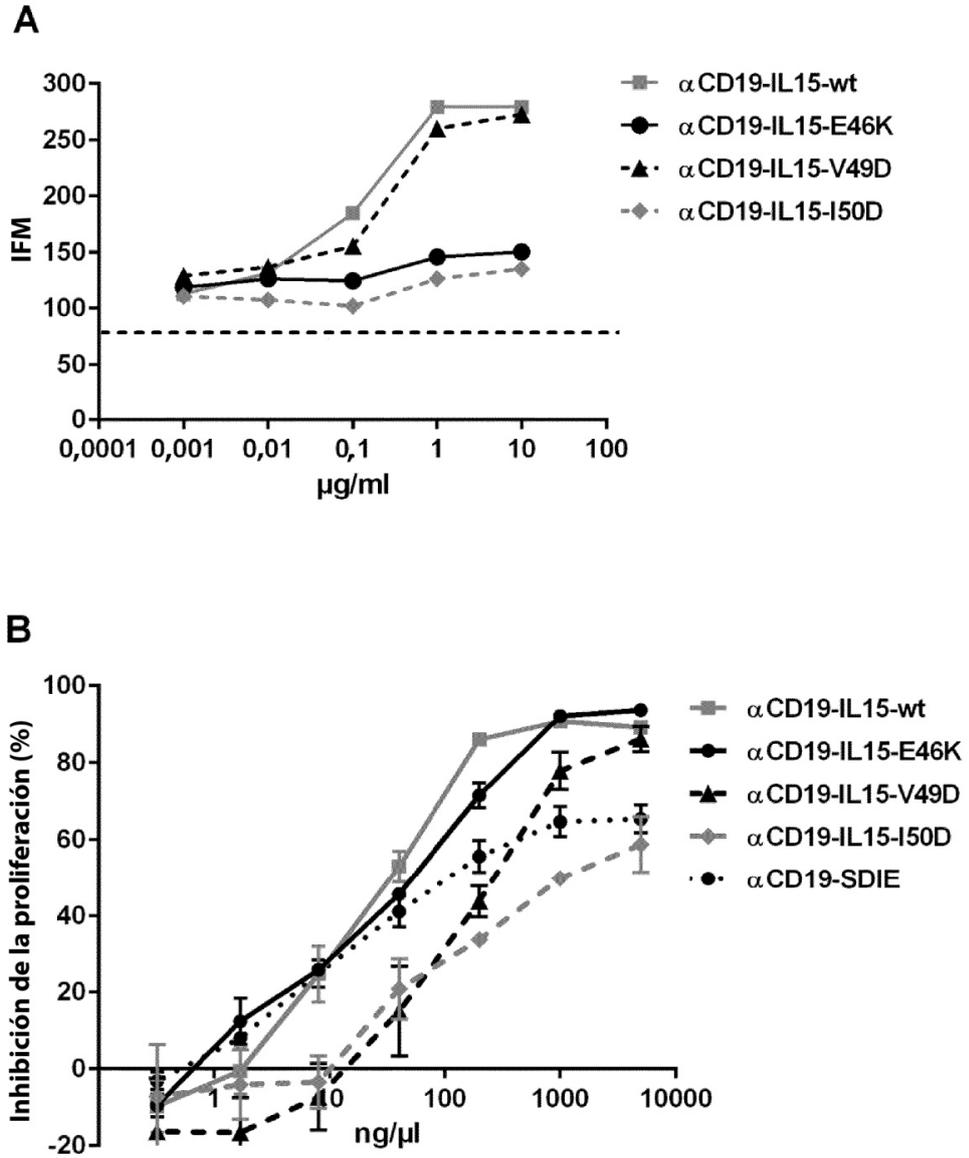


Figura 3: Selección del enlazador

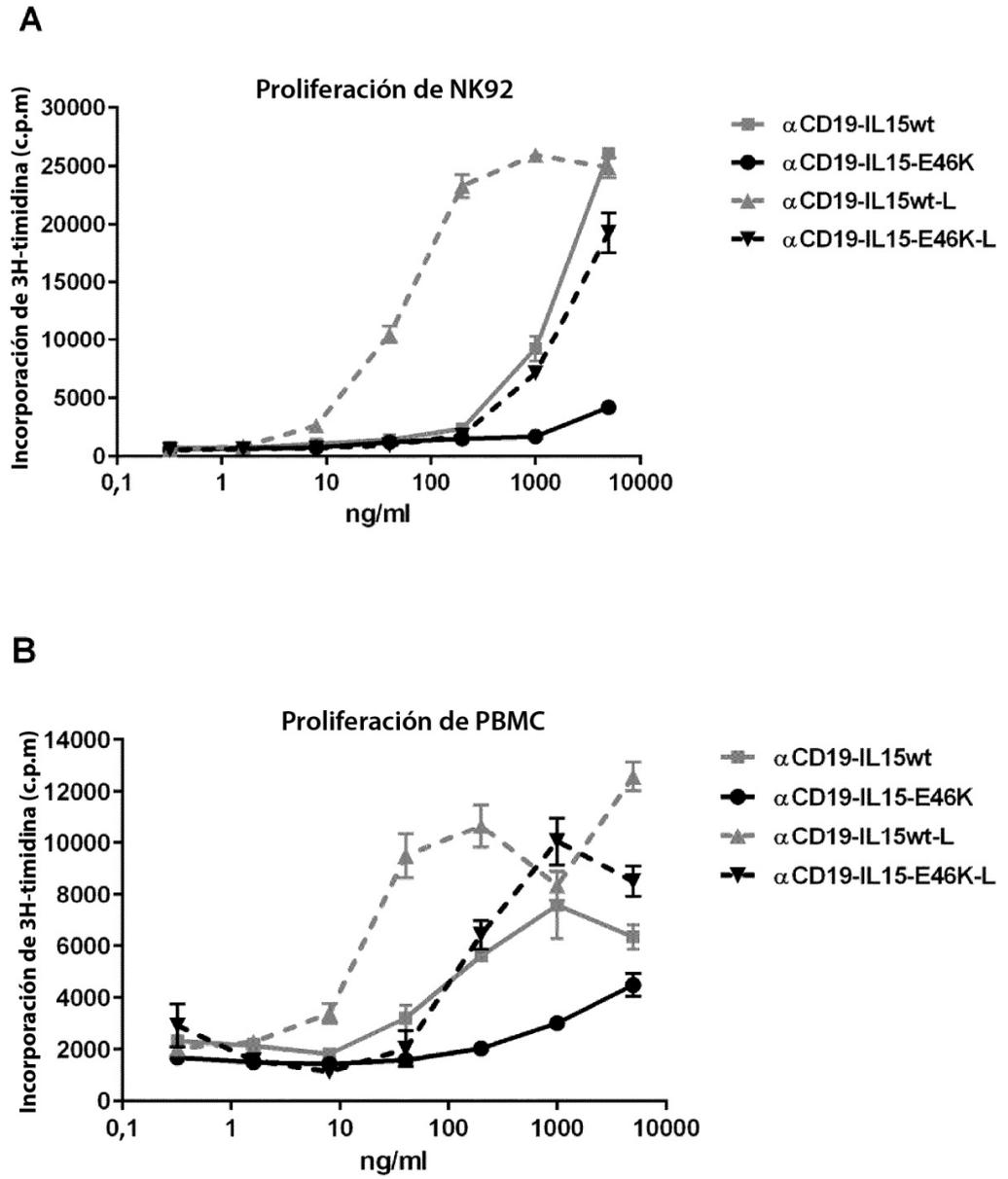


Figura 4: Activación de linfocitos NK restringida a la célula diana y destrucción de la célula diana

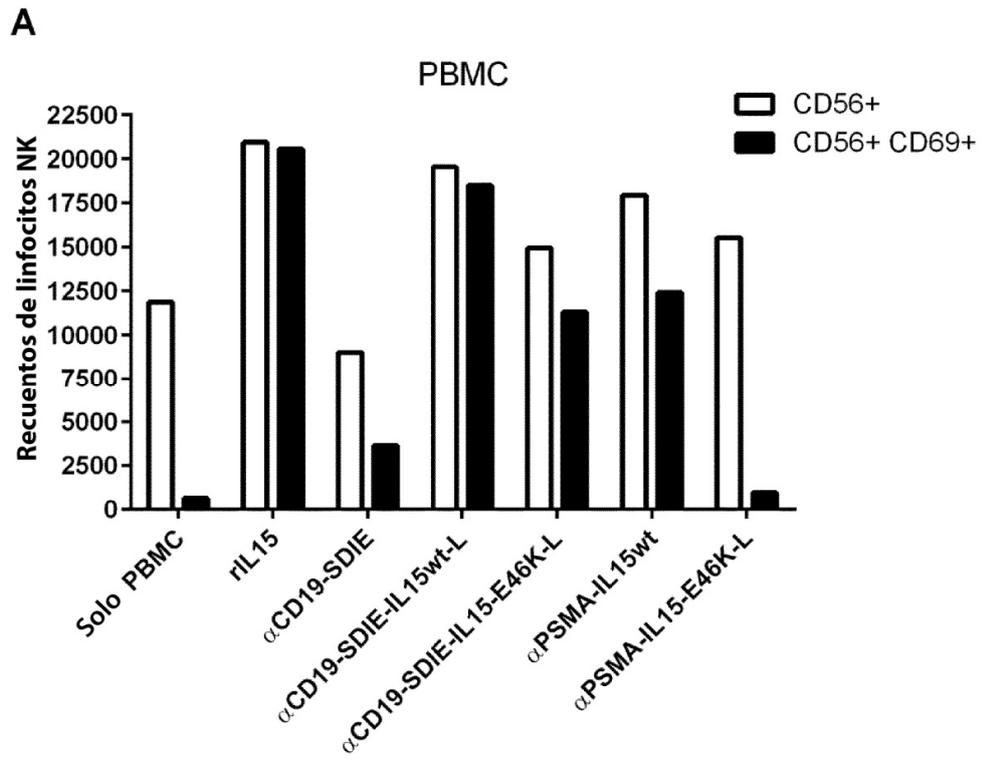


Figura 4 (continuación)

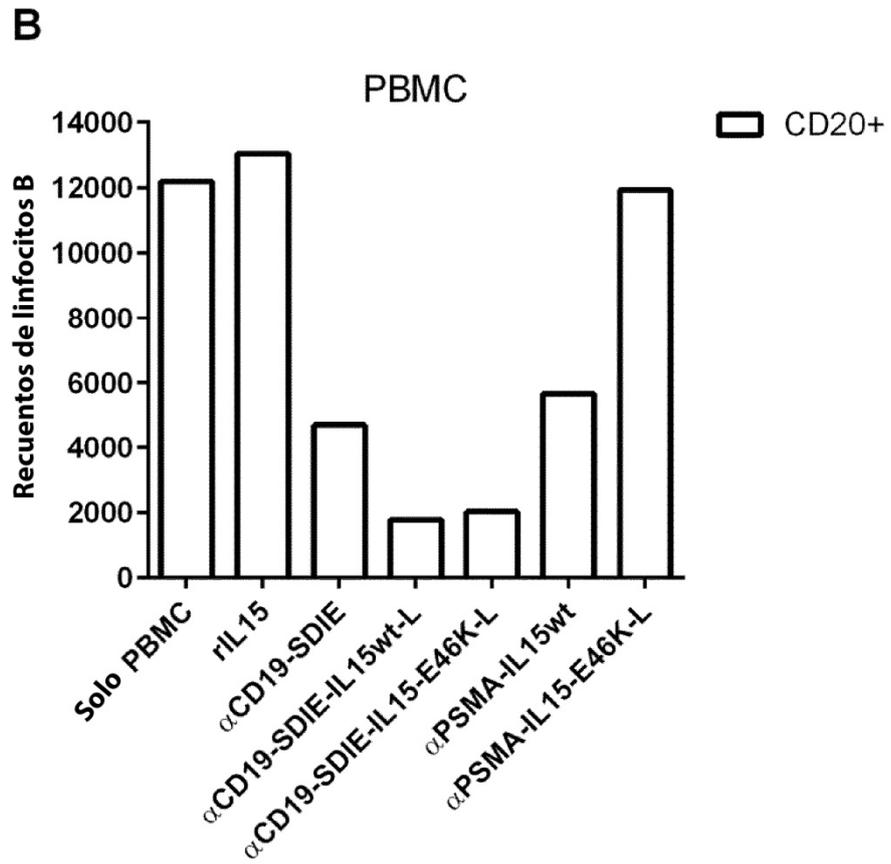
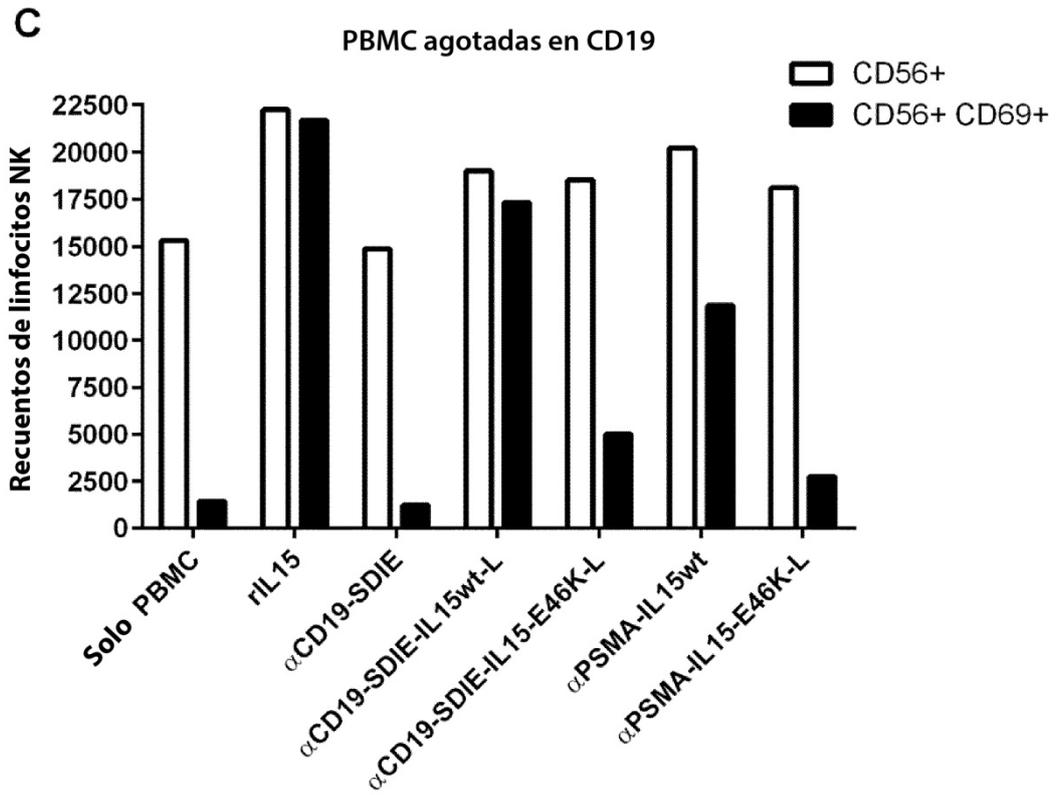


Figura 4 (continuación)



**Figura 5**

**SEQ ID NO: 1**

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIE  
 DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLLILANNSL  
 SSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

**SEQ ID NO: 2** <sup>44</sup>LLELQVISL<sup>52</sup> (Unión a α)

**SEQ ID NO: 3** <sup>64</sup>ENLII<sup>68</sup> (Unión a α)

**SEQ ID NO: 4**

1 NWNVVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH 60  
 61 DTVENLILAN NSLSSNGNVT ESGCKECEEL EEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS 114

**SEQ ID NO: 5** – Dominio variable VH monocatenario anti-CD19 (clon 4G7) (Regiones CDR subrayadas)

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTY  
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSS

**SEQ ID NO: 6** – Dominio variable VL monocatenario anti-CD19 (clon 4G7) (Regiones CDR subrayadas)

DIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKLLNSNGNTLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASG  
VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK

**SEQ ID NO: 7** Dominio variable VH monocatenario anti-FLT3 (clon BV10)

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYN  
AAFISRLSISKDNSKQVFFKMNSLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYAMDYWGQGTSTVTS  
 S

**SEQ ID NO: 8** Dominio variable VL monocatenario anti-FLT3 (clon BV10) (Regiones CDR subrayadas)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR  
ESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK

**SEQ ID NO: 9** Cadena pesada de dominio variable VH monocatenario quimérico anti-FLT3 (clon 4G8)

QVQLQPGAELVKGASLKLSCKSSGYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDY  
NQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDSAVYYCARAITTTDFWGGTTLTVSS

**SEQ ID NO: 10** Cadena ligera de dominio variable VL monocatenario quimérico anti-FLT3 (clon 4G8)

DIVLTQSPATLSVTPGDSVLSCLASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSSISGIPSRFS  
GSGSGTDFLTSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYTFGGGKLEIK

# ES 2 763 598 T3

**SEQ ID NO: 11** Cadena pesada de dominio variable VH monocatenario anti-PSMA (clon J591)

EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNI  
NPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNF  
DYWGQGTTTLTVSS

**SEQ ID NO: 12** Cadena ligera de dominio variable VL monocatenario anti-PSMA (clon J591)

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVSWYQQKPEQSPKLLIYGA  
SNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGT KLEIK

**SEQ ID NO: 25** Cadena pesada de dominio variable VH monocatenario anti-endoglina (clon K-ro23)

EVQLQQSGADLVRSGAAVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEY  
APKFQDKATMTADSSSNAYLQLNSLTSEDTVVYCNTRYGTSSACWGQGTTTLTVSS

**SEQ ID NO: 26** Cadena ligera de dominio variable VL monocatenario anti-endoglina (clon K-ro23)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPRSSPKPWIYLTSLNLASGVPARF  
SGSGSGTSYSLTSSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK

## Figura 6

**SEQ ID NO: 27** Proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-endoglina (K-ro23) con modificaciones SDIE e IL15 mutante

EVQLQQSGADLVRSGAAVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPKFQDKATMTADSSSN  
K-ro23-VH

TAYLQLNSLTSEDTVVYCNTRYGTSSACWGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGG  
Bisagra

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
CH3

PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWV  
Enlazador

NVISDLKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLLKLQVISLES GDASIHDTVENLILANSLSSNGNVTESGCK  
IL15mut

ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

**SEQ ID NO: 28** cadena ligera de IgG1 anti-endoglina (K-ro23)

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPRSSPKWIYLTSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEED  
K-ro23-VL

AATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
CL

VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Figura 7**

**SEQ ID NO: 29** Proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre con enlazador corto

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST  
4G7-VH

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPPELLGG  
Bisagra

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
CH3

PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSNWWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT  
Enlazador

LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV  
IL15mut

QMFINTS

**SEQ ID NO: 30** Proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) con modificaciones SDIE e IL15 mutante (E46K) con enlazador corto

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST  
4G7-VH

ES 2 763 598 T3

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPPCP**APPELLGG  
*Bisagra*

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
CH3

**PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSNWWVVISDLKKIEDLIQSMHIDAT**  
Enlazador

**LYTESDVHPSCCKVTAMKCFLLKLQVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV**  
*IL15mut*

**QMFINTS**

**SEQ ID NO: 31** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) con modificaciones SDIE e IL15 mutante (V49D) con enlazador corto

**EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST**  
4G7-VH

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPPCP**APPELLGG  
*Bisagra*

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
CH3

**PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSNWWVVISDLKKIEDLIQSMHIDAT**  
Enlazador

**LYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQDISLES GDASIHDTVENLILANNSLSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIV**  
*IL15mut*

**QMFINTS**

ES 2 763 598 T3

**SEQ ID NO: 32** Proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) con modificaciones SDIE e IL15 mutante (I50D) con enlazador corto

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST  
4G7-VH

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
Bisagra

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAKEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
CH3

PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT  
Enlazador

LYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVDSLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKFLQSFVHIV  
IL15mut

**QMFINTS**

**SEQ ID NO: 33** Proteína de fusión de cadena pesada de IgG1 anti-CD19 (4G7) con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre con enlazador largo

EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST  
4G7-VH

AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
Bisagra

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAAKEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
CH3

PVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWV  
Enlazador

NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK  
IL15mut

ES 2 763 598 T3

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 34** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (E46K) con enlazador largo

**EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSST**  
4G7-VH

**AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS**  
CH1

**WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG**  
Bisagra

**PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN**  
CH2

**GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP**  
CH3

**PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**  
Enlazador

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLKLVISLESQDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
IL15mut

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 35** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (V49D) con enlazador largo

**EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSST**  
4G7-VH

**AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS**  
CH1

**WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG**  
Bisagra

**PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN**  
CH2

**GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP**  
CH3

**PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**  
Enlazador

# ES 2 763 598 T3

Enlazador

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQDISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
**IL15mut**

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 36** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G7) anti-CD19 con modificaciones SDIE e IL15 mutante (I50D) con enlazador largo

**EVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSST**  
**4G7-VH**

**AYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS**  
CH1

**WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG**  
**Bisagra**

**PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN**  
CH2

**GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
**CH3**

**PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**  
Enlazador

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVDSLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
**IL15mut**

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 37** Cadena ligera de IgG1 (4G7) anti-CD19

**DIVMTQAAPSIPTPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGGTAFTLRISRVEAE**  
**4G7-VL**

**DVGYYVYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPKRVQWVDNALQSGNSQES**  
CL

**VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC**

**Figura 8**

# ES 2 763 598 T3

**SEQ ID NO: 38** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (BV10) anti-FLT3 con modificaciones SDIE e IL15 mutante

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSDYNAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMN

**BV10-VH**

SLQADDTAIYYCARKGGIYYANHYYAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS

CH1

WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPPCP**PELLGG

**Bisagra**

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

CH2

GKEYKCKVSNKALPAPKEKISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TTTP

**CH3**

PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**SNWV**

**Enlazador**

NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLKLVISLESGDASIHDTVENLILANNLSNNGNVTESGCK

**IL15mut**

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINIS**

**SEQ ID NO: 39** Cadena ligera de IgG1 (BV10) anti-FLT3

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQLLNSGNQKNYMAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVDRFTGSGSGTDFLTISIV

**Kro23-VL**

QAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES

CL

VTEQDSKSTYLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

## Figura 9

**SEQ ID NO: 40** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (4G8) anti-FLT3 con modificaciones SDIE e IL15 mutante

QVQLQQPGAELVKPGASLKLCKSSGYFTFSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQKFKDKATLTVDRSSNT

**4G8-VH**

AYMHLSSLTSDSDAVYYCARAITTPDFEWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS

CH1

# ES 2 763 598 T3

WNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPPCP**APPELLGG

*Bisagra*

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAPKEKTIKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
CH3

**PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG**SNWV**  
Enlazador

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLKLVISLES GDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
IL15mut

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 41** Cadena ligera de IgG1 (4G8) anti-endoglina

**DIVLTQSPATLSVTPGDVSVLSCRASQSISSNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQISGISRFSGSGSGTDFTLSINSVETED**

4G8-VL

**FGVYFCQQSNTWPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES**

CL

VTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## Figura 10

**SEQ ID NO: 42** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (J591) anti-PSMA con modificaciones SDIE e IL15 de tipo silvestre

**EVQLQQSGPELVKPGTQSVRIKCTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTJ591-VH**

**AYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLVSS** ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
CH1

WNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPPCP**APPELLGG  
*Bisagra*

PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLWLN  
CH2

GKEYKCKVSNKALPAPKEKTIKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
CH3

ES 2 763 598 T3

**PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWV**

**Enlazador**

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
*IL15mut*

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 43** Proteína de fusión de la cadena pesada de IgG1 (J591) anti-PSMA con modificaciones SDIE e IL15 mutante (E46K)

**EVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTFEYTIHWVKQSHGKSLIEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSSSTJ591-VH**

**AYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGGGTTLVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS**  
CH1

**WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG**  
*Bisagra*

**PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN**  
CH2

**GKEYKCKVSNKALPAAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP**  
CH3

**PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSNWV**

**Enlazador**

**NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLLKLVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCK**  
*IL15mut*

**ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS**

**SEQ ID NO: 44** Cadena ligera de IgG1 (J591) anti-PSMA

**NIVMTQSPKMSMSVGERVTLTCKASENVVTVYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAED**  
J591-VL

**LADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES**  
CL

**VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**