

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 426**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 14/56	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2013 PCT/US2013/028899**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134138**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2013 E 13758471 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2822575**

54 Título: **Moléculas de fusión anticuerpos-mutante de interferón modificadas**

30 Prioridad:

03.03.2012 US 201261634565 P

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

30.12.2020

73 Titular/es:

**IMMUNGENE, INC (100.0%)
558 St. Charles Drive, Suite 200
Thousand Oaks, CA 91320, US**

72 Inventor/es:

**GREWAL, IQBAL;
KHARE, SANJAY, D.;
GRESSER, MICHAEL y
SYED, RASHID**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 800 426 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

Moléculas de fusión anticuerpos-mutante de interferón modificadas

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] El campo de la presente invención se refiere a moléculas de fusión modificadas genéticamente, a métodos para fabricar dichas moléculas de fusión y a sus usos en inmunoterapias antitumorales.

10 TÉCNICA ANTERIOR

[0002] El interferón es una citocina importante que tiene múltiples efectos sobre la respuesta inmune (Theofilopoulos et al., Annu. Rev. Immunol., 23: 307-336, 2005). Los interferones incluyen interferones tipo 1 (p. ej., Interferón alfa (IFN- α) e interferón beta (IFN- β)) e interferones tipo 2 (p. ej., Interferón gamma (IFN- γ)). Todos los IFN tipo 1 son reconocidos por un receptor compartido (IFN- α R) compuesto por dos proteínas transmembrana, IFN- α R1 e IFN- α R2. Se sabe que los IFN- α inhiben la angiogénesis (Sidky YA y EC Borden, Cancer Res., 47:5155, 1987), median la estimulación y la diferenciación de las células dendríticas (Santini et al., J Exp Med, 191:1777, 2000), y son importantes en la proliferación *in vivo*, la expansión y la supervivencia a largo plazo de las células T CD8+ específicas de antígeno (Tough DF et al., Science, 272:1947, 1996). Aunque se describió por primera vez por su capacidad para inhibir la replicación viral, los IFN- α tienen múltiples propiedades que exhiben efectos antiproliferativos, inducción de apoptosis (Rodríguez-Villanueva J y TJ McDonnell, Int J Cancer, 61:110, 1995) e inducción de el gen supresor de tumores, P53, en células tumorales (Takaoka A et al., Nature, 424: 516, 2003). Por lo tanto, los IFN- α fueron las primeras proteínas recombinantes utilizadas para el tratamiento de varios tipos de cáncer.

[0003] US 2010/172868 A1 describe proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de cáncer fusionado a un interferón alfa o interferón beta. Kalie y col., Journal of Biological Chemistry, vol. 282, n° 15, 1 de abril de 2007, páginas 11602-11611 describe un mutante de interferón alfa 2 que tiene una mayor afinidad de unión por el receptor de interferón que da como resultado actividades antitumorales mejoradas.

[0004] Desafortunadamente, el uso de IFN- α para tratar el cáncer se ha visto limitado por su corta vida media y las toxicidades sistémicas asociadas (Weiss K, Semin Oncol, 25: 9, 1998; Jones GJ e Itri LM, Cancer, 57:1709, 2006). Debido a la corta vida media *in vivo* de IFN- α , se requiere una administración frecuente. Los estudios farmacocinéticos (PK) han indicado que solo el 0,01% del IFN- α inyectado por vía subcutánea alcanza el sitio del tumor diana (Suzuki K et al., Gene Ther., 10 (9): 765-773, 2003). Los eventos adversos más comunes asociados con la terapia con IFN- α son síntomas similares a la gripe, fatiga, anorexia y reacciones del sistema nervioso central y psiquiátricas, y algunos de estos efectos secundarios pueden llegar a limitar la dosis (Jones GJ e Itri LM, Cancer, 57:1709, 2006). Dadas estas limitaciones, es difícil lograr concentraciones efectivas de IFN- α en sitios de enfermedad maligna sin causar toxicidad sistémica. Las limitaciones de la terapia sistémica con IFN- α han llevado a la exploración de estrategias alternativas para administrar IFN- α de manera segura y efectiva en la vecindad del tumor.

40 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] La presente invención se refiere a nuevas moléculas mutantes (IFN- α) de anticuerpo (Ab) interferón alfa de antígeno asociado (AAT) al tumor modificado genéticamente.

[0006] En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de fusión por ingeniería genética que comprende un AAT Ab unido a una molécula mutante IFN- α , la molécula mutante IFN- α que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:13, en donde R149 es A y en donde R162 es A, y en donde dicho anticuerpo está unido directamente a dicha molécula mutante de IFN- α , en donde dicha molécula de fusión cuando se pone en contacto con una célula tumoral da como resultado la muerte o inhibición del crecimiento o la proliferación de dicha célula tumoral.

[0007] Como también se describe pero no se reivindica, la molécula mutante de interferón alfa de las moléculas de fusión por ingeniería genética comprende una molécula humana mutada IFN alfa que comprende 2 al menos una mutación en la SEQ ID NO:13, en donde dicha mutación se selecciona del grupo compuesto por H57Y, E58N, Q61S, H57S, E58S, H57A, E58A, Q61A, R149A, R162A, L30A, D35E, E165D, L26A, F27A, L135A, A145V; y combinaciones de los mismos.

[0008] En diversas realizaciones, la molécula de fusión comprende un anticuerpo AAT seleccionado del grupo que consiste en anti-HER2/neu, anti-HER3, anti-HER4, anti-CD4, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD25, anti-CD33, anti-CD138, anti-CD200, anti-CD276, anti-CXCR3, anti-CXCR5, anti-CCR3, anti-CCR4, anti-CCR9, anti-CRTH2, anti-PMCH y anticuerpo anti-endoplasmina.

[0009] Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-HER2/neu y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

[0010] Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD20 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

5 **[0011]** Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende una 138 de anticuerpo anti-CD y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

[0012] Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-endoplasmina y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

10 **[0013]** Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD33 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

[0014] Como se describe en el presente documento, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD276 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende la mutación F27A en SEQ ID NO:13.

15 **[0015]** En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-HER2/neu y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

[0016] En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD20 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

20 **[0017]** En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD138 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

25 **[0018]** En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-endoplasmina y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

[0019] En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD33 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

30 **[0020]** En una realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo anti-CD276 y una molécula IFN- α 2 humana mutada que comprende las dos mutaciones R149A y R162A en SEQ ID NO:13.

35 **[0021]** En otra realización, la molécula de fusión comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv y diacuerpos.

40 **[0022]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, y el método de preparación de dicha composición farmacéutica, en donde dicha composición comprende la molécula de fusión por ingeniería genética de la presente invención como un ingrediente activo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 **[0023]** También se describe un método para tratar tumores o metástasis tumorales en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o como parte de un régimen de terapia de combinación) de una molécula de fusión por ingeniería genética de la presente invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha administración promueve la regresión tumoral y/o la muerte tumoral.

50 **[0024]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a la molécula de fusión de la presente invención para su uso en el tratamiento de tumores o metástasis tumorales en un paciente.

55 **[0025]** También se describen ácidos nucleicos que codifican las moléculas de fusión modificadas por ingeniería genética de la presente invención; vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de fusión de la invención, opcionalmente, unidas operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; células huésped que comprenden vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de fusión de la invención; un proceso para producir una molécula de fusión de la invención que comprende cultivar células huésped que comprenden vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de fusión de la invención para que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recupere la molécula de fusión del medio de cultivo de la célula huésped. Opcionalmente, el ácido nucleico codifica una molécula de fusión que comprende un anticuerpo antígeno asociado a tumor unido a una molécula mutante de interferón. Opcionalmente, el ácido nucleico codifica un enlazador peptídico (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que une el anticuerpo a la molécula mutante de interferón.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 **[0026]**

La Figura 1 representa un diseño propuesto para una molécula de fusión genéticamente modificada de la presente invención. En la Figura 1, los óvalos etiquetados como V_L , V_H , C_L , C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} representan un anticuerpo de longitud completa (Ab) como se define aquí. El óvalo marcado con C representa una citocina, por ejemplo, un mutante IFN- α . Un enlazador está representado por la línea ondulada. Como se muestra en la Figura 1, C se une al Ab a través de un conector en los dos sitios C_{H3} . En una realización alternativa, C se une al Ab a través de un conector en los dos sitios V_L . En otra realización alternativa más, C se unirá al Ab a través de un conector en los dos sitios V_H . En otra alternativa más, C se unirá al Ab a través de un enlazador en un sitio interno en lugar de en los sitios C_{H3} , V_L o V_H .

La Figura 2 representa otro diseño propuesto para una molécula de fusión genéticamente modificada de la presente invención. En la Figura 3, los óvalos etiquetados como V_L , V_H , C_L , C_H , C_{H1} y C_{H2} representan un Fab₂ como se define aquí. El óvalo etiquetado con C representa una citocina. Un enlazador está representado por la línea ondulada. Como se muestra en la Figura 3, C está unido al Fab₂ a través de un conector en los dos sitios C_{H2} . En una realización alternativa, C se unirá al Fab₂ a través de un conector en los dos sitios V_L en lugar de los sitios C_{H2} . En otra alternativa más, C se unirá al Fab₂ a través de un conector en los dos sitios V_H en lugar de dos sitios V_L o dos sitios C_{H2} . En otra alternativa más, C se unirá al Fab₂ a través de un enlazador en un sitio interno en lugar de en los sitios C_{H2} , V_L o V_H .

La Figura 3 representa otro diseño propuesto para una molécula de fusión genéticamente modificada de la presente invención. En la Figura 4, los óvalos etiquetados como V_L , V_H , C_L y C_{H1} representan un Fab como se define aquí. El óvalo etiquetado con C representa una citocina. Un enlazador está representado por la línea ondulada. Como se muestra en la Figura 3, C está unido al Fab a través de un enlazador en el sitio C_{H1} . En una realización alternativa, C se unirá al Fab a través de un conector en el sitio V_L en lugar del C_{H1} . En otra alternativa más, C se unirá al Fab a través de un enlazador en el sitio V_H en lugar de los sitios V_L o C_{H1} . En otra alternativa más, C se unirá al Fab a través de un vinculator en un sitio interno en lugar de en los sitios C_{H1} , V_L o V_H .

Listas de secuencias

[0027] Las secuencias de aminoácidos enumeradas en la secuencia de acompañamiento que se muestran utilizando un código estándar de tres letras para los aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822.

La SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-Her2/neu en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-Her2/neu en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD20 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD138 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD138 en donde los residuos de aminoácidos 1-22 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-endoplasmina en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-endoplasmina en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD33 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD33 en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD276 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal. La SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD276 en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

La SEQ ID NO:13 es la secuencia de aminoácidos de una molécula IFN- α 2 de tipo silvestre humano.

La SEQ ID NO:14 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador peptídico.

La SEQ ID NO:15 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador peptídico.

MODO(S) PARA REALIZAR LA INVENCION

[0028] La patente de EE.UU. n° 8,258,263 (Morrison et al.) demuestra que IFN- α de tipo silvestre diana (en peso) puede tener un índice terapéutico considerablemente mayor que no específica wtIFN- α , por lo que es posible administrarlo a dosis efectivas. Específicamente, Morrison et al. demostró que varias construcciones químicas de antígeno asociado a tumor Ab-wtIFN- α demostraron una eficacia terapéutica sustancialmente mejorada (~100 veces más potente), con una reducción aparente de la toxicidad sistémica, en comparación con wtIFN- α no fusionado.

[0029] En diversas realizaciones de la presente invención, moléculas de fusión modificadas por ingeniería genética que comprenden un anticuerpo de antígeno asociado a tumor unido a través de un enlazador a una molécula mutante IFN- α se preparan para los fines de la utilización de la especificidad del anticuerpo para dirigir la molécula mutante IFN- α a las células tumorales.

[0030] Las moléculas mutantes IFN- α utilizadas en la preparación de las moléculas de fusión de la presente descripción tienen varias afinidades por el complejo IFN α R. Los presentes inventores evalúan la relación entre la afinidad de IFN α R y el índice terapéutico *in vitro*, y la eficacia antitumoral de la proteína de fusión *in vivo*, e identifican moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α que demuestran un índice terapéutico mejorado y eficacia *in vivo* preservada o mejorada, en comparación con las moléculas de fusión Ab-wtIFN- α . Los presentes inventores también identifican moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α que demuestran propiedades PK mejoradas en comparación con una molécula de fusión Ab-wtIFN- α . El índice terapéutico se define como: la CE₅₀ de la molécula de fusión mutante de Ab-IFN α para células que expresan el antígeno reconocido por el Ab y que expresan IFN α R ("dirigido") dividido por la CE₅₀ de la molécula de fusión mutante de Ab-IFN α para células que expresan solo IFN α R ("no dirigido"). La eficacia se define como la potencia de la molécula de fusión para matar las células cancerosas que expresan el antígeno al que se une la porción Ab de la molécula de fusión.

[0031] El enfoque utilizado para identificar tales moléculas de fusión mutantes de Ab-IFN- α es el siguiente: 1) se preparó un mutante IFN- α ; 2) se preparó un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumor; 3) varias moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α que comprenden los mutantes y anticuerpos IFN- α de los pasos 1) y 2) se construyeron mediante conjugación química o unión directa mediante un conector; 4) los conjugados químicos resultantes o las moléculas de fusión se probaron sistemáticamente, a dosis variables, en varios ensayos funcionales *in vitro* para identificar aquellos que tenían un índice terapéutico mejorado; y 5) se realizaron estudios *in vivo* utilizando conjugados químicos o moléculas de fusión que demuestran el mejor índice terapéutico para determinar la eficacia en el tratamiento de tumores *in vivo*. Como se relaciona específicamente con el paso 4), se usaron ensayos funcionales *in vitro* para determinar: a) la capacidad de las moléculas de fusión para unirse al complejo IFN- α R en células no diana; b) la capacidad de la molécula de fusión para unirse a las células que expresan el complejo IFN- α R y el antígeno dirigido por el Ab; c) la capacidad de la molécula de fusión para unirse al receptor FcRn; d) la bioactividad de IFN- α de las moléculas de fusión en células no diana; e) la actividad antiproliferativa de las moléculas de fusión en las células diana; y f) la capacidad de la molécula de fusión para inducir apoptosis. Como se relaciona específicamente con el paso 5), se usaron ensayos *in vivo* para: a) confirmar la eficacia de una fusión dada para tratar tumores; y b) confirmar propiedades PK mejoradas para una molécula de fusión dada.

Definiciones

[0032] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos normales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en conexión con las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en este documento son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1990). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. La terminología utilizada en conexión con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en este documento es bien conocida y comúnmente utilizada en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, composición y administración, y tratamiento de pacientes.

[0033] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" preferidas son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos alfa están unidos a través de enlaces peptídicos. Por lo tanto, el aminoácido terminal en un extremo de la cadena (terminal amino) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (terminal carboxilo) tiene un grupo carboxilo libre. Como se usa en el presente documento, el término "terminal amino" (término N abreviado) se refiere al grupo α -amino libre en un aminoácido en el terminal amino de un péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa en un péptido enlace) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. De manera similar, el término "carboxilo terminal" se refiere al grupo carboxilo libre en el carboxilo terminal de un péptido o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido que incluye, pero no se limita a, miméticos de péptidos tales como aminoácidos unidos por un éter en oposición a un enlace amida.

[0034] El término "fragmento de polipéptido" como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que tiene un amino-terminal y/o deleción carboxi-terminal en comparación con una proteína de longitud completa correspondiente. Los fragmentos pueden tener, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud. Los fragmentos también pueden ser, por ejemplo, como máximo 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede comprender además, en uno o ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína natural diferente (por ejemplo, un dominio de cremallera de Fc o leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (p. ej., una secuencia enlazadora artificial).

[0035] Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos que han sido modificados en cualquier forma y por cualquier razón, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para la formación de complejos de proteínas, (4) alterar las afinidades de unión, y (5) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos) se pueden realizar en la secuencia natural (por ejemplo, en la porción del polipéptido fuera del dominio que forma contactos intermoleculares). Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella que no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (p. ej., un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que ocurre en la secuencia parental, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia principal o son necesarios para su funcionalidad). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en el técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, NY (1991)); y Thornton y col. (1991) *Nature* 354:105).

[0036] Una "variante" de un polipéptido comprende una secuencia de aminoácido en donde uno o más residuos de aminoácidos están insertados en, suprimidos de y/o sustituidos en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. Las variantes de la invención incluyen proteínas de fusión.

[0037] Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido que ha sido modificado químicamente, por ejemplo, la conjugación a otro resto químico tal como, por ejemplo, polietilenglicol, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), fosforilación, y glicosilación.

[0038] El término "molécula aislada" (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido, un polinucleótido, o un anticuerpo) es una molécula que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza. Por lo tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se expresa en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente, será "aislada" de sus componentes asociados naturalmente. Una molécula también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. La pureza u homogeneidad de la molécula se puede analizar por varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptido puede analizarse usando electroforesis en gel de poli(acrilamida) y tinción del gel para visualizar el polipéptido usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para ciertos fines, se puede proporcionar una resolución más alta usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

[0039] Como se usa en este documento, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina y que tiene especificidad para un antígeno tumoral o especificidad para una molécula sobreexpresada en un estado patológico. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los subtipos de estos genes y una miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural típica de inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

[0040] En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} (y en algunos casos, C_{H4}). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se

compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR₁, CDR₁, FR₂, CDR₂, FR₃, CDR₃, FR₄. Se ha definido la extensión de la región marco y las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos Kabat ahora se mantiene en línea y se pueden determinar las secuencias de CDR, por ejemplo, ver la versión del programa IMG/VT-QUEST: 3,2,18., 29 de marzo de 2011, disponible en Internet y Brochet, X. *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 36: 503-508, 2008). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie, como los humanos. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

[0041] Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR₁, CDR₂, CDR₃, numeradas secuencialmente desde el extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena en donde se encuentra la CDR particular. Por lo tanto, una V_H CDR₃ se encuentra en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en donde se encuentra, mientras que una V_L CDR₁ es la CDR₁ del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en donde se encuentra. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente involucradas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR).

[0042] El término "región Fc" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que puede ser generada por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}, y opcionalmente comprende un dominio C_{H4}. La porción Fc de un anticuerpo media en varias funciones efectoras importantes, p. ej. inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la vida media/tasa de eliminación de complejos de anticuerpos y antígeno-anticuerpo (por ejemplo, el FcR neonatal (FcRn) se une a la región Fc de IgG a pH ácido en el endosoma y protege a la IgG de la degradación, contribuyendo así a la larga vida media en suero de la IgG). Los reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Winter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5,648,260 y 5,624,821).

[0043] Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos Fab₂, F(ab)₂, proteínas Fv de cadena sencilla ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"), que se unen al antígeno diana. Una proteína scFv es una proteína de fusión en donde una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un conector, mientras que en dsFvs, las cadenas han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. Si bien varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante, que incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv y diacuerpos. En diversas realizaciones, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab₂, IgG, IgM, IgA, IgE y anticuerpos de cadena sencilla Fv (scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o a través de un péptido conector) para formar un polipéptido continuo.

[0044] Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena polipeptídica comprende regiones V_H y V_L unidas por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos regiones en la misma cadena, por lo tanto permitiendo que cada región se empareje con una región complementaria en otra cadena de polipéptidos (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6444-48 (1993), y Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-23 (1994)). Si las dos cadenas de polipéptidos de un diacuerpo son idénticas, entonces un diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión a antígeno idénticos. Las cadenas de polipéptidos que tienen diferentes secuencias se pueden usar para hacer un diacuerpo con dos sitios de unión a antígeno diferentes. De manera similar, las tricuerpos y los tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas de polipéptidos, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

[0045] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos utilizados en los constructos de la presente invención pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos o fragmentos biespecíficos pueden tener varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos individuales (o fragmentos de anticuerpos) pero tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes (regiones variables). En diversas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (Kranz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 78: 5807, 1981), mediante técnicas de "polidoma" (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4,474,893), o por técnicas de ADN recombinante. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, al menos uno de

los cuales es un antígeno asociado a tumor. En diversas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión a anticuerpos (por ejemplo, Fab) unidos, cada anticuerpo o fragmento tiene una especificidad diferente.

5 **[0046]** El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de sustancialmente anticuerpos homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un solo antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular.

15 **[0047]** El término "anticuerpo quimérico" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo que tiene restos de marco de una especie, tales como humanos, y las CDR (que en general confieren unión a antígeno) de otra especie, tales como un anticuerpo murino que se une específicamente antígeno dirigido.

20 **[0048]** El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen variables y constantes regiones derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR₃. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

30 **[0049]** El término "anticuerpo humanizado", como se usa aquí se refiere a un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. El marco aceptor de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir mediante ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5,585,089).

35 **[0050]** El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión transfectado recombinante en una célula huésped; anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos; anticuerpos aislados de un animal no humano (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana; o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique la unión de secuencias del gen de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas realizaciones, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico no humano para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan y están relacionadas con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*. Todos esos medios recombinantes son bien conocidos por los expertos en la materia.

50 **[0051]** Una proteína de unión de antígeno que incluye un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno si se une al antígeno con una afinidad de unión como se determina por una constante de disociación alta (K_d, o correspondiente K_b, como se define más adelante) de al menos 1×10^{-6} M, o al menos 1×10^{-7} M, o al menos 1×10^{-8} M, o al menos 1×10^{-9} M, o al menos 1×10^{-10} M, o al menos 1×10^{-11} M. Una proteína de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno humano de interés también puede unirse al mismo antígeno de interés de otras especies, con las mismas o diferentes afinidades.

60 **[0052]** Un "epítomo" es la porción de una molécula que está unida por una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). Un epítomo puede comprender porciones no contiguas de la molécula (por ejemplo, en un polipéptido, los residuos de aminoácidos que no son contiguos en la secuencia primaria del polipéptido pero que, en el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del polipéptido, están lo suficientemente cerca uno del otro para que se unan por una proteína de unión a antígeno).

65 **[0053]** Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente a lo largo e incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos y análogos de nucleótidos

no naturales), e híbridos de los mismos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco de lectura abierto contiguo que codifica un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína o variante del mismo, de la invención.

5 **[0054]** Dos polinucleótidos monocatenarios son "el complemento" uno del otro si sus secuencias pueden ser alineados en una orientación antiparalela de tal manera que cada nucleótido en un polinucleótido está enfrente de su nucleótido complementario en el otro polinucleótido, sin la introducción de huecos, y sin nucleótidos no apareados en el extremo 5' o 3' de cualquiera de las secuencias. Un polinucleótido es "complementario" a otro polinucleótido si los dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí en condiciones moderadamente estrictas. Por lo tanto, un polinucleótido puede ser complementario a otro polinucleótido sin ser su complemento.

15 **[0055]** Un "vector" es un ácido nucleico que puede ser utilizado para introducir otro ácido nucleico ligado a él en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN de doble cadena lineal o circular en donde se pueden ligar segmentos de ácido nucleico adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), en donde se pueden introducir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en donde se introducen (p. ej., vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

25 **[0056]** Una secuencia de nucleótidos está "unida operativamente" a una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, el tiempo, o la ubicación de la expresión) de la secuencia de nucleótidos. Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que afecta la expresión (por ejemplo, el nivel, el momento o la ubicación de la expresión) de un ácido nucleico al que está operativamente unido. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o mediante la acción de una o más moléculas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o al ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Otros ejemplos de secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California y Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 3605-06.

35 **[0057]** Una "célula huésped" es una célula que se puede utilizar para expresar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de la invención. Una célula huésped puede ser una procarionota, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser una eucariota, por ejemplo, una eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, un tabaco o tomate célula vegetal), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Típicamente, una célula huésped es una célula cultivada que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que luego puede expresarse en la célula huésped. La frase "célula huésped recombinante" se puede usar para denotar una célula huésped que se ha transformado o transfectado con un ácido nucleico para ser expresado. Una célula huésped también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero no lo expresa al nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula huésped de modo que se una operativamente unida al ácido nucleico. Se entiende que el término célula huésped se refiere no solo a la célula objeto particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido, por ejemplo, a la mutación o la influencia ambiental, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula madre, pero aún se incluye dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

50 Antígenos y anticuerpos asociados a tumor

[0058] El término "antígeno" tal como se utiliza aquí se refiere a un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan o se absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por inmunógenos heterólogos. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. Los epítopos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos tres, al menos cinco, o al menos ocho a diez aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

65 **[0059]** Como se refiere a "antígenos selectivos", virtualmente cualquier antígeno puede ser objetivo de las moléculas de la presente invención. Ciertos antígenos dirigidos incluyen aquellos asociados con una patología caracterizada por la hiperproliferación de una célula (es decir, un trastorno hiperproliferativo). Los trastornos hiperproliferativos ilustrativos incluyen, entre otros, psoriasis, neutrofilia, policitemia, trombocitosis y cáncer. Los trastornos

hiperproliferativos caracterizados como cáncer incluyen, entre otros, tumores sólidos, cánceres de mama, tracto respiratorio, cerebro, órganos reproductivos, tracto digestivo, tracto urinario, ojos, hígado, piel, cabeza y cuello, tiroides, paratiroides y sus metástasis a distancia. Estos trastornos también incluyen linfomas, sarcomas, mielomas múltiples y leucemias. Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, entre otros, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ. Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, entre otros, el tronco encefálico y el glioma hipofthalmológico, el astrocitoma cerebeloso y cerebral, el meduloblastoma, el ependimoma, así como el tumor neuroectodérmico y pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, entre otros, el cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, entre otros, cáncer endometrial, cervical, de ovario, vaginal y vulvar, así como sarcoma del útero. Los tumores del tracto digestivo incluyen, entre otros, cáncer de colon, colon, colorrectal, esofágico, vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, de intestino delgado y de glándulas salivales. Los tumores del tracto urinario incluyen, entre otros, cánceres de vejiga, pene, riñón, pelvis renal, uréter y uretra. Los cánceres oculares incluyen, entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma. Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen, entre otros, carcinoma hepatocelular (carcinomas de células hepáticas con o sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma de conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, entre otros, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel no melanoma. Los linfomas incluyen, entre otros, el linfoma relacionado con el SIDA, el linfoma no Hodgkin, el linfoma cutáneo de células T, la enfermedad de Hodgkin y el linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, entre otros, sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rhabdomyosarcoma. Las leucemias incluyen, entre otras, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas.

[0060] En diversas realizaciones de la presente invención, el resto de direccionamiento es un resto que se une a un marcador de cáncer, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor (AAT). Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de marcadores de cáncer. Los marcadores de cáncer no necesitan ser únicos para las células cancerosas, sino que también pueden ser efectivos cuando la expresión del marcador de cáncer es elevada en una célula cancerosa (en comparación con las células sanas normales) o donde el marcador de cáncer no está presente en niveles comparables en tejidos circundantes (especialmente donde la molécula de fusión se entrega localmente). En diversas realizaciones, el marcador de cáncer incluye: Her2/neu (Lewis y col., *Semin. Cancer Biol.*, 6 (6): 321-327, 1995), Her3, EGF, Her4, miembros de la familia B7 (Collins y col., *Genome Biol.*, 6:223,1-223,7, 2005), los miembros de la superfamilia TNF (ver, por ejemplo, "Therapeutic Targets of the TNF Superfamily", editado por Iqbal S. Grewal, Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC dual imprint / Springer series: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2009), CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20 (Cragg et al., *Curr. Dir. Autoimmun.*, 8:140-174, 2005), CD21, CD23, CD25, CD33 (Nakase et al., *Am J Clin Pathol.*, 105 (6): 761-768, 1996), CD34, CD38, CD46, CD55, CD59, CD123, CD138 (O'Connell, et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 121 (2): 254-263, 2004), CD200, CD276 (Hofmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 105 (30):10277-10278, 2008), 5E10, CEA, endoplasmina (Solicitud de Patente de EE.UU. N° US20120009194 (Ferrone et al)), HLA-DR, HM 1,24, HMB 45, la, Leu-M1, MUC1, PMSA, EGFR, glicosfingolípido GD2, miembros de la familia SLAM, gp100, tirosinasa, MAGE, TAG-72, SE10, antígeno de fosfatidilo serina y similares. Las moléculas de fusión genéticamente modificadas de la presente invención pueden unirse a un antígeno o múltiples marcadores de cáncer.

[0061] Los anticuerpos para estos y otros marcadores de cáncer son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden obtener producidos comercialmente o fácilmente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser producidos mediante la inmunización de un animal con un antígeno diana o un fragmento inmunogénico del mismo y el aumento de los anticuerpos en dicho animal, y anticuerpos de cadena sencilla pueden producirse usando tecnología de presentación de fagos de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos contemplados para su uso como restos de direccionamiento en las moléculas de fusión de la presente invención incluyen anticuerpos empobrecedores contra antígenos asociados a tumores específicos, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-HER2/neu, anti-HER3, anti-HER4, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD22, anti-CD33, anti-CXCR3, anti-CXCR5, anti-CCR3, anti-CCR4, anti-CCR9, anti-CRTH2, anti-PMCH, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD200, anti-CD138, anti-CD276 y anti-endoplasmina. Todos estos anticuerpos de agotamiento específicos de células inflamatorias y tumorales han sido bien descritos en la literatura.

[0062] En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-Her2/neu, que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:1:

MECSWVMLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD
TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL
QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
5 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
10 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

15 en donde residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2:

MEWSCVMLFLLSVTAGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNT
20 AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPE
DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFEPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

25 en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal.

[0063] En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20 que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 3:

30 MYLGLNCVHIVFLLKGVQSQVQLQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTS
YNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
35 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
40 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

en donde residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 4:

45 MKLPVRLLVLMFWIPASSSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSY
IHWYQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAED
AATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
50 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTL
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal.

55 **[0064]** En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD138, que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 5:

MGWSYIILFLVATATDVHSQVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSN
 YWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNTVQM
 5 QLSSTSEDSAVYYCARRDYGNFYAMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 10 ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)

15 en donde residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6:

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQG
 20 INNYLNWYQQKPDGTVELLIYTTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL
 EPEDIGTYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

25 en donde los residuos de aminoácidos 1-22 representan un péptido señal.

[0065] En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-endoplasmina que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7:

MYLGLNCVIIIFLLKGVQSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTS
 30 YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTASAYM
 ELSSLRSEDTAVYYCARAHFDYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 35 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 40 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 7)

en donde los residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 8:

MEAPAQLLFLLLLWLPDPTTGEIELTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQIS
 45 SYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP
 EDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 50 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8)

en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

[0066] En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD33 que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 9:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITD
 60 SNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYM
 ELSSLRSEDTAFYVCVNGNPWLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS

65

KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

en donde residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10:

MSVPTQVLGLLLLWLTARCDIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLD
 NYGIRFLTWFQKPKGAPKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
 SLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSL
 STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10)

en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

[0067] En diversas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD276, que comprende la variable de cadena pesada región que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 11:

MNFGFRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVPGGSLKLSCEASRFTFSS
YAMSWVRQTPEKRLWVAAISGGGRYTYYPDSMKGRFTISRDNAKNFLYL
QMSSLRSEDTAMYCARHYDGYLDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPG
 SL (SEQ ID NO: 11)

en donde residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal; y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO:12:

MKSQSQVFVFLWLSGVDGDIVMTQFAGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDR
 VSITCKASQDVSTTVAWYQKPGQSPKLLIYSASRYRTGVPDRFTGSGSG
 TDFTFITISSVQAEDLAVYYCQHQHYSTPPTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIF
 PPSSKLG (SEQ ID NO: 12)

en donde los residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal.

Interferón y mutantes de interferón

[0068] El término "interferón" se refiere a un interferón de longitud completa o a un fragmento de interferón (interferón truncado) o un mutante de interferón (interferón truncado y mutante de interferón que se refiere colectivamente en este documento como "interferón modificado"), que retiene sustancialmente la actividad biológica del interferón de tipo silvestre de longitud completa (por ejemplo, retiene al menos el 50%). Los interferones incluyen interferones tipo I (p. ej., interferón alfa e interferón beta), así como interferones tipo II (p. ej., interferón gamma). El interferón puede ser esencialmente de cualquier especie de mamífero. La Patente de Estados Unidos N° 6,610,830 (Goeddel et al.) describe varios interferones leucocitarios humanos maduros, por ejemplo, interferón alfa, útiles en el tratamiento de enfermedades virales y neoplásicas.

[0069] En diversas realizaciones de la presente invención, el mutante de interferón comprende uno o más aminoácidos sustituciones, inserciones, y/o deleciones. Los medios para identificar tales moléculas de interferón modificado son rutinarias para los expertos en la materia. En un enfoque ilustrativo, se produce una biblioteca de IFN- α truncado y/o mutado y se analiza la actividad de IFN- α . Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para producir bibliotecas de variantes de polipéptidos. Por lo tanto, por ejemplo, la PCR propensa a errores puede usarse para crear una biblioteca de IFN- α mutante y/o truncado (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6,365,408). Los miembros de la biblioteca resultantes pueden seleccionarse de acuerdo con métodos estándar conocidos por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, la actividad de IFN- α se puede analizar midiendo la actividad antiviral contra un virus de prueba particular. Los kits para analizar la actividad de IFN- α están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, el kit ILITE™ alfabeta de Neutekbio, Irlanda).

[0070] También se contempla el uso de interferones modificados químicamente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el interferón se modifica químicamente para aumentar la vida media en suero. Así, por ejemplo, (2-sulfo-9-

fluorenilmetoxicarbonil-interferón- $\alpha 2$ experimenta hidrólisis espontánea dependiente del tiempo, generando interferón activo (Shechter et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 98(3): 1212-1217, 2001). Otras modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones N-terminales que incluyen, pero no se limitan a la adición de PEG, grupos protectores, y similares (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5,824,784).

[0071] En diversas realizaciones, también se contempla el uso de interferones truncados. Se ha demostrado que INF α humana, por ejemplo, con deleciones de los primeros 15 restos de aminoácidos amino-terminales y/o los últimos 10-13 restos de aminoácidos carboxilo-terminales, exhibe virtualmente misma actividad que las moléculas progenitoras (véase, por ejemplo, Ackerman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 81:1045-1047). En consecuencia, Se contempla el uso de IFN- α que tienen 1, 2, 3, hasta 13 residuos de aminoácidos carboxilo terminales eliminados y/o 1, 2, 3, hasta 15 residuos de aminoácidos amino terminales eliminados. Se ha demostrado que la actividad reside en fragmento huIFN- α HuIFN- α (1-110) (*Id.*). Por consiguiente, se contemplan los IFN truncados en carboxilo con truncamientos después del residuo 110 y/o con 1, 2, 3, hasta 15 residuos aminoacídicos terminales eliminados.

[0072] Mutaciones de punto individual contempladas para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, una serie de mutantes de punto en su mayoría individuales (véase la Tabla 1 a continuación) diseñados específicamente para aumentar la afinidad entre IFN- α e IFN- α R y otros esperados para disminuir la afinidad entre IFN- α e IFN- α R modelando específicamente los cambios basados en estudios publicados de presentación de fagos y la estructura de RMN (Kalie E et al., J. Biol. Chem., 282:11602, 2007; Gomez D y Reich NC, J. Immunol., 170:5373, 2003; Quadt-Akabayov SR et al., Protein Science, 15:2656, 2006; Akabayov SR et al., Biochemistry, 49:687, 2010). La estrategia se basó en la creencia de que una mutación de un solo punto puede cambiar la afinidad de unión pero no eliminará por completo la actividad de IFN- α , por lo tanto, aún conserva las propiedades antiproliferativas, aunque a concentraciones mucho más altas, es decir, el objetivo es mejorar el índice terapéutico de moléculas de fusión que comprenden los mutantes de interferón alfa en comparación con las moléculas de fusión que comprenden interferón alfa de tipo silvestre. Como se describe en este documento y como se representa en la Tabla 1, se identificará una única mutación mediante la sustitución particular de aminoácidos en una posición de aminoácidos específica dentro de la secuencia de interferón de tipo silvestre de longitud completa. Por ejemplo, una mutación que comprende una tirosina sustituida por la histidina de tipo silvestre de longitud completa en el aminoácido 57 se identifica como H57Y. La secuencia de aminoácidos de tipo silvestre IFN- $\alpha 2$ de la que derivan los mutantes descritos en la Tabla 1 se proporciona a continuación como SEQ ID NO:13:

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKA
 ETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVI
 QGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRS
 FSLSTNLQESLRSKE (SEQ ID NO: 13)

Tabla 1

Lista de ciertas moléculas propuestas de mutantes de IFN- α .		
	Mutaciones de secuencia de IFN- α	Criterios de selección
M1	H57Y, E58N, Q61S	Optimización de visualización de fagos de residuos seleccionados de IFN- α para aumentar la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 del sitio 1
M2	H57S, E58S, Q61S	Disminuya la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 1 en función de las mutaciones triples predichas para provocar una pérdida de contactos de unión entre IFN α e IFN- α R1
M3	H57A	Disminuya la afinidad de unión IFN- α -IFN- α R1 en el Sitio 1 similar a M2 pero solo un punto
M4	E58A	Disminuya la afinidad de unión IFN- α -IFN- α R1 en el Sitio 1 similar a M2 pero solo un punto
M5	Q61A	Disminuya la afinidad de unión IFN- α -IFN- α R1 en el Sitio 1 similar a M2 pero solo un punto
M6	R149A	Disminuya la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 en función de la pérdida de contactos de unión
M7	R162A	Disminuya la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 en función de la pérdida de contactos de unión
M8	R149A, R162A	Disminuya la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 en función de la pérdida de contactos de unión
M9	L30A	Disminuya la afinidad de unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 en función de la pérdida de contactos de unión
M10	D35E	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura

(Continuación)

Lista de ciertas moléculas propuestas de mutantes de IFN- α .			
	Mutaciones de secuencia de IFN- α	Criterios de selección	
5	M11	E165D	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura
	M12	L26A	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura
10	M13	F27A	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura
	M14	L153A	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura
15	M15	A145V	Altere la unión de IFN- α -IFN- α R1 en el sitio 2 basándose en un cambio mínimo en la estructura

[0073] En diversas realizaciones de la presente invención, ya sea el extremo N o extremo C de una cadena de anticuerpo pesada o ligera se construirá genéticamente con uno de varios mutantes interferón alfa contemplados. La molécula de fusión puede tener cualquiera de las construcciones generales como se representa, por ejemplo, en las Figuras 1-3.

[0074] En general, el anticuerpo y la molécula de mutante interferón de las moléculas de fusión modificadas por ingeniería genética de la presente invención se pueden unir en cualquier orden. Así, por ejemplo, la molécula mutante de interferón puede unirse al terminal amino o carboxi del anticuerpo; o, por el contrario, la molécula mutante de interferón puede unirse a una ubicación interna del anticuerpo, siempre que la unión no interfiera con la unión del anticuerpo al antígeno diana. Alternativamente, el anticuerpo puede unirse al terminal amino o carboxi de la molécula mutante de interferón; o unido a una región interna de la molécula mutante de interferón.

[0075] La presente invención se refiere a moléculas de fusión modificadas genéticamente que comprenden al menos un anticuerpo unido a al menos un interferón mutante formado a través de la fusión genética o acoplamiento químico. Por "enlazado" queremos decir que la primera y la segunda secuencia están asociadas de tal manera que la segunda secuencia puede ser transportada por la primera secuencia a una célula diana, es decir, moléculas de fusión en las que el anticuerpo está unido a un mutante de interferón a través de su esqueletos de polipéptido a través de la expresión genética de una molécula de ADN que codifica estas proteínas, proteínas sintetizadas directamente y proteínas acopladas en las que las secuencias preformadas están asociadas por un agente de reticulación. Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos, incluidos los quelatos metálicos de radionúclidos, las toxinas y los fármacos a proteínas como los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N^{os} 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789; y 4,589.071.

[0076] En ciertas realizaciones, el anticuerpo y el interferón mutante están unidos directamente entre sí y se sintetizaron usando la metodología del ADN recombinante, por ejemplo, la creación de una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de mutante de anticuerpo-interferón, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresando la proteína de fusión en un huésped y aislando la proteína de fusión expresada. En una realización de la presente invención, las secuencias de ácido nucleico que codifican el marco de anticuerpo apropiado se clonan y se ligan opcionalmente en vectores apropiados (por ejemplo, vectores de expresión para, por ejemplo, organismos procariontes o eucariotes). Además, las secuencias de ácido nucleico que codifican el mutante de interferón apropiado se clonan opcionalmente en el mismo vector en la orientación y ubicación apropiadas para que la expresión del vector produzca una molécula de fusión de mutante de anticuerpo-interferón. Algunas realizaciones opcionales también requieren modificación posterior a la expresión, por ejemplo, ensamblaje de subunidades de anticuerpos, etc. Las técnicas y la técnica para las manipulaciones anteriores (y similares) son bien conocidas por los expertos en la materia. Las instrucciones pertinentes se encuentran en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2^a Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 y Current Protocols in Molecular Biology, FM Ausubel et al., Eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (suplementado hasta 1999).

[0077] En ciertas realizaciones, las dos moléculas se pueden separar mediante un espaciador peptídico ("enlazador") que consiste en uno o más aminoácidos. Generalmente, el enlazador peptídico no tendrá actividad biológica específica más que unir las proteínas o preservar una distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, en ciertas realizaciones, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula, como el plegamiento, carga neta, o hidrofobicidad. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores de péptidos. En ciertas realizaciones, el (los) enlazador(es) se pueden unir a los aminoácidos constituyentes del anticuerpo y/o el interferón a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a la cisteína). En ciertas realizaciones, los enlazadores se unen

a los grupos alfa carbono amino y/o carboxilo de los aminoácidos terminales del anticuerpo y/o el interferón. En ciertas realizaciones, el conector es un conector resistente a la proteólisis tal como los descritos en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20100172868 (Morrison et al.). En ciertas realizaciones, el enlazador resistente a la proteólisis es SGGGGS (SEQ ID NO:14) o AEAAAKEAAKAGS (SEQ ID NO: 15).

[0078] En ciertas realizaciones alternativas, el anticuerpo se conjuga químicamente a la molécula mutante de interferón. Los medios de las moléculas químicamente conjugadas son bien conocidas por los expertos. El procedimiento para conjugar dos moléculas varía según la estructura química del agente. Los polipéptidos típicamente contienen variedad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos de ácido carboxílico (COOH) o de amina libre (--NH₂), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en el otro péptido, o en un conector para unir las moléculas al mismo. Alternativamente, el anticuerpo y/o el mutante de interferón pueden derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras, como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Ill.

[0079] Las células adecuadas para la replicación y para apoyar la expresión recombinante de la proteína de fusión son bien conocidas en la técnica. Dichas células se pueden transfectar o transducir según sea apropiado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vectores para sembrar fermentadores a gran escala para obtener cantidades suficientes de la proteína para aplicaciones clínicas. Dichas células pueden incluir microorganismos procariontes, tales como *E. coli*; diversas células eucariotas, como las células de ovario de hámster chino (OHC), NSO, 293; levadura HEK; células de insectos; hibridomas; líneas celulares humanas; y animales transgénicos no humanos y plantas transgénicas, y similares. Las tecnologías estándar son conocidas en la técnica para expresar genes extraños en estos sistemas. El gen de la proteína recombinante está típicamente unido operativamente a secuencias de control de expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli*, esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp o lambda, un sitio de unión a ribosomas y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferiblemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias de donante y aceptor de empalme.

[0080] Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y 98 a 99% o más de homogeneidad son las más preferidas para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o con la homogeneidad deseada, los polipéptidos pueden usarse terapéuticamente.

[0081] En ciertas realizaciones, la proteína de fusión expresada puede poseer una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes y puede por lo tanto ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y después hacer que el polipéptido se repliegue en la conformación. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir re-plegamiento son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Debinski et al, J. Biol Chem., 268:14065-14070, 1993).

[0082] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una molécula de fusión modificada genéticamente de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humidificantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo. Excepto en la medida en que cualquier excipiente, vehículo o vehículo convencional sea incompatible con las moléculas de fusión genéticamente modificadas de la presente invención, se contempla su uso en las preparaciones farmacéuticas de la invención.

[0083] Tal como se utiliza aquí, el término "administración" se refiere al acto de administrar un fármaco, profármaco, u otro agente, o tratamiento terapéutico (por ejemplo, la terapia de radiación) a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Las composiciones de esta invención pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas, y supositorios. Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su ruta prevista de administración y aplicación terapéutica. Los métodos para administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención son a través de cualquier ruta capaz de administrar la composición a una célula tumoral e incluyen, pero no se limitan a, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intratumoral, inhalación, subcutánea y similares. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas típicas están en forma de

soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para la inmunización pasiva de humanos. En una realización, la composición es administrada por infusión o inyección intravenosa. En otra realización, la composición se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

5 **[0084]** Las moléculas de fusión de la presente invención y las composiciones farmacéuticas que las comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico o profilácticos. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, inmunomoduladores y otros agentes antineoplásicos, antitumorales, antiangiogénicos o quimioterapéuticos. Dichos agentes adicionales pueden incluirse en la misma composición o administrarse por separado.

10 **[0085]** Las composiciones farmacéuticas terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la molécula de fusión en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

25 **[0086]** En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de compuestos activos se pueden preparar con un vehículo que protegerá la composición contra la liberación rápida, tal como una composición de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales composiciones son patentados o generalmente conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

30 **[0087]** En ciertas realizaciones, las moléculas de fusión de la presente invención se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede encerrar en una cápsula de gelatina con cubierta dura o blanda, comprimirse en tabletas o incorporarse directamente a la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, las moléculas de fusión pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención por otro medio que no sea la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

40 **[0088]** Los compuestos activos adicionales también pueden ser incorporados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. En ciertas realizaciones, la molécula de fusión de la invención se formula conjuntamente y/o se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos que se unen a otras dianas, agentes antineoplásicos, agentes antitumorales, agentes quimioterapéuticos y/u otros agentes conocidos en la técnica que pueden mejorar una respuesta inmune contra las células tumorales, por ejemplo, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ y GMCSF. Dichas terapias combinadas pueden requerir dosis más bajas de la molécula de fusión, así como de los agentes administrados conjuntamente, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

50 **[0089]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de la molécula de fusión de la invención. Como se emplea aquí, la frase "una cantidad efectiva" se refiere a una dosis suficiente para proporcionar concentraciones suficientemente altas para impartir un efecto beneficioso sobre el receptor de la misma. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno a tratar, la gravedad del trastorno, la actividad del compuesto específico, la ruta de administración, la velocidad de eliminación del compuesto, la duración del tratamiento, los medicamentos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto, la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta y la salud general del sujeto, y factores similares bien conocidos en las técnicas y ciencias médicas. Los expertos en la materia conocen diversas consideraciones generales que se tienen en cuenta para determinar la "cantidad terapéuticamente efectiva" y se describen, por ejemplo, en Gilman et al., Eds., Goodman y Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1990. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

65

5 [0090] Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular mediante la determinación de una CI_{50} . Luego, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración plasmática circulante que incluya la CI_{50} determinada en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por HPLC. La composición exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente.

10 [0091] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, un agente terapéutico o profiláctico de respuesta). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas (múltiples o repetidas o de mantenimiento) con el tiempo y la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la presente invención estará dictada principalmente por las características únicas del anticuerpo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se logrará.

20 [0092] Un intervalo no limitante ejemplar para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es de 0,025 a 50 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 50 mg/kg, más preferiblemente 0,1-25, 0,1 a 10 o 0,1 a 3 mg/kg. Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en este documento son ejemplares solo y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

30 [0093] También se describe un método de tratamiento de células de cáncer en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en un régimen de terapia de combinación) de una molécula de fusión genéticamente modificada de la presente invención en vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha administración promueve la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de una célula cancerosa. Específicamente, las moléculas de fusión genéticamente modificadas de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos caracterizados como cáncer. Dichos trastornos incluyen, entre otros, tumores sólidos, como cánceres de seno, tracto respiratorio, cerebro, órganos reproductivos, tracto digestivo, tracto urinario, ojo, hígado, piel, cabeza y cuello, tiroides, paratiroides y sus metástasis a distancia, linfomas, sarcomas, mieloma múltiple y leucemias. Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, entre otros, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal in situ y carcinoma lobular in situ. Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, entre otros, el tronco encefálico y el glioma hipofthalmológico, el astrocitoma cerebeloso y cerebral, el meduloblastoma, el ependimoma, así como el tumor neuroectodérmico y pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, entre otros, el cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, entre otros, cáncer endometrial, cervical, de ovario, vaginal y vulvar, así como sarcoma del útero. Los tumores del tracto digestivo incluyen, entre otros, cáncer de colon, colon, colorrectal, esofágico, vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, del intestino delgado y de las glándulas salivales. Los tumores del tracto urinario incluyen, entre otros, cánceres de vejiga, pene, riñón, pelvis renal, uréter y uretra. Los cánceres oculares incluyen, entre otros, melanoma intraocular y retinoblastoma. Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen, entre otros, carcinoma hepatocelular (carcinomas de células hepáticas con o sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma de conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, entre otros, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel no melanoma. Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, entre otros, cáncer nasofaríngeo y cáncer de labio y cavidad oral. Los linfomas incluyen, entre otros, el linfoma relacionado con el SIDA, el linfoma no Hodgkin, el linfoma cutáneo de células T, la enfermedad de Hodgkin y el linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, entre otros, sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rhabdomyosarcoma. Las leucemias incluyen, entre otras, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas.

60 [0094] Esta invención se refiere también a composiciones farmacéuticas para inhibir el crecimiento celular anormal en un mamífero que comprende una cantidad de una molécula de fusión de la invención en combinación con una cantidad de un quimioterapéutico, en donde las cantidades de la molécula de fusión y del quimioterapéutico son conjuntamente eficaces para inhibir el crecimiento celular anormal. Muchos quimioterapéuticos se conocen actualmente en la técnica. Los agentes quimioterapéuticos pueden ser agentes proteicos o no proteicos, como fármacos de molécula pequeña, anticuerpos, péptidos, proteínas e inmunomoduladores. En algunas realizaciones, el quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa,

modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, por ejemplo, anti-hormonas. andrógenos y agentes antiangiogénesis. Un experto en la materia puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico (por ejemplo, ver Slapak y Kufe, Principles of Cancer Therapy, Capítulo 86 en Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., Chemotherapy, Capítulo 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2ª Ed., COPYRIGHT. 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª Ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D S, Knobf M F, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993).

[0095] Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con más detalle.

Ejemplo 1

[0096] Este ejemplo describe la preparación de moléculas de fusión modificadas genéticamente que comprenden un anticuerpo antigénico asociado a tumor y una molécula mutante IFN- α (o molécula IFN- α de tipo silvestre).

[0097] Las moléculas de fusión de la presente invención se prepararon utilizando métodos y técnicas bien conocidas y entendidas por una persona de experiencia ordinaria en la técnica y se pueden describir generalmente como sigue: la cadena pesada del anticuerpo se ha diseñado de forma recombinante con una molécula IFN- α en el terminal carboxi usando un enlazador peptídico, p. ej., SGGGGS (SEQ ID NO:14) o AEA-AAKEAAKAGS (SEQ ID NO: 15). Después de verificar que el vector de proteína de fusión tiene la secuencia de nucleótidos correcta, se transfectó, junto con el vector de cadena ligera de anticuerpo en células OHC. Los transfectantes fueron seleccionados por ELISA para la producción de la molécula de fusión completa. El clon que daba la señal más alta se expandió y después de la subclonación se cultivó en botellas de rodillos. El medio acondicionado se recogió, se concentró y la proteína de interés se purificó usando un solo paso de cromatografía de afinidad con proteína A o métodos de cromatografía alternativos apropiados. El producto final se formuló en un tampón deseado y a una concentración deseada (la concentración de proteína se confirma mediante absorción UV). La pureza del producto final se determinó mediante SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras como no reductoras. El análisis de transferencia Western se usó para confirmar el tamaño esperado de la molécula.

[0098] En este ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 que comprende la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 3 y la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 para preparar moléculas de fusión Ab-IFN- α que comprenden IFN- α de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13) o una de las quince moléculas mutantes de IFN- α identificadas como M1-M15 en la Tabla 1. Las moléculas se construyeron inicialmente como se muestra en la Figura 1, con las moléculas mutantes IFN- α (o IFN- α de tipo silvestre) unidas mediante el péptido conector SGGGGS (SEQ ID NO: 14) a la cadena pesada del anticuerpo.

Ejemplo 2

[0099] Este ejemplo describe la prueba de las moléculas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α del Ejemplo 1 a diferentes dosis en diferentes ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α con el mejor índice terapéutico. Los ensayos descritos a continuación se usan en el análisis de las moléculas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α .

A. Evaluación de la capacidad de las moléculas de fusión para unirse al complejo IFN- α R

[0100] Se utilizarán varias líneas celulares y métodos previamente descritos en la técnica para determinar la mejor metodología para evaluar la unión de las moléculas de fusión al complejo IFN- α R. Dichos métodos pueden incluir Alexa fluor 555 (Invitrogen), Qdot 565 (Invitrogen) o la metodología primaria/secundaria de Ab FACS (Invitrogen). Las líneas de células que se utilizarán pueden incluir células Daudi, células U266 y células Hel 92,1,7.

[0101] Las células Daudi son células de linfoblastos B y son muy sensibles al efecto inhibitorio de IFN- α en la proliferación celular. La expresión de CD20 en esta línea celular es muy alta, lo que hace que esta línea celular sea muy adecuada para rastrear linfomas de células B CD20 positivas. Un medio base para Daudi es RPMI con L-glutamina 2 mM, b-mercaptoetanol 50 mM y suero bovino fetal al 10%, mantenido en una incubadora a 37 grados y dióxido de carbono al 5% (CO₂). El medio tiene que ser reemplazado cada 2-3 días.

[0102] U266 es una línea celular de mieloma humano (tipo de células de linfocitos B) y es muy sensible al efecto inhibitorio de IFN- α en la proliferación celular. No hay expresión de CD20 en esta línea celular, lo que hace que esta línea celular sea muy adecuada para ser un control negativo. Un medio base para U266 es RPMI con L-glutamina 2 mM, b-mercaptoetanol 50 mM y suero bovino fetal al 10%, mantenido en una incubadora a 37 grados y dióxido de carbono al 5% (CO₂). El medio tiene que ser reemplazado cada 2-3 días.

[0103] Hel 92,1,7 es una línea celular de eritroleucemia humana, que también tiene una expresión negativa de CD20. Un medio base para Hel 92,1,7 es RPMI con L-glutamina 2 mM, b-mercaptoetanol 50 mM y suero bovino fetal al 10%, mantenido en una incubadora a 37 grados y dióxido de carbono al 5% (CO₂). El medio tiene que ser reemplazado cada 2-3 días.

B. Evaluación de la capacidad de las moléculas de fusión para unirse a las células que expresan el CD20

Análisis de citometría de flujo

[0104] Para determinar la unión de la proteína de fusión al CD20, se incubaron células 38C13-huCD20 (1×10^6) con las correspondientes proteínas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α o los reactivos de control. Se confirmó la unión de las proteínas de fusión y se comparó con el anti-CD20Ab no fusionado (RITUXAN® (Genentech)). Las células se hicieron reaccionar con IgG antihumana de rata biotinilada (BD Biosciences), seguido de estreptavidina marcada con PE (BD Biosciences) y luego se analizaron por citometría de flujo utilizando un FACScan (Becton Dickinson) y se analizaron utilizando el software FlowJo (TreeStar Inc).

C. Evaluación de la capacidad de las moléculas de fusión para unirse al receptor FCRN

Biotinilación de HuFCRN/B2MG

[0105] El HuFCRN/B2MG recombinante purificado se solubilizó en PBS a una concentración final de 1 mg/ml. La NHS-LC-biotina se preparó en DMSO a una concentración final de 4 mg/ml. Para un exceso molar ≥ 20 fold de biotina para una solución de proteína de 1 mg/ml, se agregaron 4 ml de biotina/DMSO a la solución de proteína HuFCRN/B2MG de 1 mg/ml (consulte <http://piercenet.com/instructions/2160237.pdf> para instrucciones completas). La biotinilación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se dializó durante la noche en PBS. El reactivo biotinilado se almacenó a 4°C a una concentración de 0,1 mg/ml.

HuFCRN/B2MG - Análisis cinético de Ig:IFN

[0106] Los biosensores SA se prehidrataron en 200 μ l de tampón cinético IX durante 10 minutos en una placa negra de 96 pocillos. Se preparó un mililitro de HuFCRN/B2MG biotinilado a una concentración final de 5 μ g/ml en tampón cinético IX. Ig:IFN se tituló en pasos de 2 veces comenzando a 100 μ g/ml para tres diluciones adicionales con volúmenes finales de 200 μ l cada una. La placa de muestra se configuró de la siguiente manera: durante el protocolo de determinación cinética, el instrumento ForteBio Octet mide la unión en cada pocillo tomando lecturas cada 1,6 segundos durante 2 minutos. Una columna completa de cuatro pozos (filas A-D) se lee en paralelo, en tiempo real, antes de pasar a la siguiente columna.

Tratamiento de datos

[0107] Los datos en bruto adquiridos para la interacción entre el FCRN/B2MG y las moléculas de fusión de Ig:IFN se procesan y se ajustan a una curva con el fin de valores de extracto de k_{on} , k_{dis} y K_D . El procesamiento comienza con la corrección de referencia para compensar la deriva de la señal del biosensor inmovilizado con el tampón de ensayo. Se aplicaron alineación del eje Y, corrección entre pasos y filtros savitzky-Golay. Tenga en cuenta que se pueden usar varios modelos de ajuste de datos dependiendo de las características del conjunto de datos. Las configuraciones de procesamiento específicas pueden variar debido tanto a la configuración experimental como al sistema analito-ligando bajo investigación. Los resultados de los datos de unión de FCRN/B2MG son los siguientes:

Tabla 2

	Kon	Koff	kD	nM
Rituxan	7,15E+05	4,98E-02	6,97E-08	69,70
wlIFN	3,55E+05	2,01E-02	5,67E-08	56,70
M1	1,38E+05	3,11E-03	3,96E-08	39,60
M2	4,10E+04	1,64E-03	3,99E-08	39,90
M3	5,23E+04	9,63E-04	1,84E-08	18,40
M4	7,10E+04	7,90E-04	1,11E-08	11,10
M5	3,21E+05	1,51E-02	4,71E-08	47,10
M6	2,46E+04	4,92E-04	2,00E-08	20,00
M7	8,72E+03	3,24E-04	3,72E-08	37,20
M8	1,19E+04	1,69E-04	1,42E-08	14,20
M9	2,59E+04	5,92E-04	2,29E-08	22,90
M10	3,89E+05	2,08E-02	5,35E-08	53,50
M11	4,05E+05	1,93E-02	4,76E-08	47,60
M12	3,04E+05	2,78E-02	9,14E-08	91,40
M13	8,09E+03	2,20E-04	2,72E-08	27,20
M14	3,78E+05	2,08E-02	5,51E-08	55,10
M15	3,73E+05	1,74E-02	4,66E-08	46,60

[0108] El FcR neonatal (FcRn) se une al dominio Fc de IgG a pH ácido en el endosoma y protege la IgG de degradación, contribuyendo así a la larga vida media en suero de IgG. Para comprender el comportamiento farmacocinético de las proteínas de fusión mutantes, determinamos la unión de las quince proteínas de fusión mutantes a FcRn recombinante *in vitro*. Las afinidades de unión en términos de valores de K_{on} , K_{off} y K_D para cada proteína de fusión mutante a FcRn/B2MG se calcularon y presentaron en la tabla anterior. Un efecto profundo de las mutaciones de IFN- α en las afinidades de estas proteínas de fusión mutantes a FcRn fue claramente evidente, lo que se manifestó como una mejora o disminución en la afinidad de unión en comparación con la proteína de fusión IFN- α de tipo silvestre, lo que sugiere el importante papel jugado por diversas mutaciones para afectar la capacidad de la unión de las proteínas de fusión a FcRn. Este profundo efecto sobre la unión de FcRn por mutaciones simples en la carga útil de IFN- α unida en el terminal C de las cadenas pesadas de los anticuerpos, en un sitio distal de la unión de FcRn al dominio Fc, es completamente inesperado y un hallazgo sorprendente. Ya que se ha demostrado que la afinidad de unión de FcRn a la porción Fc de los anticuerpos se correlaciona con las vidas medias en suero (Yeung et al., J. Immunol., 182: 7663-7671, 2009), este efecto de mutaciones en la carga de IFN- α útil puede regular la vida media en suero de la proteína de fusión. Por lo tanto, este novedoso hallazgo de la fuerte influencia de las mutaciones de IFN- α en la alteración de la afinidad de unión a FcRn nos enseña una forma completamente nueva de optimizar las propiedades PK de nuestras proteínas de fusión, y en este documento se proporcionan moléculas con propiedades PK mejoradas.

D. Evaluación de la bioactividad IFN de las moléculas de fusión

[0109] Para evaluar la actividad antiviral de las proteínas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α , se sembraron células WISH (línea celular transformada de morfología epitelioide) a 2×10^5 células/ml y tratadas con diluciones en serie de dos veces de las proteínas de fusión o Roferon® (interferón humano recombinante alfa-2a) durante 24 horas. A continuación, las células se infectaron con VSV (virus de la estomatitis vesicular) a una concentración de 4000 pfu/100 ml. Después de 72 h, las células se tiñeron con cristal violeta al 0,1%. La protección contra la infección viral se determinó cuantificando las células que sobrevivieron a la infección mediante tinción con cristal violeta al 0,1% y determinando la cantidad de tinte en cada pocillo utilizando un densitómetro puntual contando el número de placas.

E. Evaluación de la actividad antiproliferativa de las moléculas de fusión

[0110] Los ensayos como los descritos a continuación se utilizarán en el análisis de la actividad antiproliferativa de las moléculas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α .

Ensayo MTS para la actividad antiproliferativa de las proteínas de fusión

[0111] Se colocaron células tumorales en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una densidad de $1,25 \times 10^4$ células/pocillo y se añadieron diluciones en serie de diferentes proteínas de fusión. Después de 48 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, las placas se desarrollaron mediante la adición de 20 μ l de solución de MTS (Promega, Madison, WI) y se midieron en un lector de ELISA a 490 nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación.

Incorporación de ³H-timidina para medir los efectos antiproliferativos

[0112] Las células tumorales se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una densidad de $1,25 \times 10^4$ células/pocillo y diluciones en serie de diferentes proteínas de fusión adicionales. Después de 24 h, se añadió [metilo-³H]-timidina (ICN Biomedicals, Inc., Irvine, CA) a una concentración final de 4 μ Ci/ml. Las células se cultivaron durante 24 horas adicionales y luego se recogieron en filtros de fibra de vidrio usando un Micro Cell Harvester 11050 (Skatron, Noruega) y se contaron en un contador de centelleo líquido Betaplate 1205 (WALLAC Inc., Gaithersburg, MD) y el porcentaje de inhibición de proliferación calculado.

Inhibición de la proliferación de células tumorales marcadas con CFSE

[0113] Se incubaron células tumorales (1×10^6) con CFSE (sondas moleculares) 2,5 μ m durante 10 minutos a 37°C. Luego, las células se trataron con 1 nM de diferentes proteínas de fusión durante 48 horas, y se analizaron mediante citometría de flujo siguiendo los procedimientos sugeridos por el fabricante, utilizando el CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes).

F. Evaluación de la capacidad de las moléculas de fusión de inducir la apoptosis

[0114] Los ensayos tales como los ensayos descritos a continuación han de ser utilizados en el análisis de la capacidad de molécula de fusión de anti-CD20Ab-IFN- α mutante para inducir apoptosis.

Determinación de apoptosis

[0115] Las células tumorales (1×10^6) se trataron con diferentes proteínas de fusión durante 72 horas. Las células se lavaron luego con PBS enfriadas con hielo. El ensayo de anexina V/yoduro de propidio (PI) se realizó utilizando el kit de ensayo de apoptosis Vybrant n° 2 siguiendo los procedimientos sugeridos por el fabricante (sonda molecular). El

porcentaje de células apoptóticas se calculó como la suma de los porcentajes de células apoptóticas tempranas y células apoptóticas tardías.

Ejemplo 3

[0116] Este ejemplo describe estudios *in vivo* usando moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α que demostraron una mayor afinidad de unión por el receptor FcRn en los ensayos *in vitro* para determinar si tales moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α demuestran propiedades PK mejoradas. El ensayo descrito a continuación se utiliza en el análisis de las moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α .

[0117] Proteínas de fusión murinas rIFN- α (PBL Biomedical Laboratories), IgG3-IFN- α y anti-CD20Ab-IFN- α mutantes fueron yodadas a 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ con ^{125}I utilizando Iodo-Beads (Pierce) según el protocolo del fabricante. Los ratones fueron inyectados i.p. con 66 μCi de proteínas marcadas con ^{125}I . A varios intervalos después de la inyección de proteína de fusión ^{125}I marcada con rIFN- α , IgG3-IFN- α , o anti-CD20Ab-IFN- α mutante, radiactividad residual se midió usando un contador de cuerpo entero de ratón (Wm. B. Johnson and Associates).

Ejemplo 4

[0118] Este ejemplo describe estudios *in vivo* usando moléculas de fusión mutantes Ab-IFN- α que demostraron un índice terapéutico mejorado en los ensayos *in vitro* (Ejemplo 2) para determinar la eficacia en el tratamiento de tumores *in vivo*. Los ensayos como los que se describen a continuación se utilizarán en el análisis de las moléculas de fusión anti-CD20Ab-IFN- α mutantes.

[0119] Los ratones (grupos de 4) fueron inyectados subcutáneamente con 5000 células 38C13-CD20 en el día cero. Los días 1, 2 y 3 se trataron por vía intravenosa con solución salina tamponada con hepes (HBSS) o 0,4 μg , 2 μg o 10 μg de anti-CD20AbIFN- α , moléculas de fusión mutantes y se monitorizó el crecimiento tumoral.

[0120] Se inocularon ratones C3H/HeJ con 5000 células 38C13-CD20 el día 0. En los días 5, 6 y 7 se trataron con HBSS o 10 μg de moléculas de fusión mutantes anti-CD20Ab-IFN- α . Fueron monitoreados por el crecimiento tumoral y la supervivencia.

[0121] Ratones C3H/H3J fueron inoculados con 5000 células 38C13-CD20 en el día 0 y se trató en los días 5, 6 y 7 con 10 μg de anti-CD20-IgG3, o 10 μg de anti-CD20Ab-IFN- α , moléculas de fusión mutantes y seguidas para el crecimiento tumoral y la supervivencia.

Ejemplo 5

[0122] En este ejemplo, una molécula de fusión que comprende: 1) un anticuerpo anti-CD33 y una molécula de IFN- α de tipo silvestre; 2) un anticuerpo anti-CD33 y la molécula mutante de IFN- α M1 de la Tabla 1; 3) un anticuerpo anti-CD33 y la molécula mutante de IFN- α M8 de la Tabla 1; y 4) un anticuerpo anti-CD33 y la molécula mutante de IFN- α M13 de la Tabla 1 se construyeron como se representa en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1. En las construcciones de moléculas de fusión de esta realización, la molécula de IFN- α de tipo silvestre comprendía la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 13. Se realizaron construcciones usando el enlazador de péptidos SGGGGS (SEQ ID NO: 14), y se construyeron usando el enlazador de péptidos AEEAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15). El anticuerpo anti-CD33 comprendía la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respetuosamente.

[0123] Las diferentes moléculas de fusión se ensayaron en diversos ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión anti-CD33Ab-IFN- α mutantes con el mejor índice terapéutico y eficacia conservada o mejorada *in vivo* en comparación con la de una molécula de fusión de anticuerpo anti-CD33Ab-wtIFN- α , y la molécula de fusión que demostró las mejores propiedades PK.

Ejemplo 6

[0124] En este ejemplo, una molécula de fusión que comprende: 1) un anticuerpo anti-CD 138 y una molécula de IFN- α de tipo silvestre; 2) un anticuerpo anti-CD138 y la molécula mutante de IFN- α M1 de la Tabla 1; 3) un anticuerpo anti-CD138 y la molécula mutante de IFN- α M8 de la Tabla 1; y 4) un anticuerpo anti-CD138 y la molécula mutante IFN- α M13 de la Tabla 1 se construyeron como se representa en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1. En las construcciones de moléculas de fusión de esta realización, la molécula de tipo silvestre IFN- α comprendía secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 13. Se realizaron construcciones usando el enlazador de péptidos SGGGGS (SEQ ID NO: 14), y se construyeron usando el enlazador de péptidos AEEAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15). El anticuerpo anti-CD138 comprendía la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respetuosamente.

[0125] Las diversas moléculas de fusión se probaron en varios ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión mutantes anti-CD138 Ab-IFN- α con el mejor índice terapéutico y eficacia preservada o mejorada *in vivo* en

comparación con la de una molécula de fusión anti-CD138Ab-wtIFN- α , y la molécula de fusión que demostró las mejores propiedades PK.

Ejemplo 7

5
 10
 15
[0126] En este ejemplo, una molécula de fusión que comprende: 1) un anticuerpo anti-HER2/neu y una molécula de IFN- α de tipo silvestre; 2) un anticuerpo anti-HER2/neu y la molécula mutante de IFN- α M1 de la Tabla 1; 3) un anticuerpo anti-HER2/neu y la molécula mutante de IFN- α M8 de la Tabla 1; y 4) un anticuerpo anti-HER2/neu y la molécula mutante de IFN- α M13 de la Tabla 1 se construyeron como se representa en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1. En las construcciones de moléculas de fusión de esta realización, la molécula de IFN- α de tipo silvestre comprendía la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 13. Se realizaron construcciones usando el enlazador de péptidos SGGGGS (SEQ ID NO: 14), y se construyeron usando el enlazador de péptidos AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15). El anticuerpo anti-HER2/neu comprendía la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respetuosamente.

20
[0127] Las diversas moléculas de fusión se probaron en varios ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión mutantes AbIFN- α anti-HER2/neu con el mejor índice terapéutico y eficacia preservada o mejorada *in vivo* en comparación con la de una molécula de fusión anti-HER2/neu Ab-wtIFN- α , y la molécula de fusión que demostró las mejores propiedades PK.

Ejemplo 8

25
 30
[0128] En este ejemplo, una molécula de fusión que comprende: 1) un anticuerpo anti-endoplasmina y una molécula de IFN- α de tipo silvestre; 2) un anticuerpo anti-endoplasmina y la molécula mutante de IFN- α M1 de la Tabla 1; 3) un anticuerpo anti-endoplasmina y la molécula mutante de IFN- α M8 de la Tabla 1; y 4) un anticuerpo anti-endoplasmina y la molécula mutante de IFN- α M13 de la Tabla 1 se construyeron como se representa en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1. En las construcciones de moléculas de fusión de esta realización, la molécula de IFN- α de tipo silvestre comprendía secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 13. Se realizaron construcciones usando el enlazador de péptidos SGGGGS (SEQ ID NO: 14), y se construyeron usando el enlazador de péptidos AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15). El anticuerpo anti-endoplasmina comprendía la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera representada en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respetuosamente.

35
[0129] Las diversas moléculas de fusión se probaron en varios ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión mutantes anti-endoplasmina AbIFN- α con el mejor índice terapéutico y eficacia preservada o mejorada *in vivo* en comparación con la de una molécula de fusión anti-endoplasmina Ab-wtIFN- α , y la molécula de fusión que demostró las mejores propiedades PK.

Ejemplo 9

40
 45
 50
[0130] En este ejemplo, una molécula de fusión que comprende: 1) un anticuerpo anti-CD276 y una molécula de IFN- α de tipo silvestre; 2) un anticuerpo anti-CD276 y la molécula mutante de IFN- α M1 de la Tabla 1; 3) un anticuerpo anti-CD276 y la molécula mutante de IFN- α M8 de la Tabla 1; y 4) un anticuerpo anti-CD276 y la molécula mutante de IFN- α M13 de la Tabla 1 se construyeron como se representa en la Figura 1 y como se describe en el Ejemplo 1. En las construcciones de moléculas de fusión de esta realización, la molécula de IFN- α de tipo silvestre comprendía secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 13. Se realizaron construcciones usando el enlazador de péptidos SGGGGS (SEQ ID NO: 14), y se construyeron usando el enlazador de péptidos AEAAAKEAAAKAGS (SEQ ID NO: 15). El anticuerpo anti-CD276 comprendía la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respetuosamente.

55
[0131] Las diversas moléculas de fusión se probaron en varios ensayos funcionales *in vitro* para identificar moléculas de fusión mutantes anti-CD276 Ab-IFN- α con el mejor índice terapéutico y eficacia preservada o mejorada *in vivo* en comparación con la de una molécula de fusión anti-CD276 Ab-wtIFN- α , y la molécula de fusión que demostró las mejores propiedades PK.

LISTA DE SECUENCIAS

60 **[0132]**

<110> ImmunGene Inc

<120> MOLÉCULAS DE FUSIÓN MODIFICADAS MUTANTES DE ANTICUERPO-INTERFERON

65 <130> IG003NP

ES 2 800 426 T3

<160> 15

<170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo anti-her2/neu - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal

<400> 1

Met Glu Cys Ser Trp Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

ES 2 800 426 T3

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 5
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 10
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 15
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 20
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 25
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 30
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 35
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 40
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 45
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 50
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 55
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 60
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 65
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

ES 2 800 426 T3

5 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

10 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

15 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

20 Leu Ser Pro Gly Lys
465

20 <210> 2
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cadena ligera del anticuerpo anti-Her2/neu - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido
señal

30 <400> 2

35 Met Glu Trp Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

40 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

45 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val
35 40 45

50 Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50 55 60

55 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

60 Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

65 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr
100 105 110

70 Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

75 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Glu Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

ES 2 800 426 T3

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 5 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 10 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190
 15 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 20 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 25 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 3
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo anti-CD20 - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal

<400> 3

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

ES 2 800 426 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 5
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 10
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 15
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 20
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 25
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 30
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 35
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 40
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 45
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 50
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 55
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 60
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 65
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 70
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 75
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

ES 2 800 426 T3

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 5
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 10
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 15
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 20
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 25
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 30
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 35
 <210> 4
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cadena ligera del anticuerpo anti-CD20 - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal
 45
 <400> 4
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 50
 Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala
 20 25 30
 55
 Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
 35 40 45
 60
 Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
 50 55 60
 65
 Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe
 65 70 75 80
 70
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val
 85 90 95
 75

ES 2 800 426 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
 100 105 110
 Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 115 120 125
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

40
 <210> 5
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo anti-CD138 - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal

<400> 5

50
 55
 60
 65

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

ES 2 800 426 T3

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn
 65 70 75 80
 5
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn
 85 90 95
 10
 Thr Val Gln Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 15
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Asn Phe Tyr Tyr Ala Met
 115 120 125
 20
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140
 25
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 30
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 35
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 40
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 45
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 50
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 55
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 60
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 65
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

ES 2 800 426 T3

	305					310						315				320
5	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
					325					330					335	
10	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
				340					345					350		
15	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
			355					360					365			
20	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
		370					375					380				
25	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
	385					390					395					400
30	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
					405					410					415	
35	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				420					425					430		
40	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
			435					440					445			
45	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	450						455					460				
50	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
	465					470										

<210> 6

<211> 236

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo anti-CD138 - residuos de aminoácidos 1-22 representan un péptido señal

55

<400> 6

ES 2 800 426 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 5
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser
 20 25 30
 10
 Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser
 35 40 45
 15
 Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
 50 55 60
 20
 Thr Val Glu Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 25
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 30
 Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 35
 Tyr Ser Lys Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 40
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 45
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 50
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 55
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 60
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 65
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

ES 2 800 426 T3

<210> 7
<211> 463
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cadena pesada del anticuerpo anti-endoplasmina - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal

10

<400> 7

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 800 426 T3

	1			5					10				15			
5	Val	Gln	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				20					25				30			
10	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
			35					40					45			
15	Thr	Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu
		50					55					60				
20	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser
	65					70				75						80
25	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser
				85						90					95	
30	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100						105					110		
35	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			115					120					125			
40	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
	130						135					140				
45	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
	145				150						155					160
50	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				165						170					175	
55	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
			180						185					190		
60	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			195				200						205			
65	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
	210						215					220				
70	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
	225					230					235					240
75	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				245						250					255	

ES 2 800 426 T3

5 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

10 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

15 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

20 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

25 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

30 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

35 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

40 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

45 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

50 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

55 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo anti-endoplasmina - residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal

65 <400> 8

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo anti-CD33 - residuos de aminoácidos 1-19 representan un péptido señal

5

<400> 9

ES 2 800 426 T3

1 Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 5 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 10 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile
 15 Thr Asp Ser Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu
 20 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn
 25 Gln Lys Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn
 30 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
 35 Tyr Tyr Cys Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 40 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 45 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 50 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 55 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 60 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 65

ES 2 800 426 T3

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240

5

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

10

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

15

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285

20

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

25

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

30

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

35

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

40

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

45

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

50

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

55

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

60

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

65

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

ES 2 800 426 T3

5 <210> 10
<211> 238
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena ligera del anticuerpo anti-CD33 - residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal

10 <400> 10

ES 2 800 426 T3

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

10 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser
20 25 30

15 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

20 Leu Asp Asn Tyr Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

25 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
65 70 75 80

30 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

35 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

40 Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Trp Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

45 Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

50 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

55 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

60 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

ES 2 800 426 T3

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

5 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

10 <210> 11
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> anticuerpo anti-CD276 región variable de la cadena pesada: residuos de aminoácidos 1-19
 representan un péptido señal

20 <400> 11

Met Asn Phe Gly Phe Arg Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

25 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30

30 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Arg Phe Thr Phe
 35 40 45

35 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

40 Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

45 Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

50 Phe Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

55 Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Asp Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

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

65 Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu
 145 150

65 <210> 12
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 800 426 T3

<220>

<223> región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD276 - residuos de aminoácidos 1-20 representan un péptido señal

5

<400> 12

10 Met Lys Ser Gln Ser Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

15 Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Phe Ala Gly Val Asp Gly
20 25 30

20 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
35 40 45

25 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Thr
50 55 60

30 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
65 70 75 80

35 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
85 90 95

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
100 105 110

45 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
115 120 125

50 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
130 135 140

55 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly
145 150 155

<210> 13

<211> 165

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> proteína de tipo silvestre de interferón alfa 2 humano

<400> 13

60

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

65

ES 2 800 426 T3

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

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> enlazador peptídico
 <400> 14

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> enlazador peptídico

ES 2 800 426 T3

<400> 15

5 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser
1 5 10

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una molécula de fusión genéticamente modificada que comprende un anticuerpo antígeno asociado a tumor (AAT) (Ab) unido a una molécula mutante de interferón alfa (IFN- α), la molécula mutante de IFN- α que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 13 en donde R149 es A y en donde R162 es A, y en donde dicho anticuerpo está unido directamente a dicha molécula mutante de IFN- α , en donde dicha molécula de fusión cuando se pone en contacto con una célula tumoral da como resultado la muerte o inhibición del crecimiento o proliferación de dicha célula tumoral.
- 10 **2.** La molécula de fusión según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo AAT se selecciona de un anti-HER2/neu, anti-HER3, anti-HER4, anti-CD4, anti-CD 19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD25, anti-CD33, anti-CD138, anti-CD200, antiCD276, anti-CXCR3, anti-CXCR5, anti-CCR3, anti-CCR4, anti-CCR9, anti-CRTH2, anti-PMCH y anti-endoplasmina.
- 15 **3.** La molécula de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho anticuerpo AAT se selecciona de un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, Fab, Fab', Fab₂, Fab'₂, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dsFv y diacuerpos.
- 20 **4.** La molécula de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo está unido a dicha molécula mutante de interferón con un enlazador peptídico.
- 5.** La molécula de fusión según la reivindicación 4, en donde dicho enlazador peptídico es un enlazador peptídico resistente a la proteólisis.
- 25 **6.** La molécula de fusión de la reivindicación 5, en donde dicho enlazador peptídico se selecciona del grupo que consiste en SGGGGS y AEAAAKEAAKAGS.
- 30 **7.** Una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 8.** Una molécula de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento de tumores o metástasis tumorales en un paciente.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1 de 3

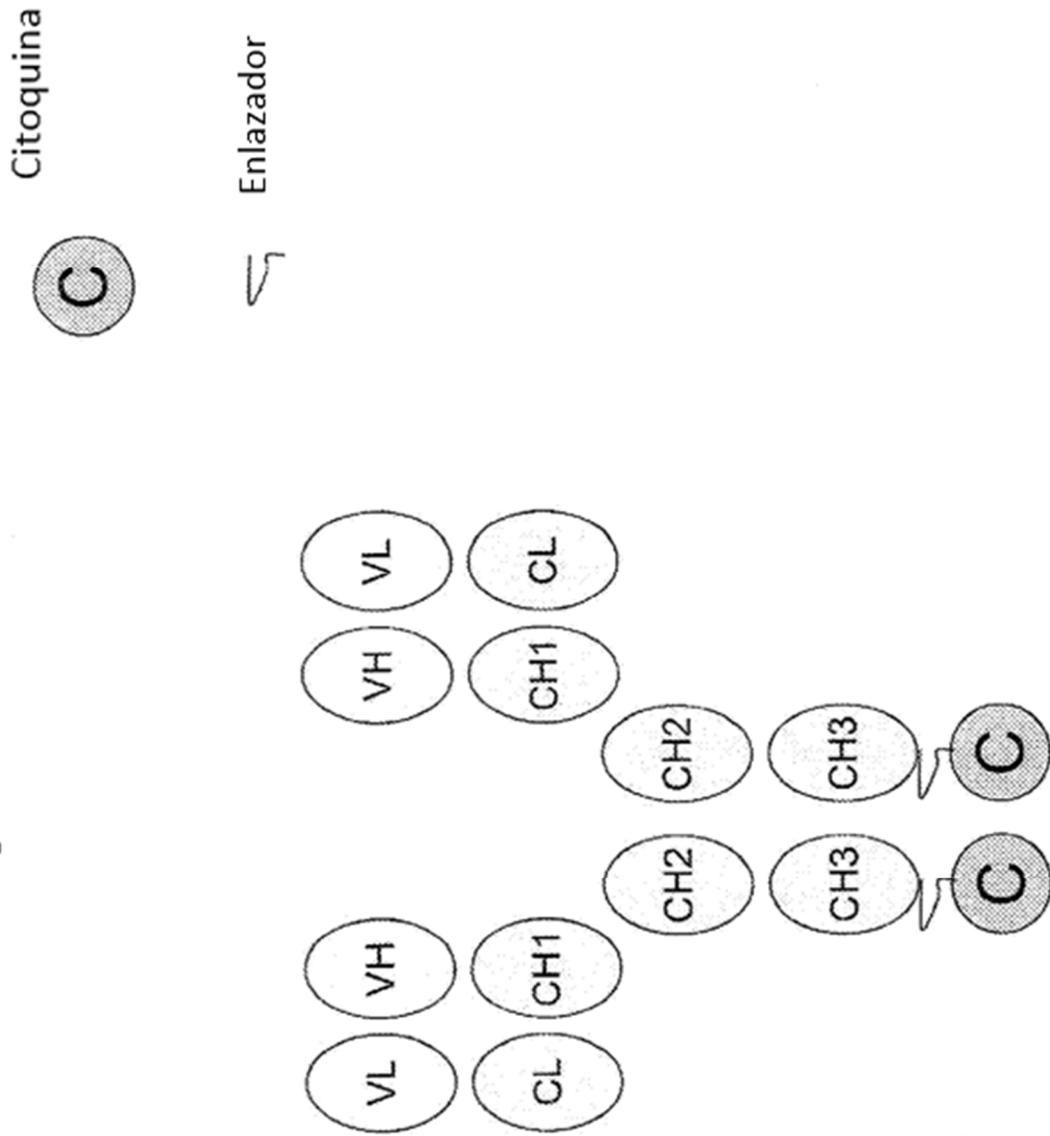


Figura 2 de 3

Citoquina



Enlazador

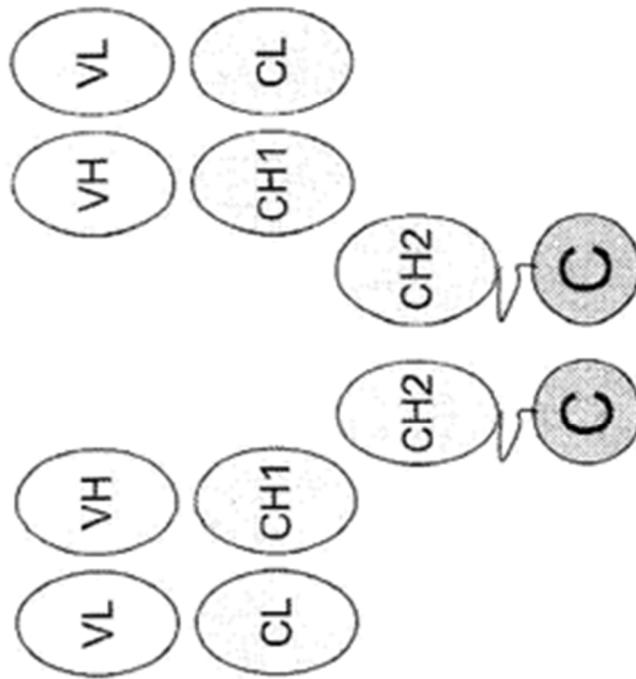


Figura 3 de 3

Citoquina



Enlazador

