

MOLÉCULAS BIFUNCIONALES COMPRENDIENDO UNA VARIANTE DE IL-7**CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a el campo de la inmunoterapia. La presente invención proporciona una molécula bifuncional que comprende una variante de IL-7.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La interleucina-7 es una citocina inmunoestimuladora miembro de la superfamilia IL-2 y desempeña un papel importante en un sistema inmunitario adaptativo al promover respuestas inmunitarias. Esta citocina activa las funciones inmunitarias a través de la supervivencia y diferenciación de las células T y las células B, la supervivencia de las células linfoides, la estimulación de la actividad de las células aniquilantes naturales (NK). El IL-7 también regula el desarrollo de los ganglios linfáticos a través de células inductoras de tejido linfóide (LTi) y promueve la supervivencia y división de células T vírgenes o células T de memoria. Además, la IL-7 mejora la respuesta inmunitaria en humanos al promover la secreción de IL-2 e Interferón- γ . El receptor de IL-7 es heterodimérico y consiste en IL-7R α (CD127) y la cadena γ común (CD132). La cadena γ se expresa en todos los tipos de células hematopoyéticas, mientras que IL-7R α se expresa principalmente en linfocitos que incluyen precursores linfoides B y T, células T vírgenes y células T de memoria. Se observa una baja expresión de IL-7R α en las células T reguladoras en comparación con las células T efectoras/vírgenes que expresan un nivel más alto. Por lo tanto, CD127 se usa como marcador de superficie para discriminar estas 2 poblaciones. La IL-7R α también se expresa en células linfoides Innatas como NK y células T derivadas de tejido linfóide asociado al intestino (GALT). La cadena IL-7R α (CD127) se comparte con TSLP (Linfopoyetina estroma tímica) y CD132 (cadena γ) se comparte con IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e interleucina-21. Se inducen dos vías de señalización principales a través de CD127/CD132: (1) vía Janus quinasa/STAT (es decir, Jak-Stat-3 y 5) y (2) vía fosfatidil-inositol-3 quinasa (es decir, PI3K-Akt). La administración de IL-7 es bien tolerada por el paciente y conduce a la expansión de las células CD8 y CD4 y a una disminución relativa de las células CD4⁺ T reguladoras. La IL-7 desnuda recombinante o la IL-7 fusionada con el dominio N terminal de la Fc de los anticuerpos han sido probados en clínica, con el fundamento de aumentar la semivida de la IL-7 mediante la fusión del dominio Fc y mejorar la eficacia duradera del tratamiento.

La citocina recombinante IL-7 tiene un pobre perfil farmacocinético, limitando su uso en clínica. Después de la inyección, la IL-7 recombinante se distribuye rápidamente y se elimina, lo que conduce a una semivida deficiente en IL-7 en humanos (entre 6,8 y 9,5 horas) (Sportes *et al.*, Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):727-35) o en ratones (2,5 horas) (Hyo Jung Nam *et al.*, Eur. J. Immunol. 2010. 40:351-358). Una fusión del dominio Fc de la

IgG con IL-7 extiende su semivida, ya que la IgG puede unirse al receptor neonatal Fc (FcRn) y participar en la transcitosis y el reciclaje endosomal de la molécula. Se observa una semivida circulante prolongada para la molécula de fusión IL-7 Fc ($t_{1/2}=13\text{h}$) que permanece en niveles detectables (200 pg/mL) hasta 8 días después de la administración en ratones (Hyo Jung Nam *et al.*, EUR. J. Immunol. 2010. 40:351-358). Aunque la semivida se aumenta para la citocina IL-7 fusionada con un dominio Fc, la molécula requirió inyecciones *in vivo* frecuentes para tener un efecto biológico. En el contexto de las moléculas de inmunocitoquina, la citocina se fusiona con un anticuerpo (por ejemplo, dirigido contra el antígeno del cáncer, bloqueo del punto de control inmunitario, molécula coestimuladora...) para concentrar preferiblemente la citocina en las células que expresan el antígeno dirigido. Sin embargo, la afinidad de la citocina IL-7 por su receptor CD127/CD132 (rango nanomolar a picomolar) puede ser mayor que la afinidad del anticuerpo por su objetivo. Por lo tanto, la citocina impulsará la farmacocinética del producto, lo que conducirá a un rápido agotamiento del fármaco *in vivo* disponible debido al mecanismo de disposición de fármacos mediada por diana (TMDD). Esta rápida eliminación ha sido descrita para inmunocitoquinas como IL-2 o IL-15 mostrando que las propiedades farmacocinéticas de la proteína de fusión pueden tener un impacto directo en el rendimiento del fármaco (List et Neri Clin Pharmacol. 2013; 5(Suppl 1): 29-45

Luego, sigue siendo una necesidad significativa en la técnica para una variante de IL-7 nueva y mejorada que permita mejorar la distribución y reducir la eliminación de los productos de IL-7, particularmente de la molécula bifuncional que comprende IL-7. Los inventores han dado un importante paso adelante con la invención divulgada en la presente invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los inventores proporcionan mutaciones de IL-7 y cadenas principales Fc optimizadas a fin de mejorar la distribución y eliminación de una molécula bifuncional para un efecto biológico *in vivo* mejorado. Los inventores observaron que las mutaciones de IL-7; particularmente en combinación con el isotipo IgG y la longitud del ligando, permite una mejor distribución de la molécula bifuncional y una semivida más larga *in vivo*.

Las moléculas bifuncionales proporcionadas en la presente invención demuestran particularmente una buena farmacocinética y farmacodinámica *in vivo*, particularmente en comparación con una molécula bifuncional que comprende una IL-7 de tipo salvaje. Además, se han asociado propiedades ventajosas e inesperadas a estas nuevas moléculas como se detalla en la introducción de la descripción detallada y en los ejemplos.

3/111

En un primer aspecto, la invención se refiere a una molécula bifuncional que comprende una variante de interleucina 7 (IL-7) conjugada con una fracción de unión, en la que:

- la fracción de unión se une a una diana expresada específicamente en la superficie de las células inmunitarias,

- la variante de IL-7 presenta por lo menos 75 % de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, en el que la variante comprende por lo menos una mutación de aminoácido que i) reduce la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R, y ii) mejora la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante de IL-7, en comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7.

En particular, la por lo menos una mutación es una sustitución de aminoácidos o un grupo de sustituciones de aminoácidos seleccionados desde el grupo que consiste en (i) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S, (ii) W142H, W142F o W142Y, (iii) D74E, D74Q o D74N, iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R; o cualquier combinación de los mismos (es decir, la numeración de aminoácidos es la que se muestra en SEQ ID NO: 1).

En particular, la invención concierne a una molécula bifuncional que comprende una variante de interleucina 7 (IL-7) conjugada con una fracción de unión, en la que:

- la fracción de unión se une a una diana expresada específicamente en la superficie de las células inmunitarias,

- la variante de IL-7 presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, en el que la variante comprende por lo menos una mutación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en (i) W142H, W142F o W142Y, (ii) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S, (iii) D74E, D74Q o D74N, iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R; o cualquier combinación de los mismos, siendo la numeración de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1, que i) reduce la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R, y ii) mejora la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante de IL-7 en comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7.

En un aspecto, la variante de IL-7 comprende un grupo de sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-

4/111

C141S y C34S-C129S, y C47S-C92S y C34S-C129S (es decir, siendo la numeración de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1).

En otro aspecto, la variante de IL-7 comprende una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en W142H, W142F y W142Y (es decir, la numeración de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID NO: 1).

En otro aspecto, la variante de IL-7 comprende en la sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en D74E, D74Q y D74N (es decir, la numeración de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID NO: 1).

Particularmente, la variante de IL-7 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2-15.

En un aspecto, la fracción de unión comprende un dominio constante de cadena pesada, preferiblemente un dominio Fc, de una IgG1 humana, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235A.

Particularmente, la fracción de unión comprende un dominio constante de cadena pesada, preferiblemente un dominio Fc, de una IgG4 humana, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E.17 y K444A.

Preferiblemente, la célula inmunitaria es una célula T, preferiblemente una célula T agotada.

En un aspecto, la diana es expresada por medio de células T y la fracción de unión se une a una diana seleccionada del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8.

Preferiblemente, la diana es expresada por medio de células T agotadas y la fracción de unión se une a una diana seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 y TIM3.

En un aspecto, la fracción de unión es un anticuerpo o un fragmento de antígeno del mismo, y el terminal N de la variante de IL-7 se fusiona con el extremo C de un dominio constante de cadena ligera o pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo,

5/111

preferiblemente al extremo C del dominio constante de la cadena pesada, opcionalmente por un ligando peptídico.

En otro aspecto, la variante de IL-7 se fusiona con la fracción de unión por medio de un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO: 68), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 67), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 69) y GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70), preferiblemente es (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 70).

En un aspecto, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente por el final de extremo C hasta el final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente por un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica unida covalentemente por medio de el final de extremo C hasta el final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno. Preferiblemente, en el segundo monómero, la segunda cadena Fc heterodimérica complementaria unida covalentemente a la variante de IL-7, opcionalmente por un ligando peptídico, preferiblemente unida covalentemente por medio de el final de extremo C hasta el final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente por un ligando peptídico.

En otro aspecto, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente por medio de el final de extremo C hasta el final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica, opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica desprovista de IL-7, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno, siendo dicha segunda cadena Fc heterodimérica covalentemente a la variante IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, preferiblemente unido por medio de el final de extremo C hasta el final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico.

En otro aspecto, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente mediante la extremidad C-terminal hasta la extremidad N-terminal de una primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unida covalentemente mediante la extremidad C-terminal hasta la extremidad N-terminal de una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria opcionalmente mediante un ligando peptídico, en el que solo una de las cadenas Fc

6/111

heterodiméricas, preferiblemente la primera, está unida covalentemente por medio de la extremidad C-terminal hasta la extremidad N-terminal de la variante IL-7.

Particularmente, el dominio de unión a antígeno de la molécula bifuncional es un dominio Fab, un Fab', un fragmento variable monocatenario (scFV) o un anticuerpo de dominio único (sdAb).

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en: (i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 o 62; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y una CDR3 de SEQ ID NO: 16.

Particularmente, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25;

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

Preferiblemente, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 28.

La invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada o un grupo de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la molécula bifuncional según la invención.

La invención concierne también a una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado según la invención.

La invención concierne también a una composición farmacéutica que comprende la molécula bifuncional, el ácido nucleico o la célula huésped según la invención, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención concierne finalmente a la molécula bifuncional, al ácido nucleico, a la célula huésped o a la composición farmacéutica según la invención, para uso como medicamento, especialmente para uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad infecciosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Ensayo ELISA de unión a PD-1. Se inmovilizó la proteína PD-1 recombinante humana (rPD1) y se añadieron anticuerpos a diferentes concentraciones. La revelación se realizó con un anticuerpo anti-Fc humano acoplado a peroxidasa. La colorimetría se

7/111

determinó a 450 nm usando sustrato TMB. A. Unión a PD-1 de la molécula bifuncional que comprende un anticuerpo anti-PD1 y una IL-7 mutada en los aminoácidos D74, Q22, M17, Q11, K81. B. Unión a PD-1 de la molécula bifuncional que comprende una IL-7 mutada en el aminoácido W142 C. Unión a PD-1 de la molécula bifuncional mutada en los enlaces disulfuro de IL-7 (SS1, SS2 y SS3 mutante). Todas las moléculas probadas en esta figura se construyeron con un isotipo IgG4m y un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 2: Ensayo ELISA de unión a CD127 de IgG fusionada con IL-7 mutada. La proteína recombinante PD-1 se inmovilizó en la placa, luego se preincubaron moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 con proteína recombinante CD127 (marcada con Histidina, Sino ref 10975-H08H) y se agregaron al pocillo. La revelación se realizó con una mezcla de un anticuerpo anti-histidina acoplado a biotina + estreptavidina acoplada a Peroxidasa. La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB. A. Unión a CD127 de la molécula bifuncional que comprende IL-7 mutada en los aminoácidos D74, Q22, M17, Q11, K81. B. Unión a CD127 de la molécula bifuncional que comprende IL-7 mutada en el aminoácido W142.

Figura 3: Vía de señalización de IL-7R de las diferentes moléculas bifuncionales medida por medio de fosforilación de STAT5. Se incubaron PBMC humanas aisladas de sangre periférica de voluntarios sanos durante 15 minutos con moléculas bifuncionales de IL-7 anti-PD-1. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un AF647 catalogado anti-pSTAT5 (clon 47/Stat5(pY694)). Los datos se obtuvieron calculando MFI pSTAT5 en células T CD3. A. Activación pSTAT5 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 que comprende una IL-7 mutada en los aminoácidos D74, Q22, M17, Q11, K81. B. Activación pSTAT de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 que comprende una IL-7 mutada en el aminoácido W142 C. Activación pSTAT de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 que comprende una IL-7 mutada en los enlaces disulfuro de IL-7, SS2 (● negro) y SS3 (▲) en comparación con la IL-7 anti-PD-1 WT (● gris). Todas las moléculas probadas en esta figura se construyeron con un isotipo IgG4m y un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 4: Farmacocinética en ratones de las moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con una dosis con IgG fusionada con IL-7 de tipo salvaje o IL-7 mutada. La concentración de la molécula en los sueros se evaluó por medio de ELISA en múltiples momentos después de la inyección. A. inyección de IgG4-G4S3 IL7 WT (□ gris); IgG4-G4S3 IL7 D74E (● negro) B. inyección de IgG4-G4S3 IL7 WT (□ gris) o IgG4-G4S3 IL7 W142H (● negro) C. inyección de IgG4-G4S3 IL7 WT (□ gris);

8/111

IgG4-G4S3 IL7 SS2 (●) o IgG4-G4S3 IL7 SS3 (▲). D. Correlación entre el Área bajo la curva (AUC) calculada a partir de PK vs ED50 pSTAT5 (nM) de cada molécula. Todas las moléculas probadas en esta figura se construyeron con un isotipo IgG4m y un ligando GGGGGSGGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 5: La adición de un enlace disulfuro entre anti PD-1 e IL-7 disminuye la activación de pSTAT5 mientras aumenta la exposición al fármaco *in vivo*. A. Señalización de IL7R medida por medio de la activación de pSTAT5 en PBMCs humanas después del tratamiento con molécula bifuncional WT IL-7 anti-PD-1 (gris ●) o molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 con un enlace disulfuro adicional (negro ●) B. Farmacocinética en ratones de la molécula bifuncional WT IL-7 anti-PD-1 (gris ●) o la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 con un enlace disulfuro adicional (negro ●). Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con una dosis con moléculas bifuncionales IL7 anti-PD-1. La concentración de la molécula en los sueros se evaluó por medio de ELISA en múltiples momentos después de la inyección. Todas las moléculas probadas en esta figura se construyeron con un isotipo IgG4m y un ligando GGGGGSGGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 6: Ensayo ELISA de unión a PD-1. Se inmovilizó la proteína PD-1 recombinante humana (rPD1) y se añadieron anticuerpos a diferentes concentraciones. La revelación se realizó con un anticuerpo anti-Fc humano acoplado a peroxidasa. La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB. A. Unión a PD-1 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con una IgG4m (● gris), molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con una IgG1m (▲ negra), la molécula IL-7 anti-PD-1 molécula bifuncional D74E con un isotipo IgG1m (◻) o molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con IgG1m (◊). B. en otro experimento, la unión a PD-1 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 con un isotipo IgG4m (◻) o molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 con IgG1m (▲) fueron probadas.

Figura 7: Ensayo ELISA de unión a CD127 de molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 construida con un isotipo IgG1N298A o IgG4. La proteína recombinante dirigida por medio de la cadena principal del anticuerpo se inmovilizó, luego los anticuerpos fusionados con IL-7 se preincubaron con la proteína recombinante CD127 (marcada con Histidina, Sino ref 10975-H08H). La revelación se realizó con una mezcla de un anticuerpo anti-histidina acoplado a biotina y estreptavidina acoplado a Peroxidasa. La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB. A. Unión a CD127 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con un isotipo IgG4m (● gris), molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con un IgG1m (▲ negro), o la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con un isotipo IgG1m (● negro). B. Unión a CD127 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 con un isotipo IgG4m (● gris), molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 con un IgG1m (▲ negro) o la

9/111

molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con una IgG1m (● negra). C. Unión a CD127 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS3 con un isotipo IgG4m (● gris), molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS3 con un IgG1m (▲ negro) o la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT IgG1m (● negro) D. Unión a CD127 de la molécula bifuncional anti-PD-1 W142H con un isotipo IgG1m (● negro) o un isotipo IgG1m + YTE (● gris). También se probó la unión a CD127 de la molécula bifuncional anti PD-1 D74E con un isotipo IgG1m (▲ negro) o un isotipo IgG1m + YTE (▲ gris). Todas las moléculas probadas en esta figura se construyeron con un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 8: Análisis de señalización de IL-7R de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 construida con un isotipo IgG1N298A o IgG4. Se incubaron PBMCs humanas o células Jurkat PD1 + CD127 durante 15 minutos con una molécula bifuncional anti-PD-1 IL7. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un AF647 catalogado anti-pSTAT5 (clon 47/Stat5(pY694)). Los datos se obtuvieron calculando el % de pSTAT5 en células T CD3. A. Señalización de pSTAT5 en PBMCs humanas después del tratamiento de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 que tiene la mutación D74E con un isotipo IgG4m (● gris) o un isotipo IgG1m (▲ negro) B. Señalización de pSTAT5 en PBMCs humanas después del tratamiento de IL-7 anti-PD-1 SS2 con un isotipo IgG4m (● gris) o IL-7 anti-PD-1 SS2 con un IgG1m (▲ negro) C. Señalización de pSTAT5 en PBMCs humanas después del tratamiento del IL-7 anti-PD-1 SS3 con un isotipo IgG4m (● gris) o un IgG1m (▲ negro) D. (panel izquierdo) Señalización de pSTAT5 en células Jurkat PD1+CD127+ después del tratamiento del IL-7 anti-PD-1 WT o IL7 anti-PD-1 SS2 construido con un isotipo IgG4m (● gris) o IgG1m (▲ negro). D. (panel derecho) Señalización de pSTAT5 después del tratamiento del IL-7 anti-PD-1 SS2 con un isotipo IgG4m (● gris) o IL-7 anti-PD-1 SS2 con un IgG1m (▲ negro).

Figura 9: La molécula bifuncional mutada IL-7 anti-PD-1 potencia la activación de células T *in vitro*. Bioensayo Promega PD-1/PD-L1: (1) Las células T efectoras (Jurkat que expresan de manera estable PD-1, luciferasa inducida por NFAT) y (2) células diana activadoras (células CHO K1 que expresan de manera estable PDL1 y proteína de superficie diseñadas para activar TCRs análogos de manera independiente del antígeno) se co-cultivaron. Después de agregar BioGlo™ luciferina, la luminiscencia se cuantifica y refleja la activación de las células T. Se probarán concentraciones molares en serie de anticuerpo anti-PD1 +/- IL-7 recombinante (rIL-7) o moléculas bifuncionales anti-PD1IL7. Cada punto representa EC50 de un experimento A. Activación por NFAT de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con isotipo IgG4m (● gris) o anti-PD-1 (▲) o anti-PD-1 + rIL-7 (○) B. Activación por NFAT de IL-7 anti-PD-1 D74E IgG4m (●), IL-7 PD-1 D74E IgG1m

10/111

(▲ línea de puntos) y anti-PD-1 solo (negro ▲) C. Activación por NFAT de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con IgG4m (●), molécula bifuncional IL-7 PD-1W142H con IgG1m (▲ línea de puntos) y anti-PD-1 solo (negro ▲) D. Activación por NFAT de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 con IgG4m (●) y anti-PD-1 solo (negro ▲)

Figura 10: Farmacocinética de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 construidas con un isotipo IgG1m o IgG4m. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con una dosis de IgG fusionada con IL-7 de tipo salvaje o con IL-7 mutada. La concentración del fármaco en los sueros se evaluó por medio de ELISA en múltiples momentos después de la inyección. A. Farmacocinética de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con IgG4m (● línea simple gris), la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT con IgG1m (● línea discontinua gris), la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 D74E con IgG1m (▲ línea discontinua negra), la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con IgG4m (○ línea plana negra), la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H con IgG1m (● línea plana negra discontinua), la molécula IL-7 anti-PD-1 SS3 con IgG4 (□ línea simple), y el IL-7 anti-PD-1 SS3 con IgG1m (□ línea discontinua). B. Farmacocinética de moléculas bifuncionales mutantes IL-7 anti-PD-1 D74E, D74Q, W142H, D74E + W142H con IgG1m.

Figura 11: Farmacocinética de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 construida con un isotipo IgG1 N298A+K444A. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con una dosis de una molécula bifuncional IL7 anti-PD-1 D74E con un isotipo IgG1N298A (□) o un isotipo de mutación de isotipo IgG1m+ K444A (●). La concentración del anticuerpo se evaluó por medio de ELISA en múltiples momentos después de la inyección.

Figura 12: La longitud del ligando no afecta significativamente la farmacocinética, pero disminuye la estimulación de la señalización de IL-7R. A. Farmacocinética de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 WT construidas con diferentes ligandos (GGGGS), (GGGGS)₂, (GGGGS)₃. B. Farmacocinética de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 D74 construidas con diferentes ligandos (GGGGS), (GGGGS)₂, (GGGGS)₃. C. Farmacocinética de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 W142H construidas con diferentes ligandos ((GGGGS)₂, (GGGGS)₃). Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con una dosis de IgG fusionada con IL-7 de tipo salvaje o IL-7 mutada. La concentración de IgG fusionada con IL-7 se evaluó por medio de ELISA en múltiples momentos después de la inyección. D. Señalización de pSTAT5 de las moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 construidas sin ligando o con ligandos GGGGS, (GGGGS)₂, (GGGGS)₃

Figura 13: El IL-7 anti-PD-1 mutante se dirige preferiblemente a las células PD-1+ CD127+ sobre las células PD-1-CD127+

11/111

Se tiñeron células Jurkat que expresaban CD127+ o coexpresaban CD127+ y PD-1+ con 45 nM de molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 y se revelaron con anti-IgG-PE (Biolegend, clon HP6017). Los datos representan la razón de la mediana de fluorescencia en células Jurkat PD-1+CD127+ sobre la mediana de fluorescencia obtenida en células PD1-CD127 Jurkat. En este ensayo se probarán, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 WT IgG1m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 D74E IgG1m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H IgG1m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 IgG4m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS3 IgG1m.

Figura 14: Los IL-7 anti-PD-1 mutantes se dirigen preferiblemente a las células PD-1+ CD127+ sobre las células PD-1-CD127+ en un ensayo de cocultivo. A. La expresión se analizó por medio de citometría de flujo de CD127 humano y PD-1 humano en las células CHO transducidas solo con CD127 o con receptores CD127 y PD-1 B. Unión de mutantes de IL-7 anti-PD-1 en células CHO que expresan CD127+ o coexpresan CD127+ y PD-1+ en un ensayo de cocultivo. Las células se tiñeron con un colorante de proliferación celular (CPDe450 o CPDe670), luego se cocultivaron en una proporción 1:1 antes de la incubación con diferentes concentraciones de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1. El revelado se realizó con un anti IgG-PE (Biolegend, clon HP6017) y se analizó por medio de citometría de flujo. Se calculó e informó la unión a EC50 (nM) de cada construcción en cada tipo de célula (CHO PD-1+ CD127+ (histograma blanco) y CHO PD-1-CD127+ (histograma negro)). Los histogramas representan la media +/- SD de 3 experimentos independientes. En este ensayo, mAb irrelevante IL7 WT (control de isotipo) molécula IgG4m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H IgG1m, molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 IgG4m, la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS3 IgG1m fueron probados y comprenden un ligando GGGGGSGGGGGSGGGGS entre el dominio Fc y el de IL-7.

Figura 15: Los IL-7 anti-PD-1 mutantes activan preferiblemente la señalización de pSTAT5 en células PD-1+ CD127+ sobre células PD-1-CD127+ en un ensayo de cocultivo. A. Expresión analizada por medio de citometría de flujo de CD127 humano, PD-1 humano y CD132 humano en células U937 transducidas solo con CD127 o con receptores CD127 y PD-1 B. Actividad pSTAT5 de los IL-7 anti-PD-1 mutantes en un ensayo de cocultivo con células U937 que expresan CD127+ o coexpresan CD127+ y PD-1+. Las células se tiñeron con un colorante de proliferación celular (CPDe450 o CPDe670) y se cocultivaron en una razón 1:1 antes de la incubación con diferentes concentraciones de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 (15 min 37 °C). Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un AF647 catalogado con anti-pSTAT5 (clon 47/Stat5(pY694). Se calculó la activación de pSTAT5 EC50 (nM) para cada construcción y cada tipo de célula (CHO PD-1+ CD127+

12/111

(histograma blanco) y CHO PD-1-CD127+ (histograma negro)). Los histogramas representan la media $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. En este ensayo se probarán, la rIL-7 (citocina IL-7 humana recombinante), molécula IgG4m de mAb IL7 WT (control de isotipo) irrelevante, molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 D74E IgG1m, molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H IgG1m, molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS2 IgG4m, molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 SS3 IgG1m y comprenden un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre los dominios Fc e IL-7.

Figura 16: El IL-7 anti-PD-1 W142H mutante activa preferiblemente la señalización de pSTAT5 en células T humanas PD-1+ CD127+ y aumenta sinérgicamente la proliferación de células T humanas agotadas en PD-1+CD127+. Se estimularon PBMCs humanas con un revestimiento de CD3/CD28 (3 μ g/mL de OK3 y anticuerpo CD28.2) para inducir la expresión de PD-1, luego se evaluó la proliferación y la actividad de pSTAT5 con moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 W142H IgG1m A. Gráfico izquierdo. Expresión representativa de CD127 humano, PD-1 humano en células T humanas activadas (población CD3+) analizadas por medio de citometría de flujo; A. gráfico derecho. Las células T activadas humanas se preincubaron con control de isotipo o anticuerpo competitivo anti-PD-1 (200 μ g/mL) antes de la incubación con IL-7 recombinante o moléculas mutantes IL-7 anti-PD-1 W142H. La señalización de IL-7 R pSTAT5 se cuantificó por medio de citometría de flujo después de la fijación y tinción con AF647 catalogado anti-pSTAT5 (clon 47/Stat5(pY694)). La activación de pSTAT5 (EC50) se calculó en una condición con el control de isotipo y en una condición con el anticuerpo competitivo anti PD-1. Los datos representan la diferencia de cambio de pliegue entre estas 2 condiciones; n= 5 donantes diferentes probados en experimentos independientes B. Proliferación de células T PD-1+ agotadas humanas con un control de isotipo, un isotipo anti-PD-1+ IL7 W142H IgG1m o la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H IgG1m (3nM). La proliferación se midió el Día 5 después de la reestimulación con α CD3/PD-L1 placa recubierta de proteína recombinante. La proliferación se cuantificó por medio de citometría de flujo usando un ensayo EDU click-it (media geométrica y % de células + EDU click-it); n = 4 donantes de células T independientes se probarán en experimentos independientes. Todas las construcciones ensayadas comprenden un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre los dominios Fc e IL-7.

Figura 17: Representación esquemática de las diferentes moléculas utilizadas en el ejemplo 8 y 9.

Figura 18: El mutante IL7 anti-PD-1 W142H demuestra una alta eficacia de unión a PD-1 y antagoniza la unión a PDL1. A. Ensayo ELISA de unión a PD-1. Se inmovilizó la proteína PD-1 recombinante humana (rPD1) y se añadieron anticuerpos a diferentes

13/111

concentraciones. La revelación se realizó con un anticuerpo anti-Fc humano acoplado a peroxidasa. La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB. El anti PD-1 con 1 (anti PD-1*1 ▲ gris) o 2 brazos anti PD-1 (anti PD-1*2 ◆ negro) fueron probados como control. Las moléculas bifuncionales que comprenden una variante de IL7 (IL7 anti-PD-1*2 W142H*2 ● negro), (IL7 anti-PD-1*2 W142H*1 □ negro), (IL7 anti-PD-1*1 W142H*2 ● gris), (IL7 anti-PD-1*1 W142H*1 ▼ gris) también fueron probados. B. Capacidad antagonista para bloquear PD-1/PD-L1 medida por medio de ELISA. Se inmovilizó PD-L1 y se añadieron los anticuerpos complejos + recombinante biotinilado PD-1 humano. Este complejo se generó con una concentración fija de PD1 (0,6 µg/mL) y diferentes concentraciones de anti-PD1*2 IL7 W142H*1 (■ línea simple), anti-PD1*2 IL7 W142H*2 (○ línea discontinua), anti PD-1*1 (gris▲ línea gris discontinua), anti-PD1*1 IL7 W142H*2 (gris ● línea gris simple) o anti-PD1*1 IL7 W142H*1 (gris▼ línea gris simple). Todas las construcciones ensayadas comprenden un ligando GGGGSGGGGSGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 19: Las moléculas IL7 anti-PD-1 construidas con una o dos valencias de anti PD-1 y una citocina IL-7 W142H activan pSTAT5 con alta eficacia. A. Unión PD-1/CD127 de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 W142H. Se inmovilizó la proteína recombinante PD-1, luego se añadieron diferentes concentraciones de moléculas bifuncionales y una cantidad fija de proteína recombinante CD127 (marcada con Histidina, Sino ref 10975-H08H). La revelación se realizó con una mezcla de un anticuerpo anti-histidina acoplado a biotina y estreptavidina acoplado a Peroxidasa. La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB. El anti-PD1*2 IL7 W142H1*1 (■) o anti-PD1*2 IL7 W142H*2 (● gris) fueron probados. B. Ensayo de señalización de pSTAT5 con cadenas principales anti-PD-1*2 fusionada con citocina IL-7 W142*1. Las PBMCs humanas aisladas de sangre periférica de voluntarios sanos se incubaron durante 15 minutos con anti-PD1*2 IL7 WT*2 (▼) o anti-PD1*2 IL7 W142H*1 (■ línea discontinua). Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anti CD3-BV421 y anti-pSTAT5 AF647 (clon 47/Stat5 (pY694)). Los datos se obtuvieron calculando el % de células pSTAT5 de MFI en la población de CD3+. C. Ensayo de señalización de pSTAT5 después del tratamiento con IL7 anti-PD-1*1 W142H*1 (●) IL7 anti-PD-1*2 WT*2 (■) o IL7 anti-PD1*2 W142H*1 (▲). Todas las construcciones de W142H probadas comprenden un IgG1m y un ligando GGGGGGGGGSGGGGGS entre el dominio Fc e IL-7.

Figura 20: Las moléculas IL7 anti-PD-1 construidas con una y dos valencias promueven significativamente la proliferación de células T *in vivo*. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con una dosis (34 nM/kg) de moléculas IL7 anti-PD-1*2

14/111

W142H*1, IL7 anti-PD-1*1 W142H*1, IL7 anti-PD-1*1 W142H*2), o un control de isotipo. El Día 4, se recogió sangre y las células T se tiñeron con un marcador de proliferación anti CD3, anti CD8, anti CD4 y ki67. Se cuantificó el porcentaje de KI67 en las poblaciones CD3 CD4+ y CD3 CD8+. La significación estadística (*p<0,05) se calculó con la prueba ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples con ratones de control, n=2 a 8 ratones por grupo de 2 experimentos independientes.

Figura 21: Los Anti PD-1*2 IL7*1, Anti PD-1*1 IL7*1, Anti PD-1*1 IL7*2 activan sinérgicamente la señalización de TCR. Bioensayo Promega PD-1/PD-L1: (1) Las células T efectoras (Jurkat que expresan de manera estable PD-1, luciferasa inducida por NFAT) y (2) células diana activadoras (células CHO K1 que expresan de manera estable PDL1 y proteína de superficie diseñadas para activar TCRs análogos de manera independiente del antígeno) se co-cultivaron. Después de agregar BioGlo™ luciferina, la luminiscencia se cuantifica y refleja la activación de las células T. A. Se añadieron anti-PD1*2 (● negro), IL7 anti-PD-1*2 W142H*1 (○ blanco) en concentraciones seriadas. Se añadieron en concentraciones seriadas el anticuerpo de isotipo se usó como control negativo de activación (■) B. Combinación de anti-PD1*1 + isotipo control IL7 W142H*2 (○ línea discontinua blanca), IL7 anti-PD-1*1 W142H *2 (● gris), IL7 anti-PD-1*1 W142H*1 (○ gris). Todas las construcciones de W142H probadas comprenden un IgG1m y un ligando GGGGGGGGGSGGGGGS entre los dominios Fc e IL-7.

Figura 22: Las IL7*1 Anti PD-1*2, IL7*1 Anti PD-1*1, IL7*2 Anti PD-1*1 W142H mutantes se unen y activan preferiblemente la señalización de pSTAT5 en las células PD-1+ CD127+ sobre las células PD-1-CD127+. Las células U937 que expresan CD127+ o coexpresan CD127+ y células PD-1+ se tiñeron con un colorante de proliferación celular (CPDe450 o CPDe670) y se cocultivaron en una razón 1:1 antes de la incubación con diferentes concentraciones de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1. La tinción con IgG PE antihumana y la activación de pSTAT5 se cuantificó después de la incubación por medio de citometría de flujo. A. Se calculó la unión a EC50 (nM) para cada tipo de célula y cada construcción. B. Se calculó EC50 pSTAT5 (nM) para cada tipo de célula y cada construcción. Después del tratamiento con moléculas bifuncionales, las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un AF647 catalogado con anti-pSTAT5 (clon 47/Stat5 (pY694). Activación de pSTAT5. Se calculó EC50 (nM) para cada construcción y cada tipo de célula U937 PD-1+ CD127+ (histograma blanco) y U937 PD-1-CD127+ (histograma negro). n=2 experimentos independientes. En este ensayo, se probaron IL7 anti-PD-1*2 W142*1, IL7 anti-PD-1*1 W142*1 y IL7 anti-PD-1*1 W142*2 y comprenden un isotipo IgG1m y un ligando GGGGGGGGGSGGGGGS entre el Fc y dominios IL-7.

15/111

Figura 23: Farmacocinética de las moléculas mutantes IL7*1 Anti PD-1*2, IL7*1 Anti PD-1*1, IL7*2 Anti PD-1*1 W142H después de la inyección intraperitoneal. A ratones PD1 humanizados se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis (34 nM/kg) de IL7 anti-PD-1*2 IL7*2 IgG4m (Δ), IL7 anti-PD-1*2 W142H*1 IgG1m ($\blacktriangledown$), IL7 anti-PD-1*1 W142H*1 IgG1m ($\bullet$ gris), o IL7 anti-PD-1*1 W142H*2 IgG1m ($\circ$ gris). La concentración de los fármacos en los sueros se evaluó por medio de ELISA después de la inyección hasta 48 h.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

Las moléculas según la invención son bifuncionales ya que combinan el efecto específico de la variante de interleucina 7 humana asociada al direccionamiento de diana específica expresada en células inmunitarias.

Como sabe el experto en la técnica, es posible que las células T no eliminen suficientemente las células tumorales debido a un fenómeno denominado agotamiento de las células T, observado en muchos cánceres. Como describen, por ejemplo, Jiang, Y., Li, Y. y Zhu, B (Cell Death Dis 6, e1792 (2015)), las células T agotadas en el microambiente tumoral pueden conducir a la sobreexpresión de receptores inhibidores, disminución de la producción de citocinas efectoras y actividad citolítica, lo que conduce al fracaso de la eliminación del cáncer y, en general, a la evasión inmune del cáncer. La restauración de las células T agotadas es entonces una estrategia clínica prevista para el tratamiento del cáncer.

En la técnica se conocen numerosos factores de agotamiento, como la proteína de muerte celular programada 1 (PD1), proteína 4 asociada-a-linfocitos-T-citotóxicos (CTLA-4), la proteína 3 de la membrana de las células T (TIM3) y la proteína del gen 3 de activación de linfocitos (LAG3), expresadas en la superficie de las células inmunitarias, en particular las células T. El ambiente inmunosupresor es particularmente inducido por medio de la interacción de dicha molécula y su contraparte expresada en la superficie de las células tumorales. Más particularmente, PD-1 es uno de los principales receptores inhibidores que regulan el agotamiento de las células T. De hecho, las células T con una alta expresión de PD-1 tienen una menor capacidad para eliminar las células cancerosas. Los compuestos terapéuticos anti-PD1, especialmente el anticuerpo anti-PD1, se usan clínicamente en el tratamiento del cáncer para bloquear el efecto inhibidor de la interacción PD1-PDL1 (PD1 en las células T y PDL1 en las células tumorales) y el agotamiento de las células T. Sin embargo, los anticuerpos anti-PD1 no siempre son suficientemente eficaces para permitir la «re»activación de las células T agotadas.

16/111

Los inventores demostraron que una molécula bifuncional que comprende una variante de IL-7 según la presente invención y una fracción de unión que bloquea una interacción inmunosupresora (inhibidor de puntos de control) sorprendentemente activa sinérgicamente una vía NFAT, la vía principal requerida para la activación de células T. De hecho, se ha observado una activación sinérgica de las células T a través de la señalización de TCR. Más particularmente, se ha demostrado que la variante bifuncional de IL-7, las moléculas anti-PD-1, conducen a una mejor activación de las células T, en particular de las células T agotadas, en comparación con el anti-PD-1 solo.

Los inventores han demostrado recientemente que la interacción de las moléculas bifuncionales con i) un factor de agotamiento expresado en la superficie de las células T como PD1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 y TIM3 (para la fracción de unión) y ii) el receptor IL7 (para el lado de la variante IL7) en una misma célula T, conduce a esta activación inesperada de la vía NFAT (señalización TCR) con el efecto positivo de la activación de las células T, y en particular las células T agotadas que de otro modo no serían capaces de eliminar las células tumorales. Este efecto nunca ha sido divulgado antes.

Además, el uso de variantes de IL-7 en las moléculas bifuncionales es importante para aumentar la farmacocinética *in vivo*. Además, al disminuir la afinidad de la variante de IL-7 por su receptor, aumenta la capacidad de las moléculas bifuncionales para unirse preferiblemente a las células inmunitarias dianas y presentar un efecto específico sobre estas células en comparación con otras, pero también para aprovechar la efecto sinérgico asociado a la acción de las dos partes de la molécula bifuncional sobre las mismas células inmunitarias. Más particularmente, se piensa que las moléculas bifuncionales que comprenden una variante de IL-7 y una fracción de unión dirigida a un factor de agotamiento permitirán la acumulación de IL-7 en infiltrados de células T y la relocalización de IL-7 en células T. Esta acumulación de IL-7 cerca de estas células T es de particular interés en el contexto de las células T agotadas que requieren altas dosis de IL-7 para activar o reactivar estas células T.

Sorprendentemente, los inventores observaron que las moléculas bifuncionales que tienen un dominio constante de cadena pesada de IgG1 tienen una actividad mejorada de las variantes de IL-7 (señal pStat5, efecto sinérgico y unión a CD127) en comparación con la misma molécula con un dominio constante de cadena pesada de IgG4. Esta mejora es específica de los IL-7 mutantes y no se ha observado con la IL-7 de tipo salvaje. Además, el uso de un ligando (GGGGS)₃ entre el anticuerpo y el IL-7 maximiza la actividad de las variantes de IL-7 (señal pStat5 y unión a CD127).

17/111

Las moléculas bifuncionales de la invención tienen en particular una o varias de las siguientes ventajas:

- Las moléculas bifuncionales permiten una localización específica de la variante de IL-7 cerca de las células inmunes como las células T o las células PD-1+, en particular en el tumor, dirigiéndose a las células que requieren una mayor concentración de IL-7.

- La mutación en las variantes de IL-7 disminuye la afinidad de las variantes de IL-7 por IL-7R sin pérdida completa o significativa de su actividad biológica intrínseca, en comparación con una IL-7 salvaje.

- La mutación en las variantes de IL-7 mejora la farmacocinética y la farmacodinámica *in vivo*, particularmente en comparación con la molécula bifuncional que comprende una IL-7 de tipo salvaje. Más particularmente, mejorar la farmacocinética y la farmacodinámica de la molécula permite que la molécula bifuncional alcance las células diana y actúe sobre la diana expresada en la superficie de las células inmunitarias.

- Las moléculas bifuncionales según la invención muestran actividad sinérgica del mutante IL7 (señalización NFAT).

- Las moléculas bifuncionales según la invención tienen la mayor actividad selectiva hacia las células PD-1(+) que las células PD-1(-) en comparación con los anticuerpos que comprenden el IL7 de tipo salvaje.

- Moléculas bifuncionales que comprenden una molécula IL-7 W142H mutada selectiva y sinérgicamente cis-activa en las células T agotadas de PD-1(+) CD127(+).

- Las variantes de IL-7 pueden incluirse en varias estructuras de moléculas bifuncionales que tienen una o dos moléculas de IL-7 y uno o dos fragmentos de unión a antígeno manteniendo la capacidad de unirse a su objetivo (por ejemplo, PD-1) y de activar la vía IL7R. En particular, las moléculas bifuncionales que tienen 1 o 2 variantes de IL7 W142H tienen un buen perfil farmacocinético *in vivo*.

- Los inventores muestran sorprendentemente las propiedades mejoradas de una construcción que comprende una única variante de IL-7 en comparación con construcciones que comprenden dos variantes de IL-7, tanto en términos de actividad como de farmacocinética.

Definiciones

A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, a continuación se definen determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos de la técnica, notaciones y otras terminologías científicas usadas en la presente invención pretenden tener los

significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente invención para mayor claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de tales definiciones en la presente invención no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sobre lo que se entiende generalmente en la técnica. Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en la presente invención generalmente se entienden bien y se emplean comúnmente utilizando metodologías convencionales por parte de los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente invención, los términos "interleucina-7 de tipo salvaje", "wt-IL-7" y "wt-IL7" se refieren a una glicoproteína secretora endógena de mamíferos, particularmente polipéptidos de IL-7, derivados y análogos de los mismos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con la IL-7 de mamífero funcional de tipo salvaje y una actividad biológica sustancialmente equivalente, por ejemplo, en bioensayos estándar o ensayos de afinidad de unión al receptor de IL-7. Por ejemplo, wt-IL-7 se refiere a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido recombinante o no recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos de: i) un polipéptido de IL-7 nativo o natural, ii) un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de IL-7, iii) un polipéptido análogo biológicamente activo de un polipéptido de IL-7, o iv) un polipéptido de IL-7 biológicamente activo. La IL-7 puede comprender su péptido señal o estar desprovista de ella. Las designaciones alternativas para esta molécula son "factor de crecimiento de células pre-B" y "linfopoyetina-1". Preferiblemente, el término "wt-IL-7" se refiere a IL-7 humana (wth-IL7). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de wt-IL-7 humana tiene aproximadamente 152 aminoácidos (en ausencia de péptido señal) y tiene un número de acceso de Genbank de NP_000871.1, estando el gen ubicado en el cromosoma 8q12-13. La IL-7 humana se describe, por ejemplo, en UniProtKB - P13232.

Como se usa en la presente invención, el término "anticuerpo" describe un tipo de molécula de inmunoglobulina y se usa en su sentido más amplio. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas y "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de

unión a antígeno" (como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenario (scFv), mutantes de los mismos, moléculas que comprenden una porción de anticuerpo, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluidas variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos. Preferiblemente, el término anticuerpo se refiere a un anticuerpo humanizado.

Una "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en la presente invención, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las conformaciones de anticuerpos. Las CDRs de la cadena pesada del anticuerpo normalmente se denominan "HCDR1", "HCDR2" y "HCDR3". Las regiones marco de la cadena pesada del anticuerpo se denominan típicamente "HFR1", "HFR2", "HFR3" y "HFR4".

Una "cadena ligera de anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a la más pequeña de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en las conformaciones de anticuerpos; las cadenas ligeras κ y λ se refieren a los dos principales isotipos de cadenas ligeras de anticuerpos. Las CDRs de la cadena ligera del anticuerpo se denominan típicamente "LCDR1", "LCDR2" y "LCDR3". Las regiones marco de la cadena ligera del anticuerpo se denominan típicamente "LFR1", "LFR2", "LFR3" y "LFR4".

Como se usa en la presente invención, un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo significa una parte de un anticuerpo, es decir, una molécula que corresponde a una parte de la estructura del anticuerpo de la invención, que exhibe capacidad de unión a antígeno para un antígeno particular, posiblemente en su forma nativa; dicho fragmento exhibe especialmente la misma o sustancialmente la misma especificidad de unión a antígeno para dicho antígeno en comparación con la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo de cuatro cadenas correspondiente. Ventajosamente, los fragmentos de unión a antígeno tienen una afinidad de unión similar a la de los anticuerpos de 4 cadenas correspondientes. Sin embargo, el fragmento de unión a antígeno que tiene una afinidad de unión a antígeno reducida con respecto a los anticuerpos de 4 cadenas correspondientes también se abarca en la invención. La capacidad de unión al antígeno se puede determinar midiendo la afinidad entre el anticuerpo y el fragmento diana. Estos fragmentos de unión a antígeno también pueden designarse como "fragmentos funcionales" de anticuerpos. Los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos son fragmentos que comprenden sus dominios hipervariables denominados CDRs (Regiones Determinantes Complementarias) o parte(s) de los mismos.

20/111

Como se usa en la presente invención, el término "anticuerpo humanizado" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, como un ratón, se han injertado en secuencias de marco humanas (por ejemplo, anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de un anticuerpo no humano). Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, también se refiere a un anticuerpo que se ha humanizado. Un anticuerpo humanizado es generalmente una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una o más CDRs se reemplazan por residuos de por lo menos una CDR de un anticuerpo no humano (anticuerpo donante) mientras se mantiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas del anticuerpo original. Se pueden realizar modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias de marco humanas. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado tiene una puntuación de humanidad T20 superior al 80 %, 85 % o 90 %. La "humanidad" de un anticuerpo se puede medir, por ejemplo, usando el analizador de puntuación T20 para cuantificar la humanidad de la región variable de anticuerpos como se describe en Gao SH, Huang K, Tu H, Adler A S. BMC Biotechnology. 2013: 13:55 o por medio de una herramienta web para calcular la puntuación T20 de las secuencias de anticuerpos usando las Bases de Datos Humanas de Corte T20: <http://abAnalyzer.lakepharma.com>.

Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo fabricado por medio de la combinación de material genético de una fuente no humana, preferiblemente como un ratón, con material genético de un ser humano. Tal anticuerpo deriva de anticuerpos humanos y no humanos unidos por medio de una región quimérica. Los anticuerpos quiméricos generalmente comprenden dominios constantes de humanos y dominios variables de otra especie de mamífero, reduciendo el riesgo de una reacción a anticuerpos extraños de un animal no humano cuando se utilizan en tratamientos terapéuticos.

Como se usa en la presente invención, los términos "fragmento de región cristalizabile", "región Fc" o "dominio Fc" son intercambiables y se refieren a la región de la cola de un anticuerpo que interactúa con los receptores de la superficie celular denominados receptores Fc. La región o dominio Fc normalmente se compone de dos dominios idénticos, derivados del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas del anticuerpo (es decir, los dominios CH2 y CH3). La porción del dominio Fc se refiere al dominio CH2 o CH3. Opcionalmente, la región o dominio Fc puede comprender opcionalmente toda o una parte de la región bisagra entre CH1 y CH2. Opcionalmente, el dominio Fc es el de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, opcionalmente con IgG1 bisagra-CH2-CH3 e IgG4 bisagra-CH2-CH3.

21/111

En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-215 según el índice de la UE como en Kabat. "Bisagra" se refiere a las posiciones 216-230 según el índice de la UE como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 231-340 según el índice UE como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice UE como en Kabat.

Por "cambio de aminoácidos" o "modificación de aminoácidos" se entiende en la presente invención como un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. "Modificaciones de aminoácidos" incluyen sustitución, inserción y/o delección en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en la presente invención se entiende por el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original con otro aminoácido. Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original. Por "delección de aminoácidos" o "delección" se entiende la remoción de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica original. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas. Una sustitución conservativa es el reemplazo de un residuo de aminoácido dado por medio de otro residuo que tiene una cadena lateral ("grupo R") con propiedades químicas similares (p. ej., carga, masa y/o hidrofobicidad). Como se usa en la presente invención, "posición de aminoácido" o "número de posición de aminoácido" se usan indistintamente y se refieren a la posición de un aminoácido particular en una secuencia de aminoácidos, generalmente especificada con los códigos de una letra para los aminoácidos. Se debe considerar que el primer aminoácido en la secuencia de aminoácidos (es decir, comenzando desde el extremo N) tiene la posición 1.

Una sustitución conservativa es el reemplazo de un residuo de aminoácido dado por medio de otro residuo que tiene una cadena lateral ("grupo R") con propiedades químicas similares (p. ej., carga, masa y/o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. Las sustituciones conservativas y las reglas correspondientes están bien descritas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las sustituciones conservativas se pueden definir por medio de sustituciones dentro de los grupos de aminoácidos reflejados en las siguientes tablas:

Tabla A – Residuos de aminoácidos

Grupos de aminoácidos	Residuos de aminoácidos
-----------------------	-------------------------

22/111

Residuos Ácidos	ASP y GLU
Residuos Básicos	LYS, ARG y SU
Residuos Hidrofílicos No Cargados	SER, THR, ASN y GLN
Residuos Alifáticos No Cargados	GLY, ALA, VAL, LEU e ILE
Residuos No Polares No Cargados	CYS, MET y PRO
Residuos Aromáticos	PHE, TYR y TRP

Tabla B - Grupos de Sustitución de Residuos de Aminoácidos Conservativos Alternativos

1	Alanina (A)	Serina (S)	Treonina (T)
2	Ácido aspártico (D)	Ácido glutámico (E)	
3	Asparagina (N)	Glutamina (Q)	
4	Arginina (R)	Lisina (K)	
5	Isoleucina (I)	Leucina (L)	Metionina (M)
6	Fenilalanina (F)	Tirosina (Y)	Triptófano (W)

Tabla C – Otras Clasificaciones Alternativas Físicas y Funcionales de Residuos de Aminoácidos

Residuos que contienen grupos de alcohol	S y T
Residuos alifáticos	I, L, V y M
Residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Residuos hidrofóbicos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Residuos cargados negativamente	D y E
Residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Residuos muy pequeños	A, G y S
Residuos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Residuos flexibles	E, Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Como se usa en la presente invención, la "identidad de secuencia" entre dos secuencias se describe por medio de el parámetro "identidad de secuencia", "similitud de secuencia" u "homología de secuencia". Para los fines de la presente invención, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias (A) y (B) se determina comparando las dos

secuencias alineadas de manera óptima, a través de una ventana de comparación. Dicho alineamiento de secuencias se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch. El *software* de análisis de proteínas equipara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluidas las sustituciones de aminoácidos conservativas. Una vez que se obtiene el alineamiento total, el porcentaje de identidad se puede obtener dividiendo el número total de residuos de aminoácidos idénticos alineados por el número total de residuos contenidos en la secuencia más larga entre la secuencia (A) y (B). La identidad de la secuencia normalmente se determina utilizando un *software* de análisis de secuencias. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, se puede usar, por ejemplo, la herramienta "*Emboss needle*" para la alineación de secuencias de proteínas por pares proporcionada por EMBL-EBI y disponible en:

www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein, por ejemplo, usando la configuración predeterminada: (i) Matriz: BLOSUM62, (ii) Hueco de apertura: 10, (iii) hueco de extensión: 0,5, (iv) formato de salida: par, (v) penalización de hueco final: falso, (vi) hueco de apertura final: 10, (vii) hueco de extensión final: 0,5.

Alternativamente, la identidad de la secuencia también se puede determinar típicamente usando el *software* de análisis de secuencias Clustal Omega usando el algoritmo HAlign y su configuración predeterminada como su motor de alineación principal. El algoritmo se describe en Söding, J. (2005) 'Protein homology detection by HMM–HMM comparison'. *Bioinformatics* 21, 951-960, con la configuración predeterminada.

Los términos "derivar de" y "derivado de" tal como se usan en la presente invención se refieren a un compuesto que tiene una estructura derivada de la estructura de un compuesto original o proteína y cuya estructura es suficientemente similar a las divulgadas en la presente invención y en base a esa similitud, se esperaría por un experto en la técnica para exhibir las mismas o similares propiedades, actividades y utilidades que los compuestos reivindicados.

Tal como se usa en la presente invención, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los agentes activos, como la que comprende una molécula bifuncional según la invención, con otros componentes químicos opcionales, como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración del agente activo a un organismo. Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para cualquier vía convencional de administración o uso. En una realización, una "composición"

24/111

normalmente se refiere a una combinación del agente activo, por ejemplo, compuesto o composición, y un vehículo natural o de origen no natural, inerte (por ejemplo, un agente o etiqueta detectable) o activo, tales como adyuvantes, diluyentes, aglutinantes, estabilizadores, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes o similares e incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables. Un "vehículo aceptable" o "vehículo aceptable", tal como se hace referencia en la presente invención, es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos que los expertos en la técnica saben que es útil para formular composiciones farmacéuticas.

"Una cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente invención se refiere a la cantidad de agente activo necesaria para conferir un efecto terapéutico al sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más agentes activos, por ejemplo, la cantidad de agente activo que se necesita para tratar la enfermedad o trastorno diana, o para producir el efecto deseado. La "cantidad efectiva" variará dependiendo del agente(s), la enfermedad y su gravedad, las características del sujeto a tratar incluyendo edad, condición física, tamaño, género y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de terapia concurrente (si la hay), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden abordarse con no más que experimentación de rutina. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el juicio médico razonable.

Como se usa en la presente invención, el término "medicamento" se refiere a cualquier sustancia o composición con propiedades curativas o preventivas contra trastornos o enfermedades.

El término "tratamiento" se refiere a cualquier acto destinado a mejorar el estado de salud de los pacientes, como terapia, prevención, profilaxis y retardo de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad. Designa tanto un tratamiento curativo como un tratamiento profiláctico de una enfermedad. Un tratamiento curativo se define como un tratamiento que resulta en la cura o un tratamiento que alivia, mejora y/o elimina, reduce y/o estabiliza una enfermedad o los síntomas de una enfermedad o el sufrimiento que causa directa o indirectamente. Un tratamiento profiláctico comprende tanto un tratamiento que tiene como resultado la prevención de una enfermedad como un tratamiento que reduce y/o retrasa la progresión y/o la incidencia de una enfermedad o el riesgo de su aparición. En ciertas realizaciones, tal término se refiere a la mejora o erradicación de una enfermedad, un trastorno, una infección o síntomas asociados con la misma. En otras

realizaciones, este término se refiere a minimizar la propagación o el empeoramiento de los cánceres. Los tratamientos según la presente invención no implican necesariamente el 100% o el tratamiento completo. Existen diversos grados de tratamiento que un experto en la técnica reconoce que tienen un beneficio potencial o un efecto terapéutico. Preferiblemente, el término "tratamiento" se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto que tiene un trastorno/enfermedad.

Como se usa en la presente invención, los términos "trastorno" o "enfermedad" se refieren al órgano, parte, estructura o sistema del cuerpo que funciona incorrectamente como resultado del efecto de errores genéticos o de desarrollo, infección, venenos, deficiencia o desequilibrio nutricional, toxicidad, o factores ambientales desfavorables. Preferiblemente, estos términos se refieren a un trastorno de salud o enfermedad, por ejemplo, una enfermedad que interrumpe las funciones físicas o mentales normales. Más preferiblemente, el término trastorno se refiere a enfermedades inmunitarias y/o inflamatorias que afectan a animales y/o seres humanos, como el cáncer.

"Células inmunitarias", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa, por ejemplo, como glóbulos blancos (leucocitos) que se derivan de células madre hematopoyéticas (HSC) producidas en la médula ósea, linfocitos (células T, células B, células aniquilantes naturales (NK) y células T aniquilantes naturales (NKT) y células derivadas de mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas). En particular, la célula inmune puede seleccionarse en la lista no exhaustiva que comprende células B, células T, en particular células T CD4+ y células T CD8+, células NK, células NKT, células APC, células dendríticas y monocitos. "Célula T" como se usa en la presente invención incluye, por ejemplo, células T CD4+, células T CD8+, células T colaboradoras tipo T 1, células T colaboradoras tipo T 2, células T colaboradoras tipo T 17 y células T inhibidoras.

Como se usa en la presente invención, el término "célula T efectora", "T eff" o "célula efectora" describe un grupo de células inmunitarias que incluye varios tipos de células T que responden activamente a un estímulo, como la coestimulación. Incluye particularmente células T que funcionan para eliminar el antígeno (p. ej., mediante la producción de citocinas que modulan la activación de otras células o mediante actividad citotóxica). En particular, incluye CD4+, CD8+, células T citotóxicas y células T auxiliares (Th1 y Th2).

Como se usa en la presente invención, el término "célula T reguladora", "células Treg" o "T reg" se refiere a una subpoblación de células T que modulan el sistema inmunológico, mantienen la tolerancia a los autoantígenos y previenen enfermedades autoinmunes. Las

26/111

Treg son inmunosupresoras y generalmente suprimen o regulan a la baja la inducción y proliferación de células T efectoras. Las Treg expresan los biomarcadores CD4, FOXP3 y CD25 y se cree que derivan del mismo linaje que las células CD4 vírgenes.

El término "células T agotadas" se refiere a una población de células T en un estado de disfunción (es decir, "agotamiento"). El agotamiento de las células T se caracteriza por la pérdida progresiva de la función, cambios en los perfiles transcripcionales y expresión sostenida de receptores inhibidores. Las células T agotadas pierden su capacidad de producción de citocinas, su alta capacidad proliferativa y su potencial citotóxico, lo que eventualmente conduce a su delección. Las células T agotadas típicamente indican niveles más altos de CD43, CD69 y receptores inhibitorios combinados con una expresión más baja de CD62L y CD127.

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluidos anticuerpos, citocinas y complementos) que resulta en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación desde el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

El término "antagonista", como se usa en la presente invención, se refiere a una sustancia que bloquea o reduce la actividad o funcionalidad de otra sustancia. Particularmente, este término se refiere a un anticuerpo que se une a un receptor celular (p. ej., PD-1) como sustancia de referencia (p. ej., PD-L1 y/o PD-L2), evitando que produzca todos o parte de sus efectos biológicos habituales (p. ej., la creación de un microambiente inmunosupresor). La actividad antagonista de un anticuerpo humanizado según la invención puede evaluarse mediante ELISA competitivo.

El término "agonista", como se usa en la presente invención, se refiere a una sustancia que activa la funcionalidad de un receptor activador. En particular, este término se refiere a un anticuerpo que se une a un receptor de activación celular como sustancia de referencia y tiene por lo menos parcialmente el mismo efecto que el ligando biológicamente natural (p. ej., inducir el efecto activador del receptor).

La farmacocinética (PK) se refiere al movimiento de los fármacos a través del cuerpo, mientras que la farmacodinámica (PD) se refiere a la respuesta biológica del cuerpo a los fármacos. La PK describe la exposición de un fármaco al caracterizar la absorción, distribución, biodisponibilidad, metabolismo y excreción en función del tiempo. La PD describe la respuesta a los fármacos en términos de interacciones bioquímicas o

27/111

moleculares. Las análisis PK y PD se utilizan para caracterizar la exposición al fármaco, predecir y evaluar cambios en la dosis, estimar la tasa de eliminación y la tasa de absorción, evaluar la biodisponibilidad/bioequivalencia relativa de una formulación, caracterizar la variabilidad intra e intersujeto, comprender las relaciones concentración-efecto, y establecer márgenes de seguridad y características de eficacia. Por "mejorar PK" se quiere decir que se mejora una de las características anteriores, por ejemplo, como una mayor semivida de la molécula, en particular una semivida en suero más larga de la molécula cuando se inyecta a un sujeto.

Como se usa en la presente invención, el término "aislado" indica que el material mencionado (p. ej., anticuerpo, polipéptido, ácido nucleico, etc.) está sustancialmente separado o enriquecido, con respecto a otros materiales con los que se encuentra en la naturaleza. Particularmente, un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

El término "y/o" tal como se utiliza en la presente invención debe interpretarse como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente.

El término "un" o "un" puede referirse a uno o a una pluralidad de los elementos que modifica (p. ej., "un reactivo" puede significar uno o más reactivos) a menos que sea contextualmente claro uno de los elementos o más de uno de los elementos se describe.

El término "aproximadamente", tal como se utiliza en la presente invención en relación con todos y cada uno de los valores (incluidos los extremos inferior y superior de los rangos numéricos), significa cualquier valor que tenga un rango aceptable de desviación de hasta +/- 10 % (por ejemplo, +/- 0,5 %, +/- 1 %, +/- 1,5 %, +/- 2 %, +/- 2,5 %, +/- 3 %, +/- 3,5 %, +/- 4 %, +/- 4,5 %, +/- 5 %, +/- 5,5 %, +/- 6 %, +/- 6,5 %, +/- 7 %, +/- 7,5 %, +/- 8 %, +/- 8,5 %, +/- 9 %, +/- 9,5 %). El uso del término "acerca de" al comienzo de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir, "acerca de 1, 2 y 3" se refiere a acerca de 1, acerca de 2 y acerca de 3). Además, cuando se describe una lista de valores en la presente invención (p. ej., aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % u 86 %), la lista incluye todos los valores intermedios y fraccionarios de los mismos (p. ej., 54 %, 85,4 %).

Mutantes de IL-7

La presente divulgación proporciona mutantes de interleucina 7 (IL-7m) y moléculas bifuncionales que comprenden una primera entidad que comprende un mutante de interleucina 7 (IL-7m) y una segunda entidad que comprende una fracción de unión.

28/111

Los términos "mutante de interleucina-7", "IL-7 mutada", "mutante de IL-7", "variante de IL-7", "IL-7m" o IL-7v" se usan indistintamente en la presente invención. Una "variante" o "mutante" de una proteína IL-7 se define como una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos. La variante puede tener modificaciones "conservativas" o modificaciones "no conservativas". Dichas modificaciones pueden incluir sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos. Preferiblemente, las modificaciones son sustituciones, en particular sustituciones conservativas. Las variantes de proteínas IL-7 incluidas en la invención conciernen específicamente a proteínas IL-7 que no retienen propiedades biológicas sustancialmente equivalentes (por ejemplo, actividad, capacidad de unión y/o estructura) en comparación con una IL-7 de tipo salvaje. El mutante o variante de IL-7 comprende por lo menos una mutación. Particularmente, la por lo menos una mutación disminuye la afinidad de IL-7m por IL-7R pero no conduce a la pérdida del reconocimiento de IL-7R. Por consiguiente, el mutante o variante de IL-7 retiene la capacidad de activar IL-7R, por ejemplo, medida por la señal pStat5, por ejemplo, tal como se describe en Bitar *et al.*, Front. Immunol., 2019, tomo 10). La actividad biológica de la proteína IL-7 se puede medir utilizando ensayos de proliferación celular *in vitro* o midiendo el P-Stat5 en las células T por medio de ELISA o FACS. Preferiblemente, las variantes de IL-7 según la invención tienen propiedades biológicas reducidas (por ejemplo, actividad, capacidad de unión y/o estructura) por al menos un factor 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000 u 8000 en comparación con la IL-7 de tipo salvaje, preferiblemente la wth-IL7. Más preferiblemente, las variantes de IL-7 tienen una unión reducida al receptor de IL-7 pero retienen la capacidad de activar IL-7R. Por ejemplo, la unión al receptor de IL-7 puede reducirse por lo menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % en comparación con el tipo salvaje de IL-7, y conserva la capacidad de activar IL-7R en por lo menos un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % en comparación con la IL-7 de tipo salvaje. Preferiblemente, la IL-7m es una variante de la IL-7 de tipo salvaje humana, por ejemplo, tal como se describe en SEQ ID NO:1.

En una realización, las variantes de IL-7 según la invención mantener la actividad biológica por lo menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % en comparación con la IL-7 humana de tipo salvaje, preferiblemente por lo menos 80 %, 90 %, 95 % e incluso más preferiblemente 99 % en comparación con la IL-7 de tipo salvaje.

En un aspecto, la variante o mutante de IL-7 difiere de wt-IL-7 por al menos una mutación de aminoácido que i) reduce la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wt-IL-7 por IL-7R, y ii) mejora la farmacocinética de la variante de IL7 en comparación con wt-IL7. Más particularmente, la

29/111

variante o mutante de IL-7 retiene además la capacidad de activar IL-7R, en particular a través de la señalización de pStat5.

En otro aspecto, la molécula bifuncional que comprende una variante o mutante de IL-7 difiere de una wt-IL-7 por al menos una mutación de aminoácido que i) reduce la afinidad de la molécula bifuncional por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad por IL-7R de una molécula bifuncional que comprende wt-IL-7, y ii) mejora la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende una variante o mutante de IL-7 en comparación con la molécula bifuncional que comprende wt-IL-7. Más particularmente, la molécula bifuncional que comprende una variante o mutante de IL-7 retiene además la capacidad de activar IL-7R, en particular a través de la señalización de pStat5. Por ejemplo, la molécula bifuncional de unión que comprende una variante o mutante de IL-7 al receptor de IL-7 puede reducirse por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % en comparación con la molécula bifuncional que comprende una IL-7 de tipo salvaje, y conserva la capacidad de activar IL-7R en por lo menos 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 % o 20 % en comparación con la molécula bifuncional que comprende una IL-7 de tipo salvaje.

Según la invención, la IL-7m presenta una afinidad reducida por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R. En particular, la IL-7m presenta una afinidad reducida por CD127 y/o CD132 en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por CD127 y/o CD132, respectivamente. Preferiblemente, la IL-7m presenta una afinidad reducida por CD127 en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por CD127.

Preferiblemente, la por lo menos una mutación de aminoácido disminuye la afinidad de IL-7m por IL-7R, en particular CD132 o CD127, en por lo menos un factor de 10, 100, 1000, 10 000 o 100 000, en comparación con la afinidad de wt-IL-7 para IL-7R. Tal comparación de afinidad se puede realizar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, como ELISA o Biacore.

Preferiblemente, la por lo menos una mutación de aminoácido disminuye la afinidad de IL-7m por IL-7R pero no disminuye la actividad biológica de IL-7m en comparación con IL-7 wt, en particular según lo medido por la señal pStat5.

Alternativamente, la por lo menos una mutación de aminoácido disminuye la afinidad de IL-7m por IL-7R pero no disminuye significativamente la actividad biológica de IL-7m en comparación con IL-7 wt, en particular según lo medido por la señal pStat5.

Adicional o alternativamente, la IL-7m mejora la farmacocinética de la variante o mutante de IL-7 o de la molécula bifuncional que comprende la variante de IL-7 en comparación con una IL-7 de tipo salvaje o una molécula bifuncional que comprende una IL-7 de tipo salvaje, respectivamente. En particular, la IL-7m según la invención mejora la

30/111

farmacocinética de la variante de IL-7 en por lo menos un factor de 10, 100 o 1000 en comparación con una wth-IL-7. Particularmente, la IL-7m según la invención mejora la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante o mutante de IL-7 en por lo menos un factor 10, 100 o 1000 en comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7. La comparación del perfil farmacocinético puede realizarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, como la inyección del fármaco *in vivo* y la dosificación ELISA del fármaco en los sueros en múltiples momentos, por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 2.

Como se usa en la presente invención, los términos "farmacocinética" y "PK" se usan indistintamente y se refieren al destino de los compuestos, sustancias o fármacos administrados a un organismo vivo. La farmacocinética comprende particularmente el esquema ADME o LADME, que significa Liberación (es decir, la liberación de una sustancia de una composición), Absorción (es decir, la entrada de la sustancia en la circulación sanguínea), Distribución (es decir, dispersión o diseminación de la sustancia a través del cuerpo) Metabolismo (es decir, transformación o degradación de la sustancia) y Excreción (es decir, remoción o depuración de la sustancia del organismo). Las dos fases de metabolismo y excreción también se pueden agrupar en el título de eliminación. El experto en la técnica puede controlar diferentes parámetros farmacocinéticos, como la semivida de eliminación, la velocidad constante de eliminación, la depuración (es decir, el volumen de plasma depurado del fármaco por unidad de tiempo), la C_{max} (concentración sérica máxima) y exposición al fármaco (determinada por el área bajo la curva, ver Scheff *et al*, Pharm Res. 2011 May;28(5):1081-9) entre otros.

Luego, la mejora de la farmacocinética por el uso de IL-7m, en particular en una molécula bifuncional, se refiere a la mejora de por lo menos uno de los parámetros mencionados anteriormente. Preferiblemente, se refiere a la mejora de la semivida de eliminación de la molécula bifuncional, es decir, el aumento de la duración de la semivida o de la C_{max}.

En una realización particular, la por lo menos una mutación de IL-7m mejora la semivida de eliminación de una molécula bifuncional que comprende IL-7m en comparación con una molécula bifuncional que comprende IL-7 wt.

En una realización, la IL-7m presenta por lo menos el 75 %, por lo menos el 80 %, por lo menos el 85 %, por lo menos el 90 %, por lo menos el 95 %, por lo menos el 97 %, por lo menos el 98 % o por lo menos el 99 % de identidad con la proteína IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) de 152 aminoácidos, tal como se describe en SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la IL-7m presenta por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos

31/111

85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad con SEQ ID NO: 1.

Particularmente, la por lo menos una mutación ocurre en la posición de aminoácido 74 y/o 142 de IL-7. Adicional o alternativamente, la por lo menos una mutación ocurre en las posiciones de aminoácido 2 y 141, 34 y 129 y/o 47 y 92. Estas posiciones se refieren a la posición de los aminoácidos establecidos en SEQ ID NO:1.

En particular, la por lo menos una mutación es una sustitución de aminoácidos o un grupo de sustituciones de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, C47S-C92S y C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, Q11E, Y12F, M17L, Q22E, K81R, D74E, D74Q y D74N o cualquier combinación de los mismos. Estas mutaciones se refieren a la posición del aminoácido establecida en SEQ ID NO:1. Entonces, por ejemplo, la mutación W142H representa la sustitución del triptófano de la wth-IL7 por una histidina, para obtener una IL-7m que tiene una histidina en la posición del aminoácido 142. Dicho mutante se describe, por ejemplo, en SEQ ID No:5.

En una realización, la IL-7m comprende conjuntos de sustituciones para romper los enlaces disulfuro entre C2 y C141, C47 y C92 y C34-C129. En particular, la IL-7m comprende dos conjuntos de sustituciones para romper los enlaces disulfuro entre C2 y C141, y C47 y C92; C2 y C141 y C34-C129; o C47 y C92, y C34-C129. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden sustituirse por serina para evitar la formación de enlaces disulfuro. Por consiguiente, las sustituciones de aminoácidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S (denominados "SS2"), C2S-C141S y C34S-C129S (denominados "SS1"), y C47S-C92S y C34S -C129S (referido como "SS3"). Estas mutaciones se refieren a la posición de los aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:1. Dichos IL-7m se describen particularmente en la secuencia establecida en SEQ ID Nos: 2 a 4 (SS1, SS2 y SS3, respectivamente). Preferiblemente, la IL-7m comprende las sustituciones de aminoácidos C2S-C141S y C47S-C92S. Aún más preferiblemente, la IL-7m presenta la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3.

En otra realización, la IL-7m comprende por lo menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en W142H, W142F y W142Y. Dichos IL-7m se describen particularmente en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5 a 7, respectivamente. Preferiblemente, la IL-7m comprende la mutación W142H. Aún más preferiblemente, la IL-7m presenta la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5.

En otra realización, la IL-7m comprende por lo menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en D74E, D74Q y D74N, preferiblemente D74E y D74Q. Dichos IL-7m se describen particularmente en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 12 a 14,

32/111

respectivamente. Preferiblemente, la IL-7m comprende la mutación D74E. Aún más preferiblemente, la IL-7m presenta la secuencia establecida en SEQ ID NO: 12.

En otra realización, la IL-7m comprende por lo menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R. Estas mutaciones se refieren a la posición de los aminoácidos establecidas en SEQ ID NO:1. Dichos IL-7m se describen particularmente en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 y 15, respectivamente.

En una realización, la IL-7m comprende por lo menos una mutación que consiste en i) W142H, W142F o W142Y y/o ii) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q y/o iii) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S.

En una realización, la IL-7m comprende la sustitución W142H y por lo menos una mutación que consiste en i) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q y/o ii) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S o C47S-C92S y C34S-C129S.

En una realización, la IL-7m comprende la sustitución de D74E y por lo menos una mutación que consiste en i) W142H, W142F o W142Y y/o ii) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S.

En una realización, la IL-7m comprende las mutaciones C2S-C141S y C47S-C92S y por lo menos una sustitución que consiste en i) W142H, W142F o W142Y y/o ii) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q.

En una realización, la IL-7m comprende i) las sustituciones D74E y W142H y ii) las mutaciones C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S o C47S-C92S y C34S-C129S.

Las proteínas IL-7m pueden comprender su péptido señal o estar desprovistas de ella. Una variante de IL-7 también puede incluir una secuencia polipeptídica de IL-7 alterada (por ejemplo, formas oxidadas, reducidas, desaminadas o truncadas).

En un aspecto, la variante o mutante de IL-7 utilizada en la presente invención es una IL-7 recombinante. El término "recombinante", como se usa en la presente invención, significa que el polipéptido se obtiene o se deriva de un sistema de expresión recombinante, es decir, de un cultivo de células huésped (por ejemplo, microbianas, de insectos, de plantas o de mamíferos) o de plantas o animales transgénicos manipulados genéticamente para contener una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-7m. Preferiblemente, la IL-7 recombinante es una IL-7m recombinante humana (por ejemplo, una IL-7m humana producida en un sistema de expresión recombinante).

En una realización, la IL-7m presenta la secuencia establecida en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. Preferiblemente, la molécula bifuncional según la

33/111

invención comprende una variante de IL-7 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2-15. Aún más preferiblemente, la molécula bifuncional según la invención comprende una variante de IL-7 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO 3, 5 o 12.

En una realización, la invención proporciona variantes de IL-7 y moléculas bifuncionales que comprenden variantes de IL-7, que tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con las proteínas de IL-7 de tipo salvaje, particularmente mediante la eliminación de epítomos de células T dentro de IL-7 que pueden estimular a una respuesta inmune. En el documento WO 2006061219 se describen ejemplos de dicha IL-7.

La presente invención también se refiere a cualquier proteína de fusión que comprenda las variantes o mutantes de IL-7 como se divulga en la presente invención y cualquier conjugado que comprenda las variantes o mutantes de IL-7 como se divulga en la presente invención. Las variantes o mutantes de IL-7 pueden fusionarse por su final de extremo N o su final de extremo C. Las variantes o mutantes de IL-7 pueden fusionarse o conjugarse con un péptido, una proteína (p. ej., anticuerpo, fragmento y derivado del mismo, imitadores de anticuerpos, citocina o receptor de citocina, antígenos virales o tumorales, albúmina o proteína de unión a albúmina), un polímero (p. ej., PEG), un compuesto químico como un fármaco (p. ej., agente anticancerígeno o antiviral), un carbohidrato y una molécula de ácido nucleico (p. ej., siRNA, shRNA, antisentido, Gapmer).

Una lista no exhaustiva de moléculas que se pueden conjugar o fusionar con variantes o mutantes de IL-7 incluye un anticuerpo tal como un anti-CD19, un anti-calreticulina, un antígeno antitumoral; una citocina o un receptor de citocina como IL-15 o IL-15R; un dominio que prolonga la semivida de la variante de IL-7, como una región Fc de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina, un polipéptido de unión a albúmina, Pro/Ala/Ser (PAS), un péptido extremo C (CTP) de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana, polietilenglicol (PEG), secuencias hidrofílicas largas no estructuradas de aminoácidos (XTEN), hidroxietilalmidón (HES), una molécula pequeña que se une a la albúmina y una combinación de los mismos; y un péptido de unión a fibronectina.

Ejemplos particulares de proteínas de fusión o conjugados que incluyen IL-7 están divulgadas, por ejemplo, en los documentos WO19222294, WO19215510, WO19178362, WO19178364, WO19144309, WO19046313, WO18215937, WO18201047, WO18064611, WO17216223, US2018319858, WO17158436, WO16200219, WO05063820.

En un aspecto particular, la variante o mutante de IL-7 puede estar comprendida en una molécula bifuncional que comprende una fracción de unión.

Fracción de unión

34/111

La molécula bifuncional según la invención comprende una variante de IL-7 del mutante como divulgado en la presente invención y una entidad adicional o segunda que comprende una fracción de unión.

Se entiende que la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional no es una interleucina, en particular, no es IL-7 ni IL-7R.

Conforme se usa en la presente invención, la expresión "fracción de unión" se refiere a cualquier fracción que tenga la capacidad de unirse a una diana, como péptido, polipéptido, proteína, proteína de fusión y anticuerpos. En particular, las fracciones de unión incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos del mismo y imitadores o miméticos de anticuerpos. Los objetivos de las fracciones de unión se definen más particularmente a continuación.

En una realización, la fracción de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un fragmento del mismo, y un imitador o mimético de anticuerpo. Aquellos expertos en la técnica de la bioquímica están familiarizados con imitadores o miméticos de anticuerpos, como se analiza en Gebauer y Skerra, 2009, *Curr Opin Chem Biol* 13(3): 245-255. Ejemplos de imitadores de anticuerpos incluyen: *affibodies* (también llamados Trinectinas; Nygren, 2008, *FEBS J*, 275, 2668-2676); CTLD (también llamados Tetranectinas; *Innovations Pharmac. Technol.* (2006), 27-30); adnectinas (también llamadas monocuerpos; *Meth. Mol. Biol.*, 352 (2007), 95-109); anticalinas (*Drug Discovery Today* (2005), 10, 23-33); DARPins (anquirinas; *Nat. Biotechnol.* (2004), 22, 575-582); avimeros (*Nat. Biotechnol.* (2005), 23, 1556-1561); microcuerpos (*FEBS J*, (2007), 274, 86-95); aptámeros (*Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005), 5, 783-797); Dominios de Kunitz (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2006) 318, 803-809); affilins (*Tendencias. Biotechnol.* (2005), 23, 514-522); affitinas (Krehenbrink *et al*, 2008, *J. Mol. Biol.* 383 (5): 1058-68), alfabodies (Desmet, J.; *et al*, 2014, *Nature Communications*. 5: 5237), fynomer (Grabulovski D; *et al*, 2007, *J Biol Chem*. 282 (5): 3196-3204) y afirmadores (Avacta Life Sciences, Wetherby, Reino Unido).

Por consiguiente, la fracción de unión se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo, preferiblemente como inmunoglobulinas, scFv o VHH, Fab, anticuerpo de dominio único e imitador de anticuerpo, preferiblemente como *affibodies*, CTLDs, anectinas, anticalinas, DARPins, avimeros, microcuerpos, aptámeros, dominios de Kunitz, affilinas, affitinas, alfacuerpos, finómeros y afímeros.

Preferiblemente, la fracción de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la misma. Incluso más preferiblemente, la fracción de unión es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Diana de la fracción de unión

Según la invención, la fracción de unión se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, particularmente las dianas que se expresan única o específicamente en las células inmunitarias. En particular, la fracción de unión no se dirige hacia una diana expresada en células tumorales.

Con respecto a la capacidad de "unión" de la fracción de unión, los términos "unión" o "unión" se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas y anticuerpos (incluidos fragmentos de anticuerpos e imitadores de anticuerpos) que reconocen y contactan con otro péptido, polipéptido, proteína o molécula. En una realización, se refiere a una interacción de tipo antígeno-anticuerpo. Los términos "unión específica", "se une específicamente a", "específico para", "se une selectivamente" y "selectivo para" un objetivo particular significa que la fracción de unión reconoce y se une a un objetivo específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente (o preferiblemente) a un antígeno es un anticuerpo que se une al antígeno, por ejemplo, con mayor afinidad, aidez, más fácilmente y/o con mayor duración que a otras moléculas. Preferiblemente, el término "unión específica" significa el contacto entre un anticuerpo y un antígeno con una afinidad de unión igual o inferior a 10^{-7} M. En ciertos aspectos, los anticuerpos se unen con afinidades iguales o inferiores a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M.

Como se usa aquí, el término "diana" se refiere a un carbohidrato, lípido, péptido, polipéptido, proteína, antígeno o epítipo que es específicamente reconocido o dirigido por la fracción de unión según la invención y expresado en la superficie externa de las células inmunitarias. Con respecto a la expresión de un objetivo en la superficie de las células inmunitarias, el término "expresado" se refiere a una diana, como carbohidratos, lípidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, antígenos o epítipos que están presentes o presentados en la superficie exterior de una célula. El término "expresado específicamente" significa que el objetivo se expresa en las células inmunitarias, pero no se expresa sustancialmente en otro tipo de células, particularmente, como las células tumorales.

En una realización, la diana se expresa específicamente por células inmunitarias en un sujeto sano o en un sujeto que padece una enfermedad, en particular, como un cáncer. Esto significa que la diana tiene un nivel de expresión más alto en las células inmunitarias que en otras células o que la razón de células inmunitarias que expresan la diana por el total de células inmunitarias es mayor que la razón de otras células que expresan la diana por el total de otras células. Preferiblemente, el nivel o razón de expresión es mayor por un factor de 2, 5, 10, 20, 50 o 100. Más específicamente, se puede determinar para un tipo

36/111

particular de células inmunes, por ejemplo, células T, más específicamente células T CD8+, células T efectoras o células T agotadas, o en un contexto particular, por ejemplo, un sujeto que padece una enfermedad como un cáncer o una infección.

“Células inmunitarias”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a células implicadas en la inmunidad innata y adaptativa, por ejemplo, como glóbulos blancos (leucocitos) que se derivan de células madre hematopoyéticas (HSC) producidas en la médula ósea, linfocitos (células T, células B, células aniquilantes naturales (NK) y células T aniquilantes naturales (NKT)) y células derivadas de mieloides (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas). En particular, la célula inmune puede seleccionarse en la lista no exhaustiva que comprende células B, células T, en particular células T CD4⁺ y células T CD8⁺, células NK, células NKT, células APC, macrófagos, células dendríticas y monocitos.

Preferiblemente, la fracción de unión se une específicamente a células inmunitarias expresadas como diana seleccionadas del grupo que consiste en células B, células T, aniquilantes naturales, células dendríticas, monocitos y células linfoides innatas (ILCs).

Incluso más preferiblemente, la célula inmunitaria es una célula T. “Célula T” o “linfocitos T”, como se usa en la presente invención, incluye, por ejemplo, células T CD4+, células T CD8+, células T colaboradoras tipo T 1, células T colaboradoras tipo T 2, reguladoras T, células T colaboradoras tipo T 17 y células T inhibidoras. En una realización muy particular, la célula inmune es una célula T agotada.

La diana puede ser un receptor expresado en la superficie de las células inmunes, especialmente las células T. El receptor puede ser un receptor inhibidor. Alternativamente, el receptor puede ser un receptor activador.

En un aspecto, la diana se selecciona del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8. Dichas dianas se divulgan más particularmente en la Tabla D a continuación.

Nombre	Nombre oficial	Referencia Uniprot
2B4	Receptor de células aniquilantes naturales 2B4 (proteína receptora 2B4 de células NK tipo I, NKR2B4) (asociado a aniquilación no restringida por MHC) (miembro de la	Q07763

37/111

	familia SLAM 4, SLAMF4) (molécula de señalización para activación linfocítica 4) (antígeno CD CD244)	
4-1BB	Miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 9 (receptor de ligando 4-1BB, CD137)	Q07011
BTLA	Atenuador de linfocitos B y T (proteína asociada a linfocitos B y T) (antígeno CD CD272)	Q7Z6A9
CD101	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulina 2, IgSF2 (glicoproteína de superficie celular V7) (proteína que contiene el motivo Glu-Trp-Ile EWI 101, EWI-101) (antígeno CD CD101)	Q93033
CD160	Antígeno CD160 (receptor de células aniquilantes naturales BY55)	O95971
CD27	Antígeno CD27 (receptor CD27L) (antígeno de activación de célula T CD27) (T14) (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 7) (antígeno CD CD27)	P26842
CD28	Glicoproteína de superficie específica de célula T CD28 (TP44)	P10747
CD28H	Proteína que contiene el dominio transmembranar y de inmunoglobulina 2 (homólogo CD28) (receptor rico en inmunoglobulina y prolina 1, IGPR-1)	Q96BF3
CD3	Glicoproteína de superficie de célula T CD3	P07766 (CD3e) P04234 (CD3d) P09693 (CD3g)
CD30	Miembro de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral 8 (ligando CD30, CD30-L) (antígeno CD CD153)	P32971
CD38	Hidrolasa de ADP-ribosil ciclase/ADP-ribosa cíclica 1 (ADPRC 1, hidrolasa cADPr 1)	P28907
CD39	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (NTPDasa 1, Ecto-apirasa, ATPDasa 1 o antígeno de activación de células linfoides)	P49961

38/111

CD4	Glicoproteína de superficie de célula T CD4 (antígeno de superficie de célula T T4/Leu-3)	P01730
CD40L	Ligando CD40 (antígeno de célula T Gp39, proteína de activación relacionada con TNF, miembro de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral 5, CD154)	P29965
CD44	Antígeno CD44 (Epican, receptor de matriz extracelular III, receptor de adhesión/búsqueda de linfocitos GP90, HUTCH-I, proteoglicano de sulfato de heparán, antígeno de Hermes, receptor de hialuronato, Glicoproteína fagocítica 1, Glicoproteína fagocítica I)	P16070
CD8	Glicoproteína de superficie de célula T CD8	P01732 (CD8a) P10966 (CD8b)
CD80	Antígeno de activación de linfocitos T CD80 (Antígeno de activación B7-1, BB1, contrarreceptor B7.1 de CTLA-4, B7)	P33681
CTLA-4	Proteína de linfocitos T citotóxicos 4 (antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4, CTLA-4) (antígeno CD CD152)	P16410
CXCR5	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 5 (receptor de linfoma de Burkitt 1, receptor derivado de monocitos 15, CD185)	P32302
DR3	Receptor de muerte 3 (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 25, WSL, Apo-3, LARD)	Q93038
GITR	Miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 18 (receptor de la familia TNFR inducible por activación, proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides, CD357)	Q9Y5U5
OMS	Miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 14 (mediador de entrada del virus del herpes A, mediador de entrada del virus del herpes A, HveA) (similar al receptor del factor de necrosis tumoral tipo 2, TR2) (antígeno CD CD270)	Q92956

39/111

ICOS	Coestimulador de célula T inducible (molécula inmunomediadora de linfocitos inducible por activación, CD278)	Q9Y6W8
LAG3	Proteína del gen de activación de linfocitos 3, LAG-3 (proteína FDC) (antígeno CD CD223)	P18627
LFA-1	Glicoproteína de adhesión leucocitaria LFA-1 de cadena alfa (integrina alfa-L, miembro de la familia A similar al antígeno CD11)	P20701
NKG2D	Proteína de membrana integral NKG2-D tipo II (miembro K de la subfamilia del receptor 1 tipo lectina de células aniquilantes, receptor D de células NK, receptor NK con activación de NKG2-D, CD314)	P26718
OX40	Miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 4 (antígeno ACT35, receptor de glicoproteína 1 activado transcripcionalmente por AX)	P43489
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1 (CD279)	Q15116
PDL2	Ligando 2 de muerte celular programada 1, ligando 2 de PD-1, PD-L2, ligando 2 de PDCD1, ligando de muerte programada 2 (butirofilina B7-DC, B7-DC) (antígeno CD CD273)	Q9BQ51
SIRPG	Proteína gamma reguladora de señal, SIRP-gamma (miembro de la familia B similar al antígeno CD172) (proteína beta-2 reguladora de señal, SIRP-b2, SIRP-beta-2) (antígeno CD CD172g)	Q9P1W8
TIGIT	Inmunorreceptor de célula T con dominios Ig e ITIM (conjunto V y proteína que contiene el dominio de inmunoglobulina 9) (conjunto V y proteína que contiene el dominio transmembrana 3)	Q495A1
Tim-1	Receptor celular del virus de la hepatitis A 1 (inmunoglobulina de célula T y proteína que contiene el dominio de mucina 1, molécula de lesión renal 1, KIM-1, receptor de mucina de inmunoglobulina de célula T 1, proteína de membrana de célula T 1, CD365)	Q96D42

40/111

TIM3	Receptor celular del virus de la hepatitis A 2, HAVcr-2 (inmunoglobulina de célula T y proteína que contiene el dominio de mucina 3, TIMD-3) (receptor de mucina de inmunoglobulina de célula T 3, TIM-3) (proteína de membrana de célula T 3)	Q8TDQ0
------	--	--------

Tabla D. Ejemplo de diana de interés.

Luego, en este aspecto, la fracción de unión se une específicamente a una diana seleccionada del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8.

En un aspecto particular, la célula inmunitaria es una célula T agotada y la diana de la fracción de unión es un factor de agotamiento expresado en la superficie de las células T agotadas. El agotamiento de la célula T es un estado de pérdida progresiva de la función, la capacidad de proliferación y el potencial citotóxico de la célula T, que eventualmente conduce a su eliminación. El agotamiento de la célula T puede desencadenarse por varios factores, como la exposición persistente al antígeno o los receptores inhibidores, incluidos PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160. Preferiblemente, dicho factor de agotamiento se selecciona del grupo que consiste en PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160.

En una modalidad preferida, la fracción de unión tiene una actividad antagonista sobre la diana.

Ya se han descrito en la técnica numerosos anticuerpos dirigidos contra PD-1, TIM3, CD244, CTLA-4, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160.

Varios anti-PD-1 ya están clínicamente aprobados y otros todavía están en desarrollo clínico. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD1 se puede seleccionar del grupo que consiste en Pembrolizumab (también conocido como Keytruda lambrolizumab, MK-3475), Nivolumab (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538), Pidilizumab (CT-011), Cemiplimab (Libtayo), Camrelizumab, AUNP12, AMP-224, AGEN-2034, BGB-A317 (Tisleizumab), PDR001 (spartalizumab), MK-3477, SCH-900475, PF-06801591, JNJ-63723283, genolimzumab (CBT-501), LZM-009, BCD-100, SHR-1201, BAT-1306, AK-103 (HX-008), MEDI-0680 (también conocido como AMP-514) MEDI0608, JS001 (ver Si-Yang Liu *et al.*, J. Hematol. Oncol.10:136 (2017)), BI-754091, CBT-501, INCSHR1210 (también conocido como SHR-1210), TSR-042 (también conocido como ANB011), GLS-010 (también conocido como WBP3055), AM-0001 (Armo), STI-1110 (ver WO 2014/194302), AGEN2034

41/111

(ver WO 2017/040790), MGA012 (ver WO 2017/19846), o IBI308 (ver WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/32825 y WO 2017/133540), anticuerpos monoclonales 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, descrito en el documento WO 2006/121168. También se conocen moléculas bifuncionales o biespecíficas dirigidas a PD-1, como RG7769 (Roche), XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca), FS118 (F-star), SL-279252 (Takeda) y XmAb23104 (Xencor).

En una modalidad particular, el anticuerpo anti-PD1 puede ser Pembrolizumab (también conocido como Keytruda lambrolizumab, MK-3475) o Nivolumab (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538).

También se conocen anticuerpos dirigidos contra TIM3 y moléculas bifuncionales o biespecíficas dirigidas contra TIM3 como Sym023, TSR-022, MBG453, LY3321367, INCAGN02390, BGTB-A425, LY3321367, RG7769 (Roche). En algunas modalidades, un anticuerpo TFM-3 es como se divulga en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional n.º WO2013006490, WO2016/161270, WO 2018/085469 o WO 2018/129553, WO 2011/155607, US 8,552,156, EP 2581113 y US 2014/ 044728.

También se conocen anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 y moléculas bifuncionales o biespecíficas dirigidas contra CTLA-4, como ipilimumab, tremelimumab, MK-1308, AGEN-1884, XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca). Anticuerpos Anti-CTLA-4 también se divulgan en los documentos WO18025178, WO19179388, WO19179391, WO19174603, WO19148444, WO19120232, WO19056281, WO19023482, WO18209701, WO18165895, WO18160536, WO18156250, WO18106862, WO18106864, WO18068182, WO18035710, WO18025178, WO17194265, WO17106372, WO17084078, WO17087588, WO16196237, WO16130898, WO16015675, WO12120125, WO09100140 y WO07008463.

También se conocen anticuerpos dirigidos contra LAG-3 y moléculas bifuncionales o biespecíficas dirigidas contra LAG-3, como BMS-986016, IMP701, MGD012 o MGD013 (anticuerpo biespecífico PD-1 y LAG-3). Los anticuerpos anti-LAG-3 también se divulgan en los documentos WO2008132601, EP2320940, WO19152574.

Los anticuerpos dirigidos contra BTLA también se conocen en la técnica como hu Mab8D5, hu Mab8A3, hu Mab21H6, hu Mab19A7 o hu Mab4C7. El anticuerpo TAB004 contra BTLA se encuentra actualmente en ensayo clínico en sujetos con neoplasias malignas avanzadas. Los anticuerpos anti-BTLA también se divulgan en los documentos WO08076560, WO10106051 (p. ej., BTLA8.2), WO11014438 (p. ej., 4C7), WO17096017 y WO17144668 (p. ej., 629.3).

Los anticuerpos dirigidos contra TIGIT también se conocen en la técnica, como BMS-986207 o AB154, BMS-986207 CPA.9.086, CHA.9.547.18, CPA.9.018, CPA.9.027,

42/111

CPA.9.049, CPA.9.057, CPA. 9.059, CPA.9.083, CPA.9.089, CPA.9.093, CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536. 6, CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5, CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.547.1, CHA.9.547.2, CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA. 9.547.8, CHA.9.547.9, CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6, CHA.9.541. 7 y CHA.9.541.8 como se divulga en el documento WO19232484. Anticuerpos Anti-TIGIT también se divulgan en los documentos WO16028656, WO16106302, WO16191643, WO17030823, WO17037707, WO17053748, WO17152088, WO18033798, WO18102536, WO18102746, WO18160704, WO18200430, WO18204363, WO19023504, WO19062832, WO19129221, WO19129261, WO19137548, WO19152574, WO19154415, WO19168382 y WO19215728

Los anticuerpos dirigidos contra CD160 también se conocen en la técnica, como CL1-R2 CNCM I-3204 como se divulga en el documento WO06015886, o otros como se divulga en los documentos WO10006071, WO10084158, WO18077926.

En un aspecto preferido, la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 y TIM3.

En otro aspecto particular, la diana es PD-1 y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de PD-1. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-PD1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-PD1 humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de PD-1. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el bloqueo del efecto inhibidor de PD-1, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de las células T, especialmente las células T agotadas, más particularmente en la señalización de TCR.

En otro aspecto particular, la diana es CTLA-4 y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de CTLA-4. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-CTLA-4 humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de CTLA-4. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el bloqueo del efecto inhibidor de CTLA-4, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de las células T, especialmente las células T agotadas, más particularmente en la señalización de TCR.

En otro aspecto particular, la diana es BTLA y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de BTLA. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-BTLA o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-BTLA humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de BTLA. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el bloqueo del efecto inhibidor de BTLA, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de la célula T, especialmente las célula T agotadas, más particularmente en la señalización TCR.

En otro aspecto particular, la diana es TIGIT y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de TIGIT. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-TIGIT o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-TIGIT humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de TIGIT. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el bloqueo del efecto inhibidor de TIGIT, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de la célula T, especialmente las célula T agotadas, más particularmente en la señalización TCR.

En otro aspecto particular, la diana es LAG-3 y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de LAG-3. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-LAG-3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-LAG-3 humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de LAG-3. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el

bloqueo del efecto inhibidor de LAG-3, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de las células T, especialmente las células T agotadas, más particularmente en la señalización de TCR.

En otro aspecto particular, la diana es TIM3 y la fracción de unión de la molécula bifuncional es un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo o un imitador de anticuerpo que es específico de TIM3. Entonces, en una modalidad particular, la fracción de unión comprendido en la molécula bifuncional según la invención es un anticuerpo anti-TIM3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo anti-TIM3 humano, humanizado o quimérico o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la fracción de unión es un antagonista de TIM3. Por lo tanto, la molécula bifuncional combina el efecto de la variante o mutante de IL-7 sobre el receptor de IL-7 y el bloqueo del efecto inhibidor de TIM3, y puede tener un efecto sinérgico sobre la activación de las células T, especialmente las células T agotadas, más particularmente en la señalización de TCR.

Dominio Fc

En un aspecto particular de la presente divulgación, la molécula bifuncional comprende una variante o mutante de IL-7, una fracción de unión y un dominio Fc. El dominio Fc puede ser parte de la fracción de unión cuando esta fracción de unión es un anticuerpo, especialmente una inmunoglobulina IgG. Sin embargo, la molécula bifuncional puede tener otras estructuras, incluyendo un dominio Fc. Por ejemplo, puede comprender un dominio Fc unido a un derivado de anticuerpo como scFv o diacuerpo.

Un enfoque para mejorar la farmacocinética de la molécula bifuncional según la invención es aumentar su persistencia en suero de semivida, lo que permite niveles circulantes más altos, una administración menos frecuente y dosis reducidas. Esta necesidad puede satisfacerse, por ejemplo, incluyendo un dominio Fc o una parte del mismo en la molécula bifuncional según la invención.

Entonces, en una modalidad, la molécula bifuncional según la invención, en particular la fracción de unión, comprende un dominio Fc o una porción del mismo.

En particular, la fracción de unión según la invención comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de inmunoglobulina de mamífero, más preferiblemente una inmunoglobulina quimérica, humana o humanizada. La fracción de unión puede incluir una región constante de una inmunoglobulina o un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. Como bien sabe un experto en la técnica, la elección de los isotipos de IgG del dominio constante de la

cadena pesada se centra en si se requieren funciones específicas y la necesidad de una semivida in vivo adecuada.

En modalidades preferidas, el dominio Fc o un fragmento del mismo comprendido en la fracción de unión comprende un dominio constante de cadena pesada derivado de una cadena pesada de inmunoglobulina humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o otras clases. En otro aspecto, el dominio constante humano se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferiblemente, la fracción de unión comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4.

En una modalidad, la fracción de unión comprende una región Fc truncada o un fragmento de la región Fc. En dicho fragmento Fc, la región constante incluye un dominio CH2 o CH3. En otra modalidad, la región constante incluye los dominios CH2 y CH3. Alternativamente, la región constante puede incluir toda o una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y/o el dominio CH3. En algunas modalidades, la región constante contiene un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una cadena pesada de IgG4 o IgG1 humana.

Preferiblemente, la región constante incluye la totalidad o una porción de una región de bisagra. La región bisagra puede derivar de una cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o otras clases. Preferiblemente, la región bisagra se deriva de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas. Más preferiblemente, la región bisagra se deriva de una cadena pesada de IgG1 o IgG4 humana o humanizada.

La región bisagra de IgG1 tiene tres cisteínas, dos de las cuales están involucradas en los enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina. Estas mismas cisteínas permiten la formación de enlaces disulfuro eficientes y consistentes entre las porciones Fc. Por lo tanto, una región bisagra preferida de la presente invención se deriva de IgG1, más preferiblemente de IgG1 humana. En algunas modalidades, la primera cisteína dentro de la región bisagra de la IgG1 humana está mutada a otro aminoácido, preferiblemente serina.

Se sabe que la región bisagra de IgG4 forma enlaces disulfuro entre cadenas de manera ineficaz. Sin embargo, una región bisagra adecuada para la presente invención se puede derivar de la región bisagra de IgG4, preferiblemente que contenga una mutación que mejore la formación correcta de enlaces disulfuro entre restos derivados de cadenas pesadas (Angal S, *et al.* (1993) Mol. Immunol., 30:105-8). Más preferiblemente, la región bisagra se deriva de una cadena pesada de IgG4 humana.

Para las moléculas bifuncionales que se dirigen a las moléculas de la superficie celular, especialmente aquellas en las células inmunitarias, se requiere la anulación de las

46/111

funciones efectoras. También se puede desear manipular regiones Fc para reducir o aumentar la función efectora del anticuerpo.

En ciertas modalidades, pueden introducirse modificaciones de aminoácidos en la región Fc para generar una variante de la región Fc. En ciertas modalidades, la variante de la región Fc posee algunas funciones efectoras, pero no todas. Dichos anticuerpos pueden ser útiles, por ejemplo, en aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero ciertas funciones efectoras son innecesarias o perjudiciales. Se conocen en la técnica numerosas sustituciones o sustituciones o deleciones con función efectora alterada.

En una modalidad, la región constante contiene una mutación que reduce la afinidad por un receptor Fc o reduce la función efectora de Fc. Por ejemplo, la región constante puede contener una mutación que elimine el sitio de glicosilación dentro de la región constante de una cadena pesada de IgG. Preferiblemente, el dominio CH2 contiene una mutación que elimina el sitio de glicosilación dentro del dominio CH2.

En un aspecto particular, el dominio Fc se modifica para aumentar la unión a FcRn, aumentando así la semivida de la molécula bifuncional. En otro aspecto o aspecto adicional, el dominio Fc se modifica para disminuir la unión a FcγR, reduciendo así ADCC o CDC, o para aumentar la unión a FcγR, aumentando así ADCC o CDC.

La alteración de los aminoácidos cerca de la confluencia de la porción Fc y la porción no Fc puede aumentar drásticamente la semivida en suero de la proteína de fusión Fc como se muestra en el documento WO 01/58957. Por consiguiente, la región de unión de una proteína o polipéptido de la presente invención puede contener alteraciones que, en relación con las secuencias naturales de una cadena pesada de inmunoglobulina y eritropoyetina, se encuentran preferiblemente dentro de aproximadamente 10 aminoácidos del punto de unión. Estos cambios de aminoácidos pueden provocar un aumento de la hidrofobicidad. En una modalidad, la región constante se deriva de una secuencia de IgG en la que se reemplaza el residuo de lisina de extremo C. Preferiblemente, la lisina de extremo C de una secuencia de IgG se reemplaza con un aminoácido que no es lisina, como alanina o leucina, para aumentar aún más la semivida en suero.

En una modalidad, la región constante puede contener CH2 y/o CH3 tiene una de las mutaciones descritas en la Tabla E a continuación, o cualquier combinación de las mismas.

FC Manipulado	Isotipo	Mutaciones	Enlace FcR/C1q	Función Efectora
---------------	---------	------------	----------------	------------------

47/111

hlgG1e1-Fc	IgG1	T250Q/M428L	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada
hlgG1e2-Fc	IgG1	M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada
hlgG1e3-Fc	IgG1	E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S	Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidos
hlgG1e4-Fc	IgG1	E333A	Unión aumentada a FcγRIIIa	ADCC y CDC aumentados
hlgG1e5-Fc	IgG1	S239D/A330L/I332E	Unión aumentada a FcγRIIIa	ADCC aumentado
hlgG1e6-Fc	IgG1	P257I/Q311	Unión aumentada a FcRn	Semivida inalterada
hlgG1e7-Fc	IgG1	K326W/E333S	Unión aumentada a C1q	CDC aumentado
hlgG1e9-Fc	IgG1	S239D/I332E/G236A	Relación FcγRIIIa/FcγRIIb aumentada	Fagocitosis de macrófagos aumentada
hlgG1e9-Fc	IgG1	N297A	Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidos
hlgG1e9-Fc	IgG1	LALA (L234A/L235A)	Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidos
hlgG1e10-Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E)	Unión reducida a FcγRI	ADCC y CDC reducidos

48/111

			Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada
hlgG1e11- Fc	IgG1	K322A	Unión reducida a C1q	CDC reducido
hlgG1e12- Fc	IgG1	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E) + K444A		ADCC y CDC reducidos Semivida aumentada Escisión de la lisina de extremo C del anticuerpo abolida
hlgG4e1- Fc	IgG4	S228P	-	Intercambio de brazo Fab reducido
hlgG4e1- Fc	IgG4	LALA (L234A/L235A)	Unión aumentada a FcRn	Semivida aumentada
hlgG4e2- Fc	IgG4	S228P+ YTE (S228P + M252Y/S254T/T256E)	- Unión aumentada a FcRn	Intercambio de brazo Fab reducido Semivida aumentada
hlgG4e3- Fc	IgG4	N297A + YTE (N298A + M252Y/S254T/T256E) + K444A		ADCC y CDC reducidos Semivida aumentada

49/111

				Escisión de la lisina de extremo C del anticuerpo abolida
--	--	--	--	--

Tabla E: Dominio Fc manipulado humano adecuado de un anticuerpo. la numeración de los residuos en la región constante de la cadena pesada está de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969); www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs)

En un aspecto particular, la molécula bifuncional, preferiblemente la fracción de unión, comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana o un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235A.

En otro aspecto, la fracción de unión comprende un dominio constante de cadena pesada de IgG4 humana o un dominio Fc de IgG4 humana, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E y K444A. Aún más preferiblemente, la molécula bifuncional, preferiblemente la fracción de unión, comprende una región Fc de IgG4 con un S228P que estabiliza la IgG4.

Todas las subclases de IgG humana llevan un residuo de lisina de extremo C de la cadena pesada del anticuerpo (K444) que son susceptibles de escindirse en circulación. Este escisión en la sangre puede comprometer o disminuir la bioactividad de la molécula bifuncional al liberar la IL-7 unida a IgG. Para resolver este problema, el aminoácido K444 en el dominio IgG se puede sustituir por una alanina para reducir la escisión proteolítica, una mutación comúnmente utilizada para anticuerpos. Entonces, en una modalidad, cuando la fracción de unión es un anticuerpo, el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido adicional que consiste en K444A.

En una modalidad, cuando la fracción de unión es un anticuerpo, el anticuerpo comprende un residuo de cisteína adicional en el dominio extremo C de la IgG para crear

50/111

un enlace disulfuro adicional y restringir potencialmente la flexibilidad de la molécula bifuncional.

En una modalidad, la fracción de unión comprende un anticuerpo. En tal modalidad, tal anticuerpo tiene un dominio constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 39 o 52 y/o un dominio constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 40, particularmente un dominio constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 39 o 52 y un dominio constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 40, particularmente como se divulga en la Tabla F a continuación.

En una modalidad preferida, la fracción de unión comprende un anticuerpo anti-hPD1 que tiene un dominio constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 52 y/o un dominio constante de cadena ligera de SEQ ID. 40, particularmente un dominio constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 52 y un dominio constante de cadena ligera de SEQ ID. 40.

Tabla F. Ejemplo de un dominio constante de cadena pesada y un dominio constante de cadena ligera adecuados para los anticuerpos humanizados según la invención.

Dominio constante de cadena pesada (IgG4m-S228P) SEQ ID NO: 39	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Dominio constante de cadena ligera (CLkappa) SEQ ID NO: 40	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Dominio constante de cadena pesada (IgG1m-N298A) SEQ ID NO: 52	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

Ligando de péptido

51/111

En un aspecto particular, la molécula bifuncional según la invención comprende además un ligando peptídico que conecta la fracción de unión y IL-7m. El ligando peptídico normalmente tiene una longitud y flexibilidad suficientes para garantizar que la IL-7m y la fracción de unión conectada con el ligando intermedio tengan suficiente libertad en el espacio para ejercer sus funciones.

En un aspecto de la divulgación, la fracción de unión se une preferiblemente a IL-7 a través de un ligando peptídico. Como se usa en la presente invención, el término "ligando" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que une IL-7m y la fracción de unión. Dicho ligando puede ser útil para evitar obstáculos estéricos. El ligando suele tener 3 a 44 residuos de aminoácidos en longitud. Preferiblemente, el ligando tiene de 3 a 30 residuos de aminoácidos. En algunas modalidades, el ligando tiene 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 residuos de aminoácidos.

La secuencia de ligando puede ser una secuencia natural o una secuencia de origen no natural. Si se usa con fines terapéuticos, el ligando es preferiblemente no inmunogénico en el sujeto al que se administra la molécula bifuncional. Un grupo útil de secuencias de ligando son los ligandos derivados de la región bisagra de anticuerpos de cadena pesada como se divulga en los documentos WO 96/34103 y WO 94/04678. Otros ejemplos son las secuencias de ligando de polialanina. Otros ejemplos preferidos de secuencias de ligando son ligandos Gly/Ser de diferente longitud que incluyen (Gly4Ser)₄, (Gly4Ser)₃, (Gly4Ser)₂, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser y (Gly3Ser2)₃, en particular (Gly4Ser)₃. Preferiblemente, el ligando se selecciona del grupo que consiste en (Gly4Ser)₄, (Gly4Ser)₃, y (Gly3Ser2)₃. Aún más preferiblemente, el ligando es (GGGGS)₃.

En una modalidad, el ligando comprendido en la molécula bifuncional se selecciona del grupo que consiste en (Gly4Ser)₄, (Gly4Ser)₃, (Gly4Ser)₂, Gly4Ser, Gly3Ser, Gly3, Gly2ser y (Gly3Ser2)₃, preferiblemente es (Gly4Ser)₃. Preferiblemente, el ligando se selecciona del grupo que consiste en (Gly4Ser)₄, (Gly4Ser)₃, y (Gly3Ser2)₃.

Molécula bifuncional

La invención proporciona particularmente una molécula bifuncional que comprende una IL-7m, una fracción de unión, que comprende opcionalmente un fragmento Fc y, opcionalmente, un ligando peptídico como descrito anteriormente.

En particular, la molécula bifuncional comprende o consiste en una fracción de unión y una IL-7m como se ha descrito anteriormente, estando la fracción de unión conjugada covalentemente (p. ej., mediante fusión genética o acoplamiento químico) con IL-7, preferiblemente por un ligando peptídico como se ha descrito anteriormente.

52/111

En particular, la conjugación de IL-7m con la fracción de unión es covalente, directa o no (es decir, mediante un ligando) y/o química, enzimática o genética. La conjugación puede llevarse a cabo mediante cualquier medio aceptable de unión conocido en la técnica teniendo en cuenta la naturaleza química de la fracción de unión. A este respecto, el acoplamiento se puede realizar así por uno o más enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno, hidrófobos o de Van der Waals, escindibles o no escindibles en medio fisiológico o dentro de las células.

En particular, la conjugación química se puede realizar a través de un grupo sulfhidrilo expuesto (Cys), la unión de un marcador de afinidad (p. ej., 6 Histidine, Flag Tag, Strep Tag, SpyCatcher, etc.) al resto de unión o a la IL7-m, o la incorporación de aminoácidos no naturales o compuestos para conjugación de química clic.

En una modalidad preferida, la conjugación se obtiene por fusión genética (es decir, por expresión en un sistema adecuado de una construcción de ácido nucleico que codifica la fracción de unión y la IL-7 como una fusión genética).

En un aspecto, la invención presenta una proteína de fusión que incluye una primera porción que comprende una cadena de inmunoglobulina (Ig), en particular un dominio Fc, y una segunda porción que comprende interleucina-7 (IL-7).

En una modalidad, la invención se refiere a una molécula bifuncional que comprende una fracción de unión fusionada con IL-7m. En particular, en dicha molécula de fusión, la fracción de unión es un anticuerpo, en el que una cadena del anticuerpo, por ejemplo, la cadena ligera o pesada, preferiblemente la cadena pesada, incluso más preferiblemente el extremo C de la cadena pesada o ligera, es unido a IL-7m, preferiblemente al extremo N de IL-7m, opcionalmente mediante un ligando peptídico.

En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula bifuncional que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y una IL-7m, en la que la IL-7m está unida al final de extremo C de la cadena pesada de dicho anticuerpo (p. ej. final de extremo C del dominio constante de la cadena pesada), preferiblemente por un ligando peptídico.

Preferiblemente, la cadena pesada, preferiblemente el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo, se fusiona genéticamente mediante un ligando (Gly₄Ser)₃ flexible al extremo N de IL-7m. En la confluencia de fusión, la fracción de lisina de extremo C de la cadena pesada del anticuerpo puede mutarse a alanina para reducir la escisión proteolítica (es decir, mutación K444A).

En una modalidad, la molécula bifuncional según la invención comprende una o más moléculas de IL-7m. En particular, la molécula bifuncional según la invención puede

53/111

comprender una, dos, tres o cuatro moléculas de IL-7m. Particularmente, la molécula bifuncional puede comprender solo una molécula de IL-7, unida a solo una cadena ligera o una cadena pesada del anticuerpo. Preferiblemente, la molécula bifuncional puede comprender solo una molécula de IL-7m, preferiblemente unida a solo una cadena pesada del anticuerpo, más preferiblemente unida al final de extremo C del dominio Fc del anticuerpo. La molécula bifuncional también puede comprender dos moléculas de IL-7m, unidas a las cadenas ligera o pesada del anticuerpo. La molécula bifuncional también puede comprender dos moléculas de IL-7m, una primera unida a la cadena ligera del anticuerpo y una segunda unida a la cadena pesada del anticuerpo.

En una modalidad, la molécula bifuncional según la invención comprende o consiste en:

(a) una fracción de unión que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, tal como descrito anteriormente, conjugada con

(b) una IL-7 que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, dicha variante IL-7 que comprende por lo menos una mutación de aminoácido que i) reduce la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R, y ii) mejora la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante de IL-7, en comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7.

En particular, la al menos una mutación de aminoácido es como se divulga anteriormente en el párrafo “mutantes de IL-7”.

Preferiblemente, la molécula bifuncional según la invención comprende o consiste en:

(a) una fracción de unión que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, tal como descrito anteriormente, conjugada con

(b) una IL-7 que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, dicha variante de IL-7 que comprende al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en: (i) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S, (ii) W142H, W142F o W142Y, (iii) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R; o cualquier combinación de los mismos.

Preferiblemente, dichas mutaciones i) reducen la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R, y ii) mejoran la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante de IL-7 en

54/111

comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7. Más preferiblemente, dichas mutaciones i) reducen la afinidad de la variante de IL-7 por el receptor de IL-7 (IL-7R) en comparación con la afinidad de wth-IL-7 por IL-7R, ii) retienen la capacidad de activar IL-7R; y iii) mejorar la farmacocinética de la molécula bifuncional que comprende la variante IL-7 en comparación con una molécula bifuncional que comprende wth-IL-7;

En un aspecto particular, la diana expresada en la superficie de las células inmunitarias es un factor de agotamiento expresado en la superficie de las células T.

Preferiblemente, la fracción de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la misma.

Preferiblemente, la fracción de unión se conjuga con IL-7m mediante fusión genética y la molécula bifuncional comprende opcionalmente al menos un ligando peptídico que conecta el extremo N de IL-7m con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo, el ligando peptídico siendo seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₂, GGGGS, GGGS, GGG, GGS y (GGGS)₃, incluso más preferiblemente es (GGGGS)₃.

Preferiblemente, la molécula bifuncional según la invención es una proteína de fusión que comprende o consiste en:

(a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se divulga anteriormente que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, preferiblemente célula T,

(b) una IL-7m que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, tal variante de IL-7 que comprende las sustituciones de aminoácidos (i) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S, (ii) W142H, W142F o W142Y, (iii) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R; o cualquier combinación de los mismos, y

(c) opcionalmente un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₂, GGGGS, GGGS, GGG, GGS y (GGGS)₃, preferiblemente (GGGGS)₃.

Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra una diana seleccionada del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, preferiblemente de PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160.

55/111

Preferiblemente, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1 o IgG4.

En un aspecto, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en K444A, T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; y K322A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235, incluso más preferiblemente un dominio IgG1 Fc que tiene la mutación N297A tal como se divulga anteriormente.

Sorprendentemente, los inventores observaron que las moléculas bifuncionales que tienen un dominio constante de cadena pesada de IgG1 tienen una actividad mejorada de las variantes de IL-7 (señal pStat5, efecto sinérgico y unión a CD127) en comparación con la misma molécula con un dominio constante de cadena pesada de IgG4. Esta mejora es específica de los mutantes de IL-7 y no se ha observado con la IL-7 de tipo salvaje. Además, el uso de un ligando largo como (GGGGS)₃ entre el anticuerpo y la IL-7 maximiza la actividad de las variantes de IL-7 (señal pStat5 y unión a CD127).

Por consiguiente, la presente invención se refiere más particularmente a una molécula bifuncional, en la que el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se divulga anteriormente que se une específicamente a un objetivo expresado en la superficie de las células inmunitarias, preferiblemente célula T, más preferiblemente la diana se selecciona del grupo compuesto por PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, preferiblemente de PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160; y el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235, incluso más preferiblemente un dominio IgG1 Fc que tiene la mutación N297A tal como se divulga anteriormente. Preferiblemente, el anticuerpo o un fragmento del mismo

56/111

se une a IL-7 o una variante del mismo mediante un ligando seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, y (GGGS)₃, más preferiblemente por (GGGGS)₃. Preferiblemente, la variante de IL-7 comprende un grupo de sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, C47S-C92S y C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, D74E, D74Q y D74N. Más preferiblemente, la variante de IL-7 comprende un grupo de sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, W142H, W142F, W142Y, D74E, D74Q y D74N. Aún más preferiblemente, la variante de IL-7 comprende un grupo de sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, W142H y D74E.

En otro aspecto, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG4, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en K444A, S228P; L234A/L235A, S228P + M252Y/S254T/T256E, incluso más preferiblemente un dominio IgG4 Fc que tiene la mutación S228P tal como se divulga anteriormente.

En un aspecto particular, la molécula bifuncional según la invención es una proteína de fusión que comprende o consiste en:

(a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se divulga anteriormente que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, preferiblemente células T, más preferiblemente la diana se selecciona del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA -4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, preferiblemente de PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160;

(b) una IL-7m que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, tal variante de IL-7 que comprende las sustituciones de aminoácidos (i) C2S-C141S y C47S-C92S, C2S-C141S y C34S-C129S, o C47S-C92S y C34S-C129S, (ii) W142H, W142F o W142Y, (iii) D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E o D74Q; iv) Q11E, Y12F, M17L, Q22E y/o K81R; o cualquier combinación de los mismos, y

(c) opcionalmente un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₂, GGGS, GGG, GGS y (GGGS)₃, preferiblemente (GGGGS)₃.

57/111

En una modalidad preferida de este aspecto, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235, incluso más preferiblemente un dominio IgG1 Fc que tiene la mutación N297A tal como se divulga anteriormente.

Alternativamente, la molécula bifuncional según la invención es una proteína de fusión que comprende o consiste en:

(a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se divulga anteriormente que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, preferiblemente célula T; más preferiblemente, la diana se selecciona del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA -1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, preferiblemente de PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160;

(b) una IL-7m que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, dicha variante de IL-7 que comprende la sustitución de aminoácidos W142H, W142F o W142Y, preferiblemente W142H; y

(c) opcionalmente un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)3, (GGGGS)4, (GGGGS)2, GGGGS, GGGS, GGG, GGS y (GGGS)3, preferiblemente (GGGGS)3.

Preferiblemente, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1 o IgG4, opcionalmente con las sustituciones detalladas anteriormente.

En una modalidad preferida de este aspecto, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en

58/111

combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235, incluso más preferiblemente un dominio IgG1 Fc que tiene la mutación N297A tal como se divulga anteriormente.

Alternativamente, la molécula bifuncional según la invención comprende o consiste en:

(a) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tal como se divulga anteriormente que se une específicamente a una diana expresada en la superficie de las células inmunitarias, preferiblemente célula T; más preferiblemente, la diana se selecciona del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA -1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, preferiblemente de PD-1, TIM3, CD244, LAG-3, BTLA, TIGIT y CD160;

(b) una IL-7m que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1, dicha variante de IL-7 que comprende la sustitución de aminoácidos D74E, D74Q o D74N, preferiblemente D74E; y

(c) opcionalmente un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₂, GGGGS, GGGGS, GGG, GGS y (GGGS)₃, preferiblemente (GGGGS)₃.

Preferiblemente, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1 o IgG4, opcionalmente con las sustituciones detalladas anteriormente.

En una modalidad preferida de este aspecto, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1, opcionalmente con una sustitución o una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en T250Q/M428L; M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F; E233P/L234V/L235A/G236A + A327G/A330S/P331S; E333A; S239D/A330L/I332E; P257I/Q311; K326W/E333S; S239D/I332E/G236A; N297A; L234A/L235A; N297A + M252Y/S254T/T256E; K322A y K444A, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en N297A opcionalmente en combinación con M252Y/S254T/T256E y L234A/L235, incluso más preferiblemente un dominio IgG1 Fc que tiene la mutación N297A tal como se divulga anteriormente.

Alternativamente, la molécula bifuncional según la invención comprende o consiste en:

(a) un anticuerpo anti- PD1 o fragmento de anticuerpo del mismo que se une específicamente a PD-1,

(b) una IL-7m que presenta por lo menos 75% de identidad con una IL-7 humana de tipo salvaje (wth-IL-7) que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos

59/111

establecida en SEQ ID NO: 1, dicha variante de IL-7 que comprende la sustitución de aminoácidos D74E, W142H y/o C2S-C141S + C47S-C92S, y

(c) opcionalmente un ligando peptídico seleccionado del grupo que consiste en (GGGGS)₃, (GGGGS)₄, (GGGGS)₂, GGGGS, GGGS, GGG, GGS y (GGGS)₃, preferiblemente (GGGGS)₃.

Preferiblemente, el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo tiene un dominio Fc de IgG1 o IgG4, opcionalmente con las sustituciones detalladas anteriormente.

Preferiblemente, el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo es genéticamente fusionada mediante un ligando flexible, preferiblemente (Gly₄Ser)₃, al extremo N de IL-7m. En la confluencia de fusión, el residuo de lisina de extremo C (es decir, K444) de la cadena pesada del anticuerpo se puede mutar a alanina para reducir la escisión proteolítica.

Opcionalmente, la molécula bifuncional puede comprender además una fracción adicional, como otras citocinas o otras fracciones de unión.

En un aspecto particular, la molécula tiene un dominio Fc dimérico, al que se une una única variante de IL-7 y un único dominio de unión a antígeno. En otro aspecto particular, la molécula tiene un dominio Fc dimérico, al que se une una única variante de IL-7 y dos dominios de unión a antígeno. El dominio de unión a antígeno se une a cualquier diana expresada específicamente en la superficie de las células inmunitarias como se divulga en la presente invención. Más específicamente, la diana se puede seleccionar del grupo que consiste en PD-1, CD28, CD80, CTLA-4, BTLA, TIGIT, CD160, CD40L, ICOS, CD27, OX40, 4-1BB, GITR, HVEM, Tim-1, LFA-1, TIM3, CD39, CD30, NKG2D, LAG3, B7-1, 2B4, DR3, CD101, CD44, SIRPG, CD28H, CD38, CXCR5, CD3, PDL2, CD4 y CD8, más concretamente del grupo formado por PD-1, CTLA-4, BTLA, TIGIT, LAG3 y TIM3. En un aspecto muy específico, el dominio de unión a antígeno se une a PD-1.

En un aspecto particular, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente a una primera cadena Fc opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc unida covalentemente a la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc complementaria, preferiblemente desprovista de dominio de unión a antígeno y/o de una variante de IL-7, formando dichas primera y segunda cadenas Fc un dominio Fc dimérico. Opcionalmente, el dominio Fc dimérico es un dominio Fc heterodimérico. Más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente al final de extremo N de la primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc

60/111

heterodimérica unida covalentemente por su final de extremo C a una variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno. Opcionalmente, dicho segundo monómero comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de variante de IL-7, preferiblemente desprovista de cualquier otra molécula. Opcionalmente, dicho segundo monómero comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria unida covalentemente a una variante de IL-7, opcionalmente en el final de extremo N del final de extremo C de la cadena Fc, opcionalmente mediante un ligando peptídico. Aún más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente mediante el final de extremo C al final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica unida covalentemente por su final de extremo C al final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno y de variante de IL-7, preferiblemente desprovista de cualquier otra molécula. Dicha molécula se ilustra, por ejemplo, como "construcción 3" en la figura 17.

En otro aspecto particular, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente mediante su final de extremo C al final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un péptido ligando, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica unida covalentemente por el final de extremo C al final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno y unida covalentemente a una IL-7 variante, opcionalmente en el final de extremo N del final de extremo C de la cadena Fc, opcionalmente mediante un ligando peptídico. Dicha molécula se ilustra, por ejemplo, como "construcción 4" en la figura 17.

Opcionalmente, la segunda cadena Fc heterodimérica complementaria está unida covalentemente por su final de extremo C al final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico.

En un aspecto adicional, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente a una primera cadena Fc, opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc opcionalmente desprovista de variante de IL-7, y un segundo monómero que comprende

61/111

una segunda cadena Fc complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno, estando dicha segunda cadena Fc unida covalentemente a la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, formando dichas primera y segunda cadenas Fc un dominio Fc dimérico. Opcionalmente, el dominio Fc dimérico es un dominio Fc heterodimérico. Más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente por el final de extremo C hasta el final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica, opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica desprovista de IL-7, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno, siendo dicha segunda cadena Fc heterodimérica covalentemente a la variante IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, preferiblemente unido por el final de extremo C a lo extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico. Aún más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente por el final de extremo C hasta el final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica, opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica desprovista de IL-7, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de dominio de unión a antígeno, siendo dicha segunda cadena Fc heterodimérica covalentemente a la variante IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, preferiblemente unido por el final de extremo C a lo extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico.

En otro aspecto particular, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente a una primera cadena Fc opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc unida covalentemente a la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc complementaria desprovista de variante de IL-7 e estando unida a un dominio de unión a antígeno, formando dichas primera y segunda cadenas Fc un dominio Fc dimérico. Dicha molécula se ilustra, por ejemplo, como "construcción 2" en la figura 17. Opcionalmente, el dominio Fc dimérico es un dominio Fc heterodimérico. Más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente al final de extremo N de la primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica unida covalentemente por su final de extremo C a una variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y

62/111

un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de variante de IL-7 y que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente al final de extremo N de la segunda cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico. Más particularmente, la molécula comprende un primer monómero que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente mediante el final de extremo C al final de extremo N de una primera cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico, estando dicha primera cadena Fc heterodimérica unida covalentemente por su final de extremo C al final de extremo N de la variante de IL-7, opcionalmente mediante un ligando peptídico, y un segundo monómero que comprende una segunda cadena Fc heterodimérica complementaria desprovista de variante de IL-7 y que comprende un dominio de unión a antígeno unido covalentemente mediante final de extremo C al final de extremo N de dicha segunda cadena Fc heterodimérica opcionalmente mediante un ligando peptídico.

El ligando, si está presente, puede seleccionarse entre los ligandos descritos en la presente invención.

Preferiblemente, dos monómeros comprenden cada uno una cadena Fc, pudiendo las cadenas Fc formar un dominio Fc dimérico.

En un aspecto, la proteína de fusión Fc dimérica es una proteína de fusión Fc homodimérica. En otro aspecto, la proteína de fusión Fc dimérica es una proteína de fusión Fc heterodimérica.

Más específicamente, el dominio Fc es un dominio Fc heterodimérico. Los dominios Fc heterodiméricos se obtienen alterando la secuencia de aminoácidos de cada monómero. Los dominios Fc heterodiméricos se basan en variantes de aminoácidos en las regiones constantes que son diferentes en cada cadena para promover la formación heterodimérica y/o permitir una fácil purificación de heterodímeros sobre los homodímeros. Hay una serie de mecanismos que pueden usarse para generar los heterodímeros de la presente invención. Además, como apreciarán los expertos en la técnica, estos mecanismos pueden combinarse para asegurar una alta heterodimerización. Por lo tanto, las variantes de aminoácidos que conducen a la producción de heterodímeros se denominan "variantes de heterodimerización". Las variantes de heterodimerización pueden incluir variantes estéricas (por ejemplo, las variantes de "perillas y agujeros" o "sesgadas" descritas a continuación y las variantes de "pares de carga" descritas a continuación), así como "variantes π ", que permiten la purificación de homodímeros lejos de los heterodímeros. El documento WO2014/145806, incorporado en la presente invención como referencia en su totalidad, divulga mecanismos útiles para la heterodimerización que incluyen "perillas y agujeros",

63/111

"dirección electrostática" o "pares de carga", variantes pi y variantes Fc adicionales generales. Ver también, Ridgway *et al.*, Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell *et al.*, J. Mol. Biol. 1997 270:26; Patente de EE.UU. No. 8.216.805, Merchant *et al.*, Nature Biotech. 16:677 (1998), todos los cuales se incorporan en la presente invención por referencia en su totalidad. Para "dirección electrostática" ver Gunasekaran *et al.*, J. Biol. Chem. 285(25): 19637 (2010), incorporado en la presente invención por referencia en su totalidad. Para las variantes de pi, ver el documento US 2012/0149876 incorporado en la presente invención como referencia en su totalidad.

Entonces, en un aspecto preferido, el dominio Fc heterodimérico comprende una primera cadena Fc y una segunda cadena Fc complementaria basada en la tecnología de "perillas y agujeros". Por ejemplo, la primera cadena Fc es una "perilla" o cadena K, lo que significa que comprende la sustitución que caracteriza a una cadena de perilla, y la segunda cadena Fc es un "agujero" o cadena H, lo que significa que comprende la sustitución que caracteriza a una cadena. Y viceversa, la primera cadena Fc es un "agujero" o cadena H, lo que significa que comprende la sustitución que caracteriza a una cadena de agujero, y la segunda cadena Fc es una "perilla" o cadena K, lo que significa que comprende la sustitución que caracteriza a una cadena de perilla. En un aspecto preferido, la primera cadena Fc es un "agujero" o cadena H y la segunda cadena Fc es una "perilla" o cadena K.

En la Figura 17 se proporcionan ejemplos de estructuras de moléculas bifuncionales según la invención.

Opcionalmente, el dominio Fc heterodimérico puede comprender una cadena Fc heterodimérica que comprende las sustituciones que se muestran en la tabla siguiente y la otra cadena Fc heterodimérica que comprende las sustituciones que se muestran en la tabla siguiente.

Tabla G (la numeración está de acuerdo con el índice de la UE)

<i>Cadena Fc que tiene las siguientes sustituciones (cadena de agujero o cadena H)</i>	<i>La cadena Fc complementaria que tiene las siguientes sustituciones (cadena de Perilla o cadena K)</i>
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/368E	C220R/E224R/P228R/K409R
S364K/E357Q	L368D/K370S
L368D/K370S	S364K
L368E/K370S	S364K
T411T/E360E/Q362E	D401K

64/111

L368D/K370S	S364K/E357L
K370S	S364K/E357Q
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C
F368D/K370S	S364K
F368D/K370S	S364K/E357F
F368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
F368E/K370S	S364K
K370S	S364K/E357Q
T366S/F368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

En un aspecto preferido, la primera cadena Fc es un "agujero" o cadena H y comprende las sustituciones T366S/L368A/Y407V/Y349C y la segunda cadena Fc es una "perilla" o cadena K y comprende las sustituciones T366W/S354C.

Opcionalmente, la cadena Fc puede comprender además sustituciones adicionales.

En un aspecto, la molécula bifuncional según la invención comprende un heterodímero de dominios Fc que comprende las modificaciones de "perilla en agujeros" como las descritas anteriormente. Preferiblemente, tales dominios Fc son dominios Fc de IgG1 o IgG4 como se divulga anteriormente, incluso más preferiblemente un dominio Fc de IgG1 que comprende la mutación N297A como se divulga anteriormente.

Por ejemplo, la primera cadena Fc es un "agujero" o cadena H y comprende las sustituciones T366S/L368A/Y407V/Y349C y N297A y la segunda cadena Fc es una "perilla" o cadena K y comprende las sustituciones T366W/S354C y N297A. Más particularmente, la segunda cadena Fc puede comprender o consiste en SEQ ID NO: 75 y/o la primera cadena Fc puede comprender o consiste en SEQ ID NO: 77.

Más específicamente, la variante de IL7 según la invención está unida a la cadena de perilla y/oa la cadena de agujero del dominio Fc heterodimérico. Así, la molécula bifuncional según la invención puede comprender i) una única variante de IL7 unida a la cadena de agujero o a la cadena de perilla del dominio Fc, o ii) dos variantes de IL7, una unida a la cadena de agujero y otra unida a la cadena de perilla del dominio Fc. Preferiblemente, la molécula bifuncional según la invención comprende una única variante de IL7 unida a la cadena de agujero del dominio Fc.

En un primer aspecto, la molécula bifuncional comprende una variante de IL7 unida al extremo C o al extremo N del dominio Fc de la cadena de perilla. Opcionalmente, dicho

65/111

dominio Fc no está unido a un dominio de unión a antígeno. Alternativamente, dicho dominio Fc está unido a un dominio de unión a antígeno.

En un segundo aspecto, la molécula bifuncional comprende una variante de IL7 unida al extremo C del dominio Fc de cadena de agujero. Preferiblemente, dicho dominio Fc está unido a un dominio de unión a antígeno en su final de extremo N.

Opcionalmente, la molécula bifuncional comprende una sola variante de IL7 unida al final de extremo C de la cadena de agujero del dominio Fc, en el que la molécula bifuncional solo comprende un único dominio de unión a antígeno unido al final de extremo N de la cadena de agujero del dominio Fc. En tal aspecto, el dominio de la cadena de perilla está desprovisto de una variante de IL7 y está o no desprovisto de un dominio de unión a antígeno.

Más particularmente, la molécula bifuncional comprende una sola variante de IL7 unida al final de extremo C de la cadena de agujero del dominio Fc preferiblemente por su extremo N terminal, opcionalmente por un ligando, en el que la molécula bifuncional solo comprende un único dominio de unión a antígeno unida en el final de extremo N de la cadena de agujero del dominio Fc, y una cadena de perilla desprovista de variante de IL7 y de dominio de unión a antígeno.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende desde el extremo N hasta el extremo C un dominio de unión a antígeno (o al menos la parte del mismo correspondiente a la cadena pesada), una cadena Fc (cadena Fc de perilla o agujero), preferiblemente la cadena de agujero del dominio Fc, y una variante de IL7. La cadena complementaria comprende una cadena Fc complementaria desprovista de variante de IL7 y dominio de unión a antígeno, preferiblemente la cadena de perilla del dominio Fc.

En otro aspecto particular, la molécula bifuncional comprende una sola variante de IL7 unida al final de extremo C de la cadena de agujero del dominio Fc por su extremo N terminal, opcionalmente por un ligando, en el que la molécula bifuncional comprende un dominio de unión a antígeno unido en el final de extremo N de la cadena de agujero del dominio Fc, y una cadena de perilla desprovista de variante de IL7 y que comprende un dominio de unión a antígeno unido al final de extremo N de la cadena de perilla por su final de extremo C.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende desde el extremo N hasta el extremo C un dominio de unión a antígeno (o al menos la parte del mismo correspondiente a la cadena pesada), una cadena Fc (cadena Fc de perilla o agujero), preferiblemente la cadena de agujero del dominio Fc, y una variante

66/111

de IL7. La cadena complementaria comprende desde el extremo N hasta el extremo C un dominio de unión a antígeno (o al menos la parte del mismo correspondiente a la cadena pesada) y una cadena Fc complementaria desprovista de la variante IL7, preferiblemente la cadena de perilla del dominio Fc.

En otro aspecto particular, la molécula bifuncional comprende una sola variante de IL7 unida al final de extremo N o extremo C de la cadena de perilla, opcionalmente por un ligando, y la molécula bifuncional comprende un dominio de unión a antígeno unido al final de extremo N de la cadena de agujero del dominio Fc por su final de extremo C, estando la cadena de agujero desprovista de variante IL7.

Opcionalmente, el dominio de unión a antígeno puede ser un dominio Fab, un Fab', un fragmento variable monocatenario (scFV) o un anticuerpo de dominio único (sdAb). El dominio de unión a antígeno comprende preferiblemente una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL). Cuando el dominio de unión a antígeno es un Fab o un Fab', la molécula comprende además un dominio constante de cadena pesada y uno de cadena ligera (es decir, CH y CL).

Cuando el dominio de unión a antígeno es un Fab o un Fab', la molécula bifuncional puede comprender además una variante de IL-7 unida al terminal C del dominio VL del dominio de unión a antígeno.

La molécula bifuncional según la invención puede comprender uno o dos dominios de unión a antígeno. Opcionalmente, un dominio de unión a antígeno se puede unir al extremo N de la cadena Fc de perilla y un dominio de unión a antígeno se puede unir al extremo N de la cadena Fc de agujero. Alternativamente, un solo dominio de unión a antígeno se une al extremo N de la cadena Fc de perilla o de la cadena Fc de agujero. Preferiblemente, la variante de IL-7 está unida a la cadena Fc unida al dominio de unión a antígeno. En un aspecto particular, el dominio de unión a antígeno se dirige a PD-1.

Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno dirigido a PD-1 se puede derivar de un anticuerpo anti-PD1 seleccionado del grupo que consiste en Pembrolizumab (también conocido como Keytruda lambrolizumab, MK-3475), Nivolumab (Opdivo, MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538), Pidilizumab (CT-011), Cemiplimab (Libtayo), Camrelizumab, AUNP12, AMP-224, AGEN-2034, BGB-A317 (Tisleizumab), PDR001 (spartalizumab), MK-3477, SCH-900475, PF-06801591, JNJ-63723283, genolimzumab (CBT-501), LZM-009, BCD-100, SHR-1201, BAT-1306, AK-103 (HX-008), MEDI-0680 (también conocido como AMP-514) MEDI0608, JS001 (ver Si-Yang Liu *et al.*, J. Hematol. Oncol.10:136 (2017)), BI-754091, CBT-501, INCSHR1210 (también conocido como SHR-1210), TSR-042 (también conocido como ANB011), GLS-010 (también conocido como WBP3055), AM-0001 (Armo),

67/111

STI-1110 (ver WO 2014/194302), AGEN2034 (ver WO 2017/040790), MGA012 (ver WO 2017/19846), o IBI308 (ver WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/32825 y WO 2017/133540), anticuerpos monoclonales 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 y 5F4, descrito en el documento WO 2006/121168. También se conocen moléculas bifuncionales o biespecíficas dirigidas a PD-1, como RG7769 (Roche), XmAb20717 (Xencor), MEDI5752 (AstraZeneca), FS118 (F-star), SL-279252 (Takeda) y XmAb23104 (Xencor). En particular, el dominio de unión a antígeno dirigido a PD-1 comprende las 6 CDR o las VH y VL de un anticuerpo anti-PD1 seleccionado en esta lista. Tal dominio de unión a antígeno puede ser particularmente un dominio Fab o svFc derivado de este anticuerpo. En un aspecto preferido, el dominio de unión a antígeno dirigido a PD-1 comprende las 6 CDR o las VH y VL del anticuerpo anti-PD1 seleccionado de Pembrolizumab (también conocido como Keytruda lambrolizumab, MK-3475) o Nivolumab (Opdivo, MDX- 1106, BMS-936558, ONO-4538) y puede ser, por ejemplo, un dominio Fab o scFc.

En un aspecto específico, el dominio de unión a antígeno dirigido a PD-1 se deriva del anticuerpo divulgado en el documento WO2020/127366, cuya divulgación se incorpora por referencia en la presente invención.

Entonces, el dominio de unión a antígeno comprende:

- (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y
- (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3,

en el que:

- la cadena pesada CDR1 (HCDR1) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), delección(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto la posición 3 de SEQ ID NO: 51;

- la cadena pesada CDR2 (HCDR2) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), delección(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 13, 14 y 16 de SEQ ID NO: 53;

- la cadena pesada CDR3 (HCDR3) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 en el que X1 es D o E y X2 se selecciona del grupo que consiste en T, H, A, Y, N, E y S, preferiblemente en el grupo que consiste en H, A, Y, N, E; opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es),

68/111

adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 2, 3, 7 y 8 de SEQ ID NO: 54;

- la cadena ligera CDR1 (LCDR1) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 en el que X es G o T, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 5, 6, 10, 11 y 16 de SEQ ID NO: 63;

- la cadena ligera CDR2 (LCDR2) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas; y

- la cadena ligera CDR3 (LCDR3) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 1, 4 y 6 de SEQ ID NO: 16.

En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende:

- (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y

- (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que:

- la cadena pesada CDR1 (HCDR1) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto la posición 3 de SEQ ID NO: 51;

- la cadena pesada CDR2 (HCDR2) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 13, 14 y 16 de SEQ ID NO: 53;

- la cadena pesada CDR3 (HCDR3) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 en el que X1 es D y X2 se selecciona del grupo que consiste en T, H, A, Y, N, E y S, preferiblemente del grupo que consiste en H, A, Y, N, E; o X1 es E y X2 se selecciona del grupo que consiste en T, H, A, Y, N, E y S, preferiblemente en el grupo que consiste en H, A, Y, N, E y S; opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 2, 3, 7 y 8 de SEQ ID NO: 54;

69/111

- la cadena ligera CDR1 (LCDR1) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 en el que X es G o T, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 5, 6, 10, 11 y 16 de SEQ ID NO: 63;

- la cadena ligera CDR2 (LCDR2) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas; y

- la cadena ligera CDR3 (LCDR3) comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 1, 4 y 6 de SEQ ID NO: 16.

En otra modalidad, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en: (i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61 o 62; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 65, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16.

En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en:

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 55; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 64, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16; o

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 56; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 64, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16, o

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 57; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 64, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16; o

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una CDR3 de SEQ ID NO: 58; y (ii) una cadena ligera que comprende

71/111

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y un CDR3 de SEQ ID NO: 61; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 65, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16; o

(i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 51, una CDR2 de SEQ ID NO: 53 y un CDR3 de SEQ ID NO: 62; y (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 65, una CDR2 de SEQ ID NO: 66 y un CDR3 de SEQ ID NO: 16.

En un aspecto, el anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno según la invención comprende regiones marco, en particular regiones marco de región variable de cadena pesada (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 y HFR4 y regiones marco de región variable de cadena ligera (LFR) LFR1, LFR2, LFR3 y LFR4.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-PD1 o el fragmento de unión a antígeno según la invención comprende regiones marco humanas o humanizadas. Un "marco aceptor humano" para los fines de la presente invención es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como es definido debajo. Un marco aceptor humano derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas modalidades, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana VL o la secuencia de marco de consenso humano. Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos que se encuentran más comúnmente en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana.

Particularmente, el anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno comprende regiones marco de región variable de cadena pesada (HFR) HFR1, HFR2, HFR3 y HFR4 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, 42, 43 y 44, respectivamente, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 27, 29 y 32 de HFR3, es decir, de SEQ ID NO: 43. Preferiblemente, el anticuerpo anti-PD1 o el fragmento de unión a antígeno comprende HFR1 de SEQ ID NO: 41, HFR2 de SEQ ID NO: 42, HFR3 de SEQ ID NO: 43 y HFR4 de SEQ ID NO: 44.

72/111

Adicional o alternativamente, el anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno comprende regiones marco de región variable (LFR) de cadena ligera LFR1, LFR2, LFR3 y LFR4 que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, 46, 47 y 48, respectivamente, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, el fragmento de unión a antígeno o anticuerpo anti-PD1 humanizado comprende LFR1 de SEQ ID NO: 45, LFR2 de SEQ ID NO: 46, LFR3 de SEQ ID NO: 47 y LFR4 de SEQ ID NO: 48.

El dominio VL y VH del anticuerpo anti hPD1 comprendido en la molécula bifuncional según la invención puede comprender cuatro regiones marco interrumpidas por tres regiones determinantes complementarias preferiblemente unidas operativamente en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (desde el extremo amino hasta el extremo carboxi).

En un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, en el que X1 es D o E y X2 se selecciona del grupo que consiste en T, H, A, Y, N, E y S preferiblemente en el grupo que consiste en H, A, Y, N, E; opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 y 112 de SEQ ID NO: 17;

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, en el que X es G o T, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 y 105 de SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones) seleccionado de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de los mismos en cualquier posición excepto las posiciones 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95,

73/111

96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 y 112 de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 respectivamente;

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición de las posiciones 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 y 105 de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25;

(b) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28.

En otro aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en cualquiera de las siguientes combinaciones de una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL):

VH (SEQ ID NO:), opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 y 112 de SEQ ID NO:	VL (SEQ ID NO:), opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), deleción(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición de las posiciones 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 y 105 de SEQ ID NO:
18	27
18	28
19	27
19	28
20	27
20	28
21	27
21	28

74/111

22	27
22	28
23	27
23	28
24	27
24	28
25	27
25	28

En un aspecto muy particular, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste esencialmente en una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24 y una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 28.

En una modalidad particular, la molécula bifuncional comprende:

(a) una cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustituciones, adiciones, eliminaciones y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición pero en las posiciones 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 y 112 de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36, respectivamente, y las sustituciones correspondientes a la cadena de agujero o de perilla, preferiblemente la cadena de agujero, más específicamente como se divulga en la Tabla G, en particular, en SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, ya sea T363S/L365A/Y4047V/Y346C o T363W/S351C, preferiblemente T363S/L365A/Y4047V/Y346C, y opcionalmente N294A en cualquiera de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36;

(b) una cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38, opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es), adición(es), eliminación(es) y cualquier combinación de las mismas en cualquier posición excepto las posiciones 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 y 105 de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

En otro aspecto, la molécula bifuncional comprende o consiste en cualquiera de las siguientes combinaciones de cadena pesada (CH) y cadena ligera (CL):

CH (SEQ ID NO:), opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es),	CL (SEQ ID NO:), opcionalmente con una, dos o tres modificaciones seleccionadas de sustitución(es),
---	---

75/111

adición(es), eliminación(es) en cualquier posición excepto las posiciones 7, 16, 17, 20, 33, 38, 43, 46, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 78, 80, 84, 85, 88, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 105, 106 y 112 de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 de SEQ ID NO:	adición(es), eliminación(es) en cualquier posición excepto en las posiciones 3, 4, 7, 14, 17, 18, 28, 29, 33, 34, 39, 42, 44, 50, 81, 88, 94, 97, 99 y 105 de SEQ ID NO:
27	37
27	38
28	37
28	38
29	37
29	38
30	37
30	38
31	37
31	38
32	37
32	38
33	37
33	38
34	37
34	38
35	37
35	38
36	37
36	38

comprendiendo la cadena pesada las sustituciones correspondientes a la cadena de agujero o de perilla, preferiblemente la cadena de agujero, más específicamente como se divulga en la Tabla G, en particular, en SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36, en particular T366S/L368A/Y407V/Y349C o T366W/S354C, preferiblemente T366S/L368A/Y407V/Y349C, y opcionalmente N297A en cualquiera de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36, definiéndose las posiciones de las sustituciones según numeración UE.

76/111

Por consiguiente, en un aspecto, la molécula bifuncional según la invención comprende o consiste en:

(a) un dominio de unión a antígeno PD-1 antihumano, que comprende (i) una cadena pesada con una primera cadena Fc, y (ii) una cadena ligera,

(b) una variante de IL-7, y

(c) una segunda cadena Fc complementaria,

en el que la variante de IL-7 está unida covalentemente, opcionalmente mediante de un ligando peptídico, preferiblemente por su final de extremo N al final de extremo C de la primera cadena Fc y/o al final de extremo N o extremo C de la segunda cadena Fc.

La variante de IL-7 puede ser cualquier variante de IL-7 como se divulga anteriormente.

La primera y la segunda cadena Fc pueden ser como se divulga anteriormente. Preferiblemente, las cadenas Fc son preferiblemente cadenas Fc de un anticuerpo IgG1 o IgG4.

El dominio de unión a antígeno PD-1 antihumano es como se divulga anteriormente.

En un aspecto, la molécula bifuncional comprende un solo dominio de unión a antígeno PD-1 antihumano (solo uno). Preferiblemente, la molécula bifuncional comprende un único dominio de unión a antígeno PD-1 antihumano seleccionado del grupo que consiste en un Fab PD-1 antihumano, un Fab' PD-1 antihumano, un PD-1 antihumano scFV y un sdAb anti-PD-1 humano.

La molécula bifuncional comprende una o dos variantes de IL-7, preferiblemente una sola variante de IL-7.

La molécula bifuncional puede comprender una cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO: 37 o 38.

La molécula bifuncional puede comprender una cadena pesada que comprende o consiste en cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36, estando opcionalmente modificada la cadena Fc para promover una heterodimerización de las cadenas Fc para formar un dominio Fc heterodimérico. Más específicamente, la cadena pesada comprende las sustituciones correspondientes a la cadena de agujero o de perilla, preferiblemente la cadena de agujero, más específicamente como se divulga en la Tabla G, particularmente T366S/L368A/Y407V/Y349C o T366W/S354C, preferiblemente T366S/L368A/Y407V /Y349C, y opcionalmente N297A en cualquiera de SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36, definiéndose las posiciones de las sustituciones según numeración UE.

En un aspecto muy particular, la molécula bifuncional comprende una cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO: 38 y una cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO: 35, la cadena Fc se modifica opcionalmente para promover una heterodimerización de las cadenas Fc para formar un dominio Fc heterodimérico.

En un aspecto muy particular, la molécula bifuncional puede comprender un primer monómero de SEQ ID NO: 75 y un segundo monómero que comprende una cadena Fc SEQ ID NO: 77, al que se une en el final de extremo N, opcionalmente por medio de un ligando, a un dominio de unión a antígeno (en particular de SEQ ID NO: 79), y en el final de extremo C, opcionalmente por un ligando, a cualquier variante de IL-7 como se divulga en la presente invención. Más particularmente, la molécula bifuncional comprende un primer monómero de SEQ ID NO: 75, un segundo monómero de SEQ ID NO: 83, y un tercer monómero de SEQ ID NO: 37, 38 o 80, preferiblemente SEQ ID NO: 38 o 80.

En otro aspecto muy particular, la molécula bifuncional puede comprender un primer monómero de SEQ ID NO: 77 y un segundo monómero que comprende una cadena Fc SEQ ID NO: 75, al que se une en el final de extremo N, opcionalmente mediante un ligando, a un dominio de unión a antígeno (en particular de SEQ ID NO: 79), y en el final de extremo C, opcionalmente por un ligando, a cualquier variante de IL-7 como se divulga en la presente invención. Más particularmente, la molécula bifuncional comprende un primer monómero de SEQ ID NO: 77, un segundo monómero de SEQ ID NO: 82, y un tercer monómero de SEQ ID NO: 37 38 u 80, preferiblemente SEQ ID NO: 38 u 80.

En otro aspecto muy particular, la molécula bifuncional puede comprender un primer monómero de SEQ ID NO: 75 al que está ligando en el final de extremo N, opcionalmente por un conector, a un dominio de unión a antígeno (en particular de SEQ ID NO: 79), y un segundo monómero que comprende una cadena Fc SEQ ID NO: 77, al que se une en el final de extremo N, opcionalmente mediante un ligando, a un dominio de unión a antígeno (en particular de SEQ ID NO: 79), y en el final de extremo C, opcionalmente por un enlazador, a cualquier variante de IL-7 como se divulga en la presente invención. Más particularmente, la molécula bifuncional comprende un primer monómero de SEQ ID NO: 81, un segundo monómero de SEQ ID NO: 83, y un tercer monómero de SEQ ID NO: 37 38 u 80, preferiblemente SEQ ID NO: 38 u 80.

En otro aspecto muy particular, la molécula bifuncional puede comprender un primer monómero de SEQ ID NO: 77 al que está ligando en el final de extremo N, opcionalmente por un conector, a un dominio de unión a antígeno (en particular de SEQ ID NO: 79), y un segundo monómero que comprende una cadena Fc SEQ ID NO: 75, al que se une en el final de extremo N, opcionalmente mediante un ligando, a un dominio de unión a antígeno

78/111

(en particular de SEQ ID NO: 79), y en el final de extremo C, opcionalmente por un enlazador, a cualquier variante de IL-7 como se divulga en la presente invención.

Preparación de moléculas bifuncionales - Moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes o mutantes de IL-7, o las proteínas de fusión y las moléculas bifuncionales que las componen, Vectores de expresión recombinantes y células huésped que comprenden tales

Para producir una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional según la invención, en particular por células de mamífero, secuencias de ácido nucleico o grupo de secuencias de ácido nucleico que codifican la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional se subclona en uno o más vectores de expresión. Dichos vectores se usan generalmente para transfectar células de mamíferos. Las técnicas generales para producir moléculas que comprenden secuencias de anticuerpos se describen en Coligan et al. (eds.), Current protocols in immunology, en las páginas 10.19.1-10.19.11 (Wiley Interscience 1992), cuyo contenido se incorpora aquí como referencia y en "Antibody engineering: a practical guide" de W. H. Freeman and Company (1992), en el que el comentario relevante a la producción de moléculas está disperso a lo largo de los textos respectivos.

Generalmente, dicho método comprende las siguientes etapas de:

- (1) transfectar o transformar células huésped apropiadas con los polinucleótidos o sus variantes que codifican la variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o molécula bifuncional recombinante de la invención o el vector que contiene los polinucleótidos;
- (2) cultivar las células huésped en un medio apropiado; y
- (3) opcionalmente, aislar o purificar la proteína del medio o de las células huésped.

La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional como se describió anteriormente, un vector, preferiblemente un vector de expresión, que comprende el ácido nucleico de la invención, una célula huésped modificada genéticamente transformada con el vector de la invención o directamente con la secuencia que codifica la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional recombinante, y un método para producir la proteína de la invención mediante técnicas recombinantes.

El ácido nucleico, el vector y las células huésped se describen más particularmente a continuación.

Secuencia de ácido nucleico

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional como se define

79/111

anteriormente o a un grupo de moléculas de ácido nucleico que codifican la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional como se define anteriormente. El ácido nucleico que codifica la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional divulgada en la presente invención puede amplificarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, como PCR. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales.

Particularmente, las moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula bifuncional como se define en la presente invención comprenden:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una fracción de unión como se divulga en la presente invención, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica IL-7m, preferiblemente una IL-7m humana.

En una realización muy particular, la molécula de ácido nucleico que codifica la fracción de unión comprende un dominio de cadena pesada variable que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 73 y/o un dominio de cadena ligera variable que tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 74.

En una realización, la segunda molécula de ácido nucleico se une operativamente al primer ácido nucleico, opcionalmente a través de un ácido nucleico que codifica un conector peptídico. Por ligado operativamente se entiende que el ácido nucleico codifica una proteína de fusión. Luego, en un aspecto particular, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que incluye la fracción de unión, opcionalmente el conector peptídico y la variante de IL-7 divulgada en la presente invención. Preferiblemente, en dicha molécula de ácido nucleico, cuando la fracción de unión comprende un dominio Fc, el N-terminal de la variante de IL-7 se fusiona con el extremo C del dominio constante de la cadena pesada, preferiblemente a través de un conector peptídico.

En una realización, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico aislada, particularmente no natural.

En un aspecto, el ácido nucleico codifica la IL-7m que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 a 15.

Vectores

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico o el grupo de moléculas de ácido nucleico como se define anteriormente.

Como se usa en la presente invención, un "vector" es una molécula de ácido nucleico que se usa como vehículo para transferir material genético a una célula. El término "vector" abarca plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. En general, los vectores

80/111

manipulados comprenden un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple y un marcador seleccionable. El vector en sí es generalmente una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN, que comprende un inserto (transgén) y una secuencia más grande que sirve como "cadena principal" del vector. Los vectores modernos pueden abarcar características adicionales además del inserto del transgén y una cadena principal: promotor, marcador genético, resistencia a los antibióticos, gen informador, secuencia de orientación, etiqueta de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (construcciones de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula diana y generalmente tienen secuencias de control.

La molécula de ácido nucleico que codifica la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión o la variante de IL-7 puede ser clonada en un vector por los expertos en la técnica y luego transformada en células huésped. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis de ADN, *in vivo* técnicas recombinantes, etc. Los métodos conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir un vector de expresión que contenga la secuencia de ácido nucleico de la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión o la variante de IL-7 descrita en la presente invención y reguladores apropiados. componentes para la transcripción/traducción.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un vector recombinante, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión o la variante de IL-7 según la presente invención. En una realización preferida, el vector de expresión comprende además un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal de secreción y, opcionalmente, al menos un gen de resistencia a fármacos para el cribado. El vector de expresión puede comprender además un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción, terminación de la transcripción y similares.

Los vectores de expresión adecuados normalmente contienen (1) elementos de ADN procariótico que codifican un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibióticos para permitir el crecimiento y la selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariótico que controlan el inicio de la transcripción, como un promotor; y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de las transcripciones, como una secuencia de poliadenilación/terminación de la transcripción.

Puede introducirse un vector de expresión en las células huésped usando una variedad de técnicas que incluyen la transfección con fosfato de calcio, la transfección

mediada por liposomas, la electroporación y similares. Preferiblemente, las células transfectadas se seleccionan y propagan en las que el vector de expresión se integra de forma estable en el genoma de la célula huésped para producir transformantes estables.

Células huésped

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que comprende un vector o una molécula de ácido nucleico o un grupo de moléculas de ácido nucleico como se define anteriormente, por ejemplo, para fines de producción de moléculas bifuncionales.

Como se usa en la presente invención, el término "célula huésped" pretende incluir cualquier célula individual o cultivo celular que pueda ser o haya sido receptor de vectores, moléculas de ácido nucleico exógenas y polinucleótidos que codifican la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión o la variante de IL-7 según la presente invención. El término "célula huésped" también pretende incluir la progenie o la progenie potencial de una sola célula. Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas o eucariotas, y también incluyen, entre otras, bacterias, células de levadura, células de hongos, células vegetales y células animales tales como células de insectos y células de mamíferos. *p.ej*, murino, rata, conejo, macaco o humano.

Las células anfitrionas adecuadas son especialmente células anfitrionas eucarióticas que proporcionan modificaciones postraduccionales adecuadas tales como glicosilación. Preferiblemente, dicha célula huésped eucariota adecuada puede ser un hongo como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*; célula de insecto como *Mythimna separar*; células vegetales como el tabaco y células de mamíferos como las células BHK, células 293, células CHO, células NSO y células COS.

Preferiblemente, la célula huésped de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células COS, células NSO y células HEK.

Luego, las células huésped expresan de forma estable o transitoria la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión y/o la variante de IL-7 según la presente invención. Dichos métodos de expresión son conocidos por el experto en la materia.

También se proporciona aquí un método de producción de la variante o mutante de IL-7, la proteína de fusión o la molécula bifuncional. El método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión y/o la variante de IL-7, como se indica anteriormente, en condiciones adecuadas para su expresión y, opcionalmente, recuperar la molécula bifuncional, la proteína de fusión, la fracción de unión y/o la variante de IL-7 de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped). Particularmente, para la producción

82/111

recombinante de una molécula bifuncional, el ácido nucleico que codifica una molécula bifuncional, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Las variantes o mutantes de IL-7, las moléculas bifuncionales de las proteínas de fusión se aíslan y/o purifican luego mediante cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de renaturalización convencional, tratamiento por precipitante de proteínas (como la precipitación de sal), centrifugación, lisis celular por ósmosis, sonicación, supercentrifugación, cromatografía de tamiz molecular o cromatografía en gel, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, HPLC, cualquier otra cromatografía líquida y la combinación de los mismos. Como se describe, por ejemplo, por Coligan, las técnicas de aislamiento de moléculas bifuncionales pueden incluir particularmente cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico. La proteína A se usa preferentemente para aislar las moléculas bifuncionales de la invención.

Composición farmacéutica y método de administración de la misma

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las variantes o mutantes de IL-7, las proteínas de fusión o las moléculas bifuncionales aquí descritas, la molécula de ácido nucleico, el grupo de moléculas de ácido nucleico, el vector y/o las células huésped. como se ha descrito anteriormente, preferiblemente como ingrediente o compuesto activo. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como vehículos, excipientes, sales, antioxidantes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no interaccionen de forma perjudicial con la molécula bifuncional de la invención, ácido nucleico, vector y/o o célula huésped de la invención y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender además un agente terapéutico adicional.

En particular, la composición farmacéutica según la invención se puede formular para cualquier vía de administración convencional, incluida la administración tópica, enteral, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares. Para facilitar la administración, la molécula bifuncional como se describe en la presente invención se puede convertir en una composición farmacéutica para la administración in vivo. Los medios para hacer una composición de este tipo se han descrito en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21^a edición (2005)).

La composición farmacéutica se puede preparar mezclando una molécula bifuncional que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes, antioxidantes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Dichos vehículos, excipientes, antioxidantes y/o estabilizadores adecuados son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Para facilitar la entrega, cualquiera de las moléculas bifuncionales o sus ácidos nucleicos codificantes pueden conjugarse con un agente chaperón. El agente acompañante puede ser una sustancia natural, como una proteína (p. ej., albúmina sérica humana, lipoproteína de baja densidad o globulina), un carbohidrato (p. ej., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), o lípido. También puede ser una molécula recombinante o sintética, como un polímero sintético, por ejemplo, un polipéptido sintético.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar los ingredientes activos (p. ej., la molécula bifuncional de la invención) sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o período de tiempo predeterminado después de la administración. La composición farmacéutica en algunos aspectos puede emplear sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada y liberación sostenida de modo que la administración de la composición se produzca antes y con tiempo suficiente para provocar la sensibilización del sitio a tratar. Se pueden usar medios conocidos en la técnica para prevenir o minimizar la liberación y absorción de la composición hasta que alcance el tejido u órgano objetivo, o para asegurar la liberación programada de la composición. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas de la composición, aumentando así la comodidad para el sujeto y el médico.

Un experto en la técnica entenderá que las formulaciones de la invención pueden ser isotónicas con la sangre humana, es decir, las formulaciones de la invención tienen esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Tales formulaciones isotónicas generalmente tienen una presión osmótica de alrededor de 250 mOSm a alrededor de 350 mOSm. La isotonicidad puede medirse, por ejemplo, con un osmómetro de presión de vapor o de congelación con hielo.

La composición farmacéutica normalmente debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización (por

ejemplo, mediante microfiltración) y/o mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico.

Sujeto, régimen y administración

La presente invención se refiere a una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional como se divulga en la presente invención; un ácido nucleico o un vector que lo codifica, una célula huésped o una composición farmacéutica, un ácido nucleico, un vector o una célula huésped, para usar como medicamento o para usar en el tratamiento de una enfermedad o para administrar en un sujeto o para uso como medicamento. También se refiere a un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica o una molécula bifuncional a un sujeto. Los ejemplos de tratamientos se describen más particularmente a continuación en la sección "Métodos y usos".

El sujeto a tratar puede ser un ser humano, en particular un ser humano en la etapa prenatal, un recién nacido, un niño, un lactante, un adolescente o un adulto, en particular un adulto de al menos 30 años, 40 años, preferentemente un adulto de al menos 50 años, aún más preferentemente un adulto de al menos 60 años, aún más preferentemente un adulto de al menos 70 años.

En un aspecto particular, el sujeto puede estar inmunodeprimido o inmunocomprometido.

Se pueden usar métodos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica de la medicina, para administrar la molécula bifuncional o la composición farmacéutica divulgada en la presente invención a un sujeto, dependiendo del tipo de enfermedades a tratar o del sitio de la enfermedad, por ejemplo, administrado por vía oral, parenteral, enteral, por inhalación en aerosol, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un reservorio implantado. Preferiblemente, la molécula bifuncional o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intratumoral, intraesternal, intratecal, intralesión, y técnicas de infusión o inyección intracraneal.

85/111

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración y la dosis de administración de la composición farmacéutica o de la molécula bifuncional según la invención pueden ser ajustadas por el experto en la materia según el tipo y gravedad de la infección, y para el paciente, en particular su edad, peso, tamaño, sexo y/o estado físico general. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar de varias formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico.

Uso en el tratamiento de una enfermedad.

Las moléculas bifuncionales, ácidos nucleicos, vectores, células huésped, composiciones y métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades y aplicaciones in vitro e in vivo. En particular, cualquiera de las variantes o mutantes de IL-7, proteínas de fusión o moléculas bifuncionales, moléculas de ácido nucleico, grupo de moléculas de ácido nucleico, vectores, células huésped o composición farmacéutica proporcionados en la presente invención pueden usarse en métodos terapéuticos y/o con fines terapéuticos.

La presente invención también se refiere a una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional, un ácido nucleico o un vector que la codifica, o una composición farmacéutica que la comprende para su uso en el tratamiento de un trastorno y/o enfermedad en un sujeto y/o para su uso como medicamento o vacuna. También se refiere a el uso de una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional como se describe en la presente invención; un ácido nucleico o un vector que lo codifica, o una composición farmacéutica que lo comprende para tratar una enfermedad y/o trastorno en un sujeto. Finalmente, se refiere a un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica o una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional al sujeto, o un ácido nucleico o un vector que codifica tal.

En una realización, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad y/o trastorno seleccionado del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa y una infección viral crónica en un sujeto que lo necesita que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la variante o mutante de IL-7, proteína de fusión o molécula bifuncional o composición farmacéutica como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de tales enfermedades se describen más particularmente a continuación.

En un aspecto, el método de tratamiento comprende: (a) identificar a un paciente que necesita tratamiento; y (b) administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de

86/111

cualquiera de las variantes o mutantes de IL-7, proteína de fusión o molécula bifuncional, ácido nucleico, vector o composición farmacéutica descritos en la presente invención.

Un sujeto que necesita un tratamiento puede ser un ser humano que tenga, esté en riesgo o se sospeche que tenga una enfermedad. Dicho paciente puede identificarse mediante un examen médico de rutina.

En otro aspecto, las moléculas bifuncionales divulgadas en la presente invención pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, in vivo, para potenciar la inmunidad, preferiblemente para tratar un trastorno y/o enfermedad. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para modificar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una molécula bifuncional, un ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica de la invención de manera que se modifica la respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria se potencia, aumenta, estimula o regula positivamente. La molécula bifuncional o la composición farmacéutica se puede utilizar para potenciar respuestas inmunitarias tales como la activación de células T en un sujeto que necesita un tratamiento. En una realización particular, la molécula bifuncional o composición farmacéutica se puede utilizar para reducir el agotamiento de las células T o para reactivar las células T agotadas.

La invención proporciona particularmente un método para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas bifuncionales, ácidos nucleicos, vectores o composiciones farmacéuticas que comprenden los descritos en la presente invención, de modo que una respuesta inmunitaria en el se realiza el tema. En una realización particular, la molécula bifuncional o composición farmacéutica se puede utilizar para reducir el agotamiento de las células T o para reactivar las células T agotadas.

Las moléculas bifuncionales según la invención se dirigen a las células inmunitarias CD127+, en particular a las células T CD127+. Dichas celdas se pueden encontrar en las siguientes áreas de particular interés: células linfoides residentes en los ganglios linfáticos (principalmente dentro de la paracorteza, con células ocasionales en los folículos), en las amígdalas (áreas interfoliculares), bazo (principalmente dentro de las vainas linfoides periarteriolares (PALS) de la pulpa blanca y algunas células dispersas en la pulpa roja), el timo (principalmente en la médula; también en la corteza), la médula ósea (distribución dispersa), en el GALT (tejido linfoide asociado al intestino, principalmente en áreas interfoliculares y lámina propia) en todo el tracto digestivo (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon ciego, recto), en el MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa) de la vesícula biliar. Por lo tanto, las moléculas bifuncionales de la invención son de particular interés para

87/111

el tratamiento de enfermedades localizadas o que involucran estas áreas, en particular cánceres.

Cáncer

En otra realización, la invención proporciona el uso de una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional o una composición farmacéutica como se divulga en la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto.

El término "cáncer", como se usa en la presente invención, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un método para tratar un cáncer, por ejemplo para inhibir el crecimiento de células tumorales, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de molécula bifuncional o composición farmacéutica según la invención. Particularmente, la presente invención se refiere al tratamiento de un sujeto usando una molécula bifuncional de manera que se inhibe el crecimiento de células cancerosas.

En un aspecto de la divulgación, el cáncer a tratar está asociado con células T agotadas.

Cualquier cáncer adecuado puede tratarse con lo que se proporciona en la presente invención, puede ser cáncer hematopoyético o cáncer sólido. Dichos cánceres incluyen carcinoma, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, glioma, mesotelioma, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de uretra cánceres inducidos por el medio ambiente y cualquier combinación de dichos cánceres. Además, la invención incluye tumores malignos refractarios o recurrentes. Preferiblemente, el cáncer a tratar o prevenir se selecciona del grupo que consiste en metastásico o no metastásico, melanoma, mesotelioma maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, linfoma de Hodgkin, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma urotelial, cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma metastásico de células de Merkel, cáncer gástrico o gastroesofágico y cáncer de cuello uterino.

En un aspecto particular, el cáncer es una malignidad hematológica o un tumor sólido. Dicho cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en neoplasmas hematolinfoides,

linfoma de células T angioinmunoblástico, síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda.

En un aspecto particular, el cáncer es un cáncer inducido por virus o asociado a inmunodeficiencia. Dicho cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en sarcoma de Kaposi (p. ej., asociado con el virus del herpes del sarcoma de Kaposi); cáncer de células escamosas de cuello uterino, anal, pene y vulva y cánceres orofaríngeos (por ejemplo, asociados con el virus del papiloma humano); Linfomas no Hodgkin (LNH) de células B, incluidos el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma de Burkitt, el linfoma plasmablastico, el linfoma primario del sistema nervioso central, el linfoma de efusión primario HHV-8, el linfoma de Hodgkin clásico y los trastornos linfoproliferativos (p. virus de Barr (EBV) y/o virus del herpes del sarcoma de Kaposi); carcinoma hepatocelular (p. ej., asociado con los virus de la hepatitis B y/o C); carcinoma de células de Merkel (p. ej., asociado con el virus del poliovirus de células de Merkel (MPV)); y cáncer asociado con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Los cánceres preferidos para el tratamiento incluyen cánceres típicamente sensibles a la inmunoterapia. Alternativamente, los cánceres preferidos para el tratamiento son los cánceres que no responden a la inmunoterapia.

Enfermedad infecciosa

La molécula bifuncional, ácido nucleico, grupo de ácido nucleico, vector, células huésped o composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto una molécula bifuncional de acuerdo con la presente invención, o una composición farmacéutica que comprende tal, preferiblemente tal que el sujeto es tratado por la enfermedad infecciosa .

Cualquier infección adecuada puede tratarse con una molécula bifuncional, un ácido nucleico, un grupo de ácidos nucleicos, un vector, células huésped o una composición farmacéutica como se proporciona en la presente invención.

Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones que se pueden tratar con los métodos de la invención incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), virus del herpes (p. ej., VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, Epstein Barr virus), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, echovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral.

89/111

Algunos ejemplos de bacterias patógenas que provocan infecciones tratables mediante métodos de la invención incluyen clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que provocan infecciones tratables mediante métodos de la invención incluyen Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, etc.), Género Mucorales (mucor, absidia, rhizophus) , Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos que provocan infecciones tratables mediante métodos de la invención incluyen Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lamblia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani , Toxoplasma gondi y Nippostrongylus brasiliensis.

Terapia combinada

La molécula bifuncional según la invención se puede combinar con algunas otras estrategias potenciales para superar los mecanismos de evasión inmune con agentes en desarrollo clínico o ya en el mercado (ver tabla 1 de Antonia *et al.* Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 20, 6258–6268, 2014). Tal combinación con la molécula bifuncional según la invención puede ser útil en particular para:

- 1- Revertir la inhibición de la inmunidad adaptativa (bloqueando las vías del punto de control de las células T);
- 2- Activar la inmunidad adaptativa (promoviendo la señalización del receptor coestimulador de células T usando moléculas agonistas, en particular anticuerpos),
- 3- Mejorar la función de las células inmunitarias innatas;
- 4- Activación del sistema inmunitario (potenciación de la función efectora de las células inmunitarias), por ejemplo mediante estrategias basadas en vacunas.

Por consiguiente, también se proporcionan en la presente invención terapias combinadas con cualquiera de las moléculas bifuncionales o composición farmacéutica que comprende tal como se describe en la presente invención y un segundo agente adecuado, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En un aspecto, la molécula bifuncional y el segundo agente pueden estar presentes en una composición farmacéutica única como se describe anteriormente. Alternativamente, los términos "terapia de combinación" o

90/111

"terapia combinada", como se usan en la presente invención, abarcan la administración de estos dos agentes (por ejemplo, una molécula bifuncional como se describe en la presente invención y un segundo agente terapéutico adecuado o adicional) de manera secuencial, es decir, en el que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes, de manera sustancialmente simultánea. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente puede verse afectada por cualquier ruta apropiada. Los agentes pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente (p. ej., una molécula bifuncional) puede administrarse por vía oral y un agente terapéutico adicional (p. ej., un agente anticancerígeno, un agente antiinfeccioso o un inmunomodulador) puede administrarse por vía intravenosa. Alternativamente, un agente de la combinación seleccionada se puede administrar por inyección intravenosa mientras que los otros agentes de la combinación se pueden administrar por vía oral.

En un aspecto, el agente terapéutico adicional puede seleccionarse en la lista no exhaustiva que comprende agentes alquilantes, inhibidores de la angiogénesis, anticuerpos, antimetabolitos, antimitóticos, antiproliferativos, antivirales, inhibidores de la aurora quinasa, promotores de la apoptosis (por ejemplo, inhibidores de la familia Bcl-2), activadores de la vía del receptor de muerte, inhibidores de la quinasa Bcr-Abl, anticuerpos BiTE (Bi-Specific T cell Engager), conjugados de anticuerpos y fármacos, modificadores de la respuesta biológica, inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de la ciclooxygenasa-2, DVD, inhibidores del receptor del homólogo del oncogén viral de la leucemia (ErbB2), inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de la proteína de choque térmico (HSP)-90, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), terapias hormonales, productos inmunológicos, inhibidores de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), antibióticos intercalados, inhibidores de quinasa, inhibidores de kinesina, inhibidores de Jak2, objetivo de inhibidores de rapamicina en mamíferos, microARN, inhibidores de la cinasa regulada por señales extracelulares activados por mitógenos, proteínas de unión multivalentes, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la poli ADP (adenosina difosfato)-ribosa polimerasa (PARP), quimioterapéuticos de platino, cinasa tipo polo (Plk) inhibidores, inhibidores de la fosfoinositida-3 quinasa (PI3K), inhibidores del proteasoma, análogos de purina, análogos de pirimidina, inhibidores de la tirosina quinasa del receptor, retinoides/deltoides, alcaloides vegetales, ácidos ribonucleicos inhibidores pequeños (siRNA), inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la ubiquitina ligasa, agentes hipometilantes, puntos de

control inhibidores, vacuna peptídica y similares, epítomos o neoepítomos de antígenos tumorales, así como combinaciones de uno o más de estos agentes.

Por ejemplo, el agente terapéutico adicional puede seleccionarse en el grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, agentes antiangiogénicos, agentes hipometilantes, vacunas contra el cáncer, epítomos o neoepítomos de antígenos tumorales, inhibidores de puntos de control mieloides, otras inmunoterapias e inhibidores de HDAC.

La presente invención también se refiere a un método para tratar una enfermedad en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula bifuncional o la composición farmacéutica descrita en la presente invención y una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente terapéutico adicional.

En el documento WO 2018/053106, páginas 36-43, se proporcionan ejemplos específicos de agentes terapéuticos adicionales o segundos.

En una realización preferida, el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, agentes de radioterapia, agentes inmunoterapéuticos, agentes de terapia celular (tales como células CAR-T), antibióticos y probióticos.

La terapia de combinación también podría basarse en la combinación de la administración de una molécula bifuncional con cirugía.

Kits

Cualquiera de las moléculas o composiciones bifuncionales descritas en la presente invención puede incluirse en un kit proporcionado por la presente invención. La presente descripción proporciona particularmente kits para usar en la mejora de las respuestas inmunitarias y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos (p. ej., cáncer y/o infección)

En el contexto de la presente invención, el término “kit” significa dos o más componentes (uno de los cuales corresponde a la molécula bifuncional, la molécula de ácido nucleico, el vector o la célula de la invención) envasados en un recipiente, recipiente o de otro modo. . Por lo tanto, un kit puede describirse como un conjunto de productos y/o utensilios suficientes para lograr un objetivo determinado, que pueden comercializarse como una sola unidad. Los kits de esta invención están en un embalaje adecuado.

En particular, un kit según la invención puede comprender:

- una variante o mutante de IL-7, una proteína de fusión o una molécula bifuncional como se define anteriormente,
- una molécula de ácido nucleico o un grupo de moléculas de ácido nucleico que codifican dicha variante o mutante de IL-7, proteína de fusión o molécula bifuncional,

92/111

- un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico o grupo de moléculas de ácido nucleico, y/o
- una célula que comprende dicho vector o molécula de ácido nucleico o grupo de moléculas de ácido nucleico.

Por lo tanto, el kit puede incluir, en un contenedor adecuado, la composición farmacéutica y/o las variantes o mutantes de IL-7, las proteínas de fusión o las moléculas bifuncionales y/o las células huésped de la presente invención y/o los vectores que codifican el ácido nucleico. moléculas de la presente invención, y/o moléculas de ácido nucleico o reactivos relacionados de la presente invención. En algunas realizaciones, se pueden proporcionar medios para tomar una muestra de un individuo y/o para analizar la muestra. Las composiciones comprendidas en el kit según la invención se pueden formular particularmente en una composición compatible con jeringas.

En algunas realizaciones, el kit incluye además un agente adicional para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa, y el agente adicional puede combinarse con la variante o mutante de IL-7, proteína de fusión o molécula bifuncional, u otros componentes del kit del presente invención o pueden proporcionarse por separado en el kit. Particularmente, el kit descrito en la presente invención puede incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales como los descritos en la "Terapia combinada" descrita anteriormente. El(los) kit(s) puede(n) adaptarse a un cáncer particular para un individuo y comprender las respectivas segundas terapias contra el cáncer para el individuo como se describe anteriormente.

Las instrucciones relacionadas con el uso de la molécula bifuncional o composición farmacéutica descritas en la presente invención generalmente incluyen información sobre la dosis, el programa de dosificación, la vía de administración para el tratamiento previsto, los medios para reconstituir la molécula bifuncional y/o los medios para diluir la molécula bifuncional del invención. Las instrucciones proporcionadas en los kits de la invención suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit en forma de folleto o manual de instrucciones).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Las mutaciones de la IL-7 fusionada con Fc modifican la unión a la señalización de IL-7R y pSTAT5 y mejoran la farmacocinética in vivo.

Para obtener mutantes de IL-7, los aminoácidos implicados en la interacción de IL7 con CD127 se sustituyeron por aminoácidos de naturaleza y propiedades similares. Se generaron varios mutantes, a saber, Q11E, Y12F, M17L, Q22E, D74E, D74Q, D74N, K81R, W142H, W142F y W142Y.

93/111

Los enlaces disulfuro de IL-7 se rompieron al reemplazar los residuos de cisteína por residuos de serina, lo que llevó a la sustitución C2S-C141S + C34S-C129S (mutante llamado « SS1 »), o C2S-C141S + C47S-C92S (mutante llamado "SS2"), o C47S-C92S + C34S-C129S (mutante llamado "SS3").

Muestras	EC50 ng/mL
IgG4 G4S3 IL7 peso	18,4
IgG4 G4S3 IL7 Q11E	18,49
IgG4 G4S3 IL7 Y12F	22,27
IGG4 G4S3 IL7 M17L	20,96
IGG4 G4S3 IL7 Q22E	17,44
IgG4 G4S3 IL7 D74E	103,94
IgG4 G4S3 IL7 K81R	20,18
IgG4 IL7 G4S3 W142F	34,86
IgG4 G4S3 IL7 W142H	136,32
IGG4 G4S3 IL7 W142Y	44,6

Tabla 1. Determinación de ED50 de la Figura 1A, B y C se refiere a la concentración requerida para alcanzar el 50% de la unión al receptor CD127. Cada tabla representa un experimento diferente y se puede comparar con el control positivo IgG4 G4S3 IL7WT.

Muestras	Ka (1/Ms)	Rd2 (1/s)	KD (M)
IgG4 Fc G4S3 IL-7 WT	5.76E+06	1.22E-04	4.14E-11
IgG4 FC G4S3 IL-7 W142H	5.02E+05	2.56E-03	5,68E-08
IgG4 FC G4S3 FC IL-7 SS2	6.11E+05	1.55E-03	7.22E-09
IgG4 FC G4S3 FC IL-7 SS3	1962	6.02E-4	1,36E-6

Tabla 2. Unión de WT frente a IL-7 mutada al receptor CD127. Evaluación de la afinidad por Biacore de IL-7 anti PD-1 fusionado por CD127. Se utilizó un modelo de reacción de dos estados para el análisis.

Muestras	KDCD132
IgG4 solo	2.50E-06
IgG4 G4S3 IL-7 peso	1.18E-07
IgG4 FC G4S3 IL-7 W142H	5.72E-07

94/111

IgG4 FC G4S3 FC IL-7	3.10E-06
SS2	

Tabla 3. Unión de WT frente a IL-7 mutada al receptor CD132. Evaluación de la afinidad por Biacore del complejo CD127 + IgG fusionado con IL-7 en CD132. Se utilizó un modelo de reacción de estado estacionario para el análisis.

Muestras	EC50 ng/mL		
IgG4 G4S3 IL7 peso	76		
IgG4 IL7 Q11E	77		
IgG4 G4S3 IL7 Y12F	66		
IGG4 G4S3 IL7 M17L	128		
IGG4 G4S3 IL7 Q22E	84		
IgG4 G4S3 IL7D74E	389		
IgG4 G4S3 IL7 K81R	79	Muestras	EC50 ng/mL
IgG4 G4S3 IL7 W142F	102	IgG4 G4S3 IL7 peso	0,52
IgG4 G4S3 IL7 W142H	861	IgG4 G4S3 IL7 SS2	2401
IgG4 G4S3 IL7 W142Y	208	IGG4 G4S3 IL7 SS3	4348

Tabla 4. La determinación de ED50 de la Figura 2A, B y C se refiere a la concentración requerida para alcanzar el 50 % de la señal de pSTAT5 en este ensayo para cada molécula IL-7 anti-PD-1. Cada tabla representa un experimento diferente con un donante diferente y cada tabla se puede comparar con el control positivo IgG4 G4S3 IL7WT.

Muestras	C max obtenido (nM)	Área bajo curva (AUC)
IgG4 G4S3 IL7 WT	13,22	121,4
IgG4 G4S3 IL7D74E	89,19	151,9
IgG4 G4S3 IL7 W142F	98	Indeterminado

95/111

IgG4 G4S3 IL7 W142H	141	248,2
IgG4 G4S3 IL7 W142Y	70	Indeterminado
IgG4 G4S3 SS2	69,9	361,6
IgG4 G4S3 SS3	140,6	466,5

Tabla 5. Cmax, área bajo la curva y determinación de la vida media de la Figura 3. La Cmax se calculó en el punto de tiempo 15 minutos después de la inyección de IL7 anti-PD-1. AUC se calculó de 0 a 144 horas después de la inyección de IL-7 anti-PD-1.

La sustitución de un aminoácido en la secuencia de IL7 no modificó su capacidad para unirse al receptor PD-1 (Figura 1 A, B y C). Sin embargo, estas mutaciones modifican su actividad biológica como lo demuestra la unión de CD127 y la señalización de pSTAT5 en ex-vivo ensayo de células T (Figura 2 y 3 y Tabla 1 y 4). La mutación D74E y W142H son las mutaciones más eficientes para disminuir tanto la unión de IL-7 a CD127 como la activación de pStat5 en linfocitos T (Figura 2A, 2B y 3A, 3B y Tabla 1 y 5). En otro experimento, se analizó el efecto de la ruptura de los límites de disulfuro (Figura 2C). A alta concentración (10 µg/ml), SS2 o SS3 pudieron activar pStat5 en linfocitos T, con una desviación de 3 log de IL-7 WT (Figura 2C y Tabla 4).

Para confirmar la capacidad de unión de esos mutantes, se realizó un ensayo Biacore para determinar la KD (constante de disociación de equilibrio entre el receptor y su antígeno, ver Tabla 2). Los mutantes SS2 y W142H tienen una menor afinidad por CD127 con una KD cercana a 7 a 57 nM. El mutante SS3 tiene la afinidad más baja por el CD127 con una KD cercana a 3 µM. La afinidad por el receptor CD132 también se evaluó como se muestra en la Tabla 3. En este experimento, se usó IgG4 sola como afinidad KD de línea base cuando CD127 se dimeriza con CD132 en ausencia de IL-7. El mutante W142H de IL-7 se une a CD132 pero con una afinidad 5 veces mayor en comparación con la IgG IL-7WT. Estos datos demuestran que la mutación W142H disminuye la unión a CD127 y redirige la unión de IL-7 hacia el receptor CD132, lo que conduce a una pérdida de activación de pSTAT5 en las células T, como se muestra en la Figura 2. Por el contrario, los inventores observaron en la condición probada que el mutante SS2 pierde la capacidad de unirse al receptor CD132, lo que sugiere que el mutante SS2 se une preferentemente al receptor CD127 sobre el receptor CD132, lo que conduce a una disminución de la actividad pSTAT5 en las células T (Figura 3).

Determinar la farmacocinética/farmacodinamia del IL-7 anti-PD-1 in vivo, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa una dosis de IgG-IL-7 (34,4nM/kg). La concentración de

96/111

fármaco en plasma se analizó mediante ELISA específico para IgG humana. La Figura 3 y la Tabla 5 muestran que las moléculas IgG4 IL-7 WT tienen una distribución rápida ya que la C_{max} (concentración máxima 15 minutos después de la inyección) obtenida es 30 veces menor que la concentración teórica. Todos los mutantes W142Y, F, H probados mostraron un mejor perfil de distribución con una C_{max} de 5 a 10 veces mayor que la IL-7 WT (Figura 3A y Tabla 5). El mutante W142H presenta la mejor C_{max}. El mutante IL-7 anti-PD-1 D74E también demostró una buena C_{max}. Los mutantes SS2 y SS3 exhiben el mejor perfil PK con una C_{max} de 7 a 13 veces mayor que la IL-7 WT y una buena curva de perfil lineal. Paralelamente se determinó el AUC (Área bajo la curva) (Tabla 5 y Figura 4D), el AUC da una idea del alcance de la exposición al fármaco y su tasa de eliminación del cuerpo. Estos datos demuestran que el AUC aumentó con los mutantes de IL-7, lo que significa que los mutantes de IL-7 tienen una mejor exposición al fármaco. Como se representa en la Figura 4D, los inventores observaron que la exposición al fármaco se refiere a la potencia de IL-7 del mutante (medida por pSTAT5 EC₅₀). En conclusión, la afinidad de IL-7 está correlacionada con la farmacocinética del producto. La disminución de la afinidad de la IL-7 por sus receptores CD127 y CD132 mejora la absorción y distribución de las moléculas bifuncionales de IL-7 in vivo.

Ejemplo 2: La adición de una cisteína en el dominio extremo C en el dominio extremo C de la IgG disminuye la flexibilidad de la molécula IL7 y mejora la farmacocinética in vivo

También se probó la adición de una cisteína en el dominio extremo C en el dominio extremo C de la IgG para crear un enlace disulfuro adicional y restringir potencialmente la flexibilidad de la molécula de IL-7. Este mutante se denominó "C-IL-7". La Figura 5 muestra que la adición de enlaces disulfuro en la estructura de IgG disminuye la actividad pSTAT5 de la IL-7 en comparación con la molécula bifuncional IL7 anti-PD-1 WT (Figura 5A) y aumenta la C_{max} (5 veces) en el ensayo de farmacocinética in vivo (Figura 5B).

Ejemplo 3: Los mutantes IL-7 anti-PD-1 contruidos con un isotipo IgG1N298A tienen una mejor unión a IL-7R, una mayor señalización de pSTAT5 y un buen perfil farmacocinético in vivo

Se probaron diferentes isotipos de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 con IgG4m (S228P) o IgG1m (N298A o N297A según el método de numeración). El isotipo IgG4 comprende la mutación S228P para evitar el intercambio de brazos Fab in vivo y el isotipo IgG1 comprende la mutación N298A que anula la unión del isotipo IgG1 a los receptores FcγR que puede reducir la unión no específica de la inmunocitocina (mutante llamado "IgG4m" o "IgG1N298A"). Entonces, IL-7 anti-PD-1 molécula bifuncional se construyó con 2 isotipos diferentes, IgG1 mutado en el isotipo N297A (llamado IgG1m) versus el isotipo

97/111

IgG4 S288P (llamado IgG4m) para determinar si la estructura del isotipo modifica la actividad biológica de la IL-7 y su perfil farmacocinético.

Las Figuras 6A y 6B demuestran que las moléculas bifuncionales IL7 anti-PD-1 construidas con el isotipo IgG4m o IgG1m tienen las mismas propiedades de unión al receptor PD-1, mostrando que el isotipo no modifica la conformación de la VH y VL y la afinidad del anticuerpo anti PD-1 para PD-1. Sin embargo, los inventores observaron que el isotipo IgG1m mejora inesperadamente la unión de IL-7 D74, SS2 y ligeramente SS3 en CD127 (Figura 7 A, B, C y D) y la activación de pSTAT5 en PBMC humanas (Figura 8 A, B y C). Este aumento en la señalización de pSTAT5 se confirmó para el mutante SS2 en otra línea de células T (células Jurkat que expresan PD-1 y CD127, ver Figura 8D), pero de manera sorprendente, el isotipo IgG1m no modifica la actividad de pSTAT5 del anti PD- 1 Molécula bifuncional de IL-7 WT, lo que sugiere que el isotipo IgG1m solo mejora la actividad de los mutantes de IL-7. Para determinar la capacidad de la molécula bifuncional que comprende un anticuerpo anti-PD1 y un mutante de IL7 para reactivar la señalización mediada por TCR, se realizó un bioensayo NFAT. Los resultados presentados en la Figura 9A muestran que la molécula bifuncional es mejor que un anti-PD1 o un anti-PD1+rIL7 (como compuestos separados) para activar la señalización mediada por TCR (NFAT), lo que demuestra un efecto sinérgico de la molécula bifuncional en las células T PD1+. A continuación, los inventores evaluaron la capacidad sinérgica de la molécula bifuncional que comprende un anticuerpo anti PD-1 y un mutante de IL-7 (con mutación D74E, W142H o SS2) construido con un isotipo IgG4m versus IgG1m (Figura 9 B, C, D). Todos los mutantes ensayados conservan un efecto sinérgico en la activación de la señalización de NFAT con un nivel de activación correlacionado con su capacidad para activar la señalización de pSTAT5, en particular para molécula bifuncional con IL-7 D74E con IgG4m.

El estudio de farmacocinética en ratones demuestra que el isotipo IgG1 no modifica la exposición al fármaco para la molécula IL7WT y SS3 y tiene un impacto mínimo en la molécula W142H (Figura 10A). En conjunto, estos datos muestran que un isotipo optimizado (IgG1m) es suficiente para mejorar la actividad biológica de los mutantes mientras se conserva una buena farmacocinética del producto in vivo. Con el isotipo IgG1m, se probaron otros mutantes de IL-7: D74N, D74Q y combinación de mutación D74E + W142H. No se observaron diferencias con el mutante IL-7 anti-PD-1 D74E en la activación de pSTAT5 (Figura 9B) y la farmacocinética (Figura 10B).

Los inventores probaron particularmente la molécula bifuncional anti-PD-1 que comprende mutantes de IL-7 D74 con diferente sustitución de aminoácidos D74E, D74Q y D74N. Estas construcciones comprenden un ligando GGGGS y un isotipo IgG1N298A.

98/111

Como se detalla en la Tabla 6, todas las construcciones tienen una eficacia similar para unirse a PD-1, pero la unión al doble PD-1/CD127 disminuye con el mutante D74Q y D74N en comparación con el mutante D74E, lo que sugiere que la sustitución Q y N atenúa ligeramente la afinidad del mutante por el receptor CD127.

Muestras	Unión PD-1 (ED50 (ng/mL)	Doble enlace PD-1/CD127 (ED50 (ng/mL)
IgG1m G4S D74E	6,4	4,9
IgG1m G4S D74Q	5,4	15,7
IgG1m G4S D74N	5,8	8,5

Tabla 6. Determinación ED50 de la unión de PD-1 y CD127 de los mutantes D74E, D74Q y D74N. ED50 (ng/mL) se refiere a la concentración requerida para alcanzar el 50% de la unión a los receptores PD-1 y CD127 medida por ELISA. La unión de PD-1 se midió mediante la inmovilización del receptor PD-1 humano y la doble unión de PD-1/CD127 se midió mediante la inmovilización de PD-1 y la revelación con el receptor CD127 como se detalla en el material y el método. Todas las construcciones ensayadas comprenden un ligando GGGGS y un isotipo IgG1 N298A.

El mutante doble D74E + W142H mostró un perfil similar en comparación con W124H IgG1 y el D74Q mostró un perfil similar en comparación con el mutante D74E. Los inventores también construyeron moléculas bifuncionales con isotipo IgG1m + mutación YTE (M252Y/S254T/T256E). Se ha descrito que esta mutación aumenta la vida media del anticuerpo al aumentar la unión a los receptores FcRn. Como se muestra en la Figura 7D, la mutación YTE no modifica la señalización de pSTAT5 de la molécula bifuncional que comprende el mutante D74 o W142H.

Ejemplo 4: La mutación K444A en el residuo de lisina extremo C no afecta la farmacocinética in vivo

Todas las subclases de IgG humana llevan un residuo de lisina extremo C de la cadena pesada del anticuerpo (K444) que se puede escindir en circulación. Este escote en la sangre puede comprometer potencialmente la bioactividad de la inmunocitocina al liberar la IL-7 ligada a IgG. Para resolver este problema, el aminoácido K444 en el dominio IgG se sustituyó por una alanina para reducir la escisión proteolítica, una mutación comúnmente utilizada para los anticuerpos. Como se muestra en la Figura 11, se obtuvo una curva similar

99/111

entre IgG WT IL-7 frente a IgG K444A IL-7, lo que sugiere que la mutación no afecta al perfil farmacocinético del fármaco.

Ejemplo 5: El ligando entre anticuerpos IgG no modifica la farmacocinética in vivo pero mejora la activación de la señalización de pSTAT5

Se probaron diferentes ligandos entre el dominio IgG Fc e IL-7m para modificar la flexibilidad. Se probaron varias condiciones (por ejemplo, sin ligando, GGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGGSGGGGS)

Para los ejemplos 1 y 2, se usó un ligando (G4S)₃ entre el dominio extremo C de la Fc y el dominio N-terminal de la IL-7 para las construcciones IgG4m-IL7 e IgG1m-IL-7, respectivamente. Este ligando permitió una alta flexibilidad y mejora de la señal de activación de IL7. Para reducir la afinidad de IL7 por CD127 y mejorar la farmacocinética, se probaron diferentes construcciones variando la longitud del ligando (sin ligando, G4S, (G4S)₂ o (G4S)₃). A modo de comparación, también se generó IgG1m o IgG4m Fc IL-7 WT con varios ligandos.

El estudio de farmacocinética demuestra que la longitud del ligando no tiene impacto en la distribución, absorción y eliminación del producto para la construcción probada: IL7 anti-PD-1 WT (Figura 12A), IL-7 anti-PD-1 D74 (Figura 12B) y IL-7 anti-PD-1 W142H (Figura 12C). Sin embargo, la longitud del ligando influye en la activación de pStat5 como se muestra en la Figura 12D. De hecho, IL7 anti-PD-1 construido con un ligando (G4S)₃ es más potente en la activación de la señalización de pSTAT5 en comparación con IL-7 anti-PD-1 construido con (G4S)₂ o G4S₃ ligando e incluso más potente en comparación con IL-7 anti-PD-1 construido sin ligando. Estos datos destacan el uso de un ligando (G4S)₃ para permitir la flexibilidad de la IL-7 sin comprometer la farmacocinética del fármaco in vivo.

Ejemplo 6: Los mutantes IL-7 anti-PD-1 permiten la unión preferencial en las células PD-1 + CD127 + sobre las células PD-1-CD127+

A continuación, los inventores evaluaron la capacidad de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 para dirigirse a las células T PD-1+. Las células Jurkat que expresaban CD127+ o coexpresaban CD127+ y PD-1+ se tiñeron con 45 nM de las siguientes moléculas bifuncionales: IL-7 anti-PD-1 WT, D74, W142H, SS2 y SS3. La unión se detectó con un anti IgG-PE (Biolegend, clon HP6017) y se analizó por citometría de flujo.

Resultados: La Figura 13 muestra que el mutante IL-7 anti-PD-1 WT y D74 se une con una eficacia similar a las células PD-1+/CD127+ frente a las células PD-1-/CD127+, mientras que el mutante IL-7 anti-PD-1 SS2, SS3 se une con 2 a una eficacia 3 veces mayor para las células PD-1+/CD127+ frente a las células PD-1-/CD127+. La molécula bifuncional

IL-7 anti-PD-1 W142H muestra un efecto intermedio y se une con una eficacia 1,4 veces mayor a las células PD-1+/CD127+.

Para confirmar el direccionamiento específico del mutante IL-7 anti-PD-1 a las células T PD-1+ en un modelo celular heterogéneo, los inventores luego mezclaron células PD-1(+) y células PD-1(-) y analizaron su unión en cada una. subconjunto de celdas. En este ensayo, las células CHO que expresan conjuntamente CD127+ humano y células PD-1+ humanas se cocultivaron en una proporción de 1:1 con CHO que expresa únicamente el receptor CD127+ humano (Figura 14 A) y luego se tiñeron con dosis crecientes de IL anti PD-1 bifuncional. -7 moléculas mutantes D74E, W142H, SS2 y SS3, anticuerpo anti PD-1 solo o isotipo irrelevante IL-7. La unión se reveló con un anti IgG-PE (Biolegend, clon HP6017) y se analizó por citometría de flujo. Se determinó la unión a EC50 (nM) para cada construcción y cada población de células PD-1(+) y PD-1(-) (Figura 14B). El control de IL-7 de isotipo irrelevante se usó como control negativo para demostrar una unión igual a las células PD-1(+) frente a las células PD-1(-). Aunque todas las moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 se unen preferentemente a las células PD-1(+) sobre las células PD-1(-) en este ensayo de cocultivo, los inventores observaron que la mutación de IL-7 mejora la unión selectiva en cis de la molécula en las células PD-1+. Como se muestra en la Figura 14B, los mutantes IL-7 anti-PD-1 W142H, SS2 y SS3 demostraron una unión fuertemente atenuada en las células PD-1(-)CD127(+) en comparación con el tipo salvaje IL-7 anti-PD-1, mientras que los mutantes de IL-7 anti-PD-1 retuvieron una unión potente (EC50~300 pM) en células PD-1(+)CD127(+) similar al tipo salvaje de IL-7 anti-PD-1. En particular, el mutante IL-7 anti-PD-1 W142H y SS3 mostró la mayor actividad selectiva con una diferencia de unión de 62 y 311 veces, respectivamente, entre las células PD-1(+) frente a las células PD-1(-).

En conjunto, estos datos muestran que la mutación IL-7 no solo permite una mejor farmacocinética del fármaco, sino que también permite la unión preferencial de IL-7 a células PD-1+, es decir direccionamiento del fármaco en la misma célula. Este aspecto tiene interés para la actividad biológica del fármaco in vivo, ya que la IL-7 anti PD-1 concentrará la IL-7 en las células T agotadas de PD-1+CD127+ en el microambiente tumoral sobre las células T vírgenes CD127+.

Ejemplo 7: La molécula bifuncional mutante IL-7 anti-PD-1 activa preferentemente IL7R en células PD-1+ y promueve sinérgicamente la proliferación de células T activadas humanas.

La activación de señalización de IL-7R (pSTAT5) también se probó en un modelo de cocultivo de células mixtas U937 PD-1(+)CD127(+) y PD-1(-)CD127(+). Las células U937

también expresaron el receptor CD132 endógeno requerido para transducir la señalización de IL-7R (Figura 15A). Los datos de señalización de pSTAT5 demuestran que los mutantes PD-1 IL-7 W142H, SS2 y SS3 tienen una actividad selectiva mucho mayor en las células PD-1(+) que en las células PD-1(-). Se observa una disminución de la actividad de 10 a 50 veces en células PD-1(-) con la molécula bifuncional anti-PD-1 que comprende mutantes anti-IL7 frente a la molécula bifuncional anti-PD-1 que comprende IL-7 de tipo salvaje (Figura 15B). Si bien se indujo una actividad de pSTAT5 muy baja en células PD-1(-), se obtuvo una actividad restaurada de la molécula bifuncional anti-PD-1 que comprende mutantes de IL-7 en células PD-1(+) en un grado similar al de la IL-7 recombinante. citocina de tipo salvaje con una actividad EC50 pSTAT5 cercana a 10 pM. En particular, el mutante W142H tiene más de 450 veces más unión/actividad en las células PD1+ en comparación con las células PD-1-.

Dado que la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 se diseñó de forma muy ventajosa y, en particular, para dirigirse a las células T agotadas de PD-1(+)CD127(+), los inventores analizaron a continuación la capacidad de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H molécula para activar preferentemente la señalización y proliferación de pSTAT5 en células T agotadas humanas primarias. Para generar células T agotadas en PD-1(+)CD127(+), las células T de sangre periférica humana se sometieron a estimulación repetida in vitro (α CD3/ α CD28) para imitar la estimulación crónica del antígeno que ocurre en el microambiente tumoral.

Para evaluar el efecto de direccionamiento de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 a las células T PD-1(+), las células T agotadas se incubaron con una alta concentración de anticuerpo competitivo anti PD-1 para bloquear la unión de los anticuerpos anti PD-1, porción PD-1 de la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1. Después de la incubación, las células T agotadas se trataron con la molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 W142H o la citocina de tipo salvaje IL-7 recombinante. A continuación, se cuantificó la activación de pSTAT5 mediante citometría de flujo. La relación de activación de pSTAT5 (EC50) entre las dos condiciones (isotipo de bloqueo de PD-1 frente a isotipo de no bloqueo) se calculó y se informó en la Figura 16A. La citocina recombinante IL-7 no dirigida se utilizó en este ensayo como control negativo, y se obtuvo una proporción de 1 que muestra una actividad similar de la IL-7 no dirigida en células T PD-1(+) y PD-1(-). Se obtuvo una actividad diferencial significativa después del tratamiento con la molécula IL-7 anti-PD-1 W142H (actividad 2 a 4 veces menor), lo que sugiere que la molécula permite una activación preferentemente en cis de la señalización de IL-7R en PD-1(+) células T primarias agotadas sobre células T agotadas PD-1(-).

Además, los inventores demostraron que la orientación en cis específica del IL-7 anti-PD-1 W142H permite una proliferación sinérgica de las células T agotadas in vitro, mientras que la combinación de dos agentes separados (anticuerpo anti-PD-1 + isotipo IL-7 W142H) indujo una estimulación de proliferación significativamente menor de células T agotadas (Figura 16B). En conjunto, estos datos confirman la ventaja de la molécula bifuncional que comprende una molécula IL-7 W142H mutada y un anticuerpo anti-PD-1 para activar selectiva y sinérgicamente las células T agotadas de PD-1(+) CD127(+).

Ejemplo 8: Las moléculas IL-7 anti-PD-1 con una citocina IL-7 W142H y uno o 2 brazos anti PD-1 demostraron una alta eficacia para promover la actividad cis en las células PD-1+ IL-7R+ y para estimular la proliferación de células T IL-7R in vivo y una capacidad sinérgica para reactivar la señalización de TCR.

A continuación, los inventores diseñaron y compararon la actividad biológica de múltiples estructuras de moléculas bifuncionales que comprenden uno o dos dominios de unión anti-PD-1 y uno o dos mutantes de IL7 W142H como se describe en la Figura 17.

La construcción 1 comprende dos dominios de unión al antígeno anti PD-1 y dos variantes de IL-7 W142H (la construcción 1 también se denomina IL-7 anti-PD-1*2 W142H*2), esta molécula corresponde a la construcción ensayada en el ejemplo 1 para 7. Esta molécula también se llama BICKI-IL-7 W142H. En los ejemplos, una molécula de control denominada BICKI-IL-7 WT corresponde a la construcción 1 pero con IL-7 de tipo salvaje.

La construcción 2 comprende dos dominios de unión al antígeno anti PD-1 y una única variante de IL-7 W142H (la construcción 2 también se denomina IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1).

La construcción 3 comprende un único dominio de unión al antígeno anti PD-1 y una única variante de IL-7 W142H (la construcción 3 también se denomina IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1). Una construcción de control llamada anti-PD-1*1 es similar a la construcción 3 pero sin la variante IL-7.

La construcción 4 comprende un único dominio de unión al antígeno anti PD-1 y dos variantes de IL-7 W142H (la construcción 4 también se denomina anti PD-1*1 IL-W142H*2).

Las construcciones 2, 3 y 4 se diseñaron con un isotipo IgG1 N298A y las secuencias de aminoácidos se mutaron en la porción Fc en para crear una perilla en CH2 y CH3 de las cadenas pesadas A y un orificio en CH2 y CH3 de las cadenas pesadas B.

Todas las construcciones de IL7 anti PD-1 poseen una alta afinidad por el receptor PD-1 como se demuestra mediante el ensayo ELISA (Figura 18A y Tabla 7). Las moléculas IL-7 anti-PD-1 que tienen 2 brazos anti PD-1 (anti-PD-1*2) tienen la misma eficacia de unión

103/111

(igual EC50) en comparación con anti PD-1*2 sin IL-7. De manera similar, las moléculas IL-7 anti-PD-1 que tienen 1 brazo anti PD-1 (IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1 y IL-7 anti-PD-1*1 W142H*2) demostraron la misma eficacia de unión en comparación con las moléculas anti PD-1*1 sin IL-7, con una EC50 igual a 86 y 111 nM para IL7 anti-PD-1 versus 238 nM para anti PD-1. Estos datos muestran que la fusión de IL-7 no parece interferir con la unión de PD-1 independientemente de la construcción ensayada.

Muestras	EC50 (nM)
anti PD-1*2	0,021
IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1	0,026
anti-PD-1*2 IL7 W142H*2	0,034
anti-PD-1*1	0,238
anti-PD-1*1 IL7 W142H*1	0,111
anti-PD-1*1 IL7 W142H*2	0,086

Tabla 7. La determinación de ED50 de la Figura 18A se refiere a la concentración requerida para alcanzar el 50% de la señal de unión a PD1 medida por ELISA para cada molécula de IL-7 anti-PD-1.

Además, el bioensayo de antagonista de PD-L1/PD-1 (Figura 18B) demuestra que las moléculas IL7 anti-PD-1 que tienen 1 o 2 brazos anti-PD-1 muestran una alta eficacia para bloquear la unión de PD-L1 al receptor PD-1. Aunque se eliminó un brazo de anti-PD-1 de las construcciones 3 y 4, toda la construcción de anti-PD-1*1 IL7 demuestra propiedades antagonistas elevadas. Con EC50 (Tabla 8) para las construcciones 3 y 4 se calculó sólo una disminución de la actividad de 2,5 veces en comparación con las construcciones IL-7 anti-PD-1*2.

Muestras	EC50 (nM)
IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1	2,168
IL-7 anti-PD-1*2 W142H*2	2,792
anti PD-1*1	5,014
IL-7 anti-PD-1*1 W142H *1	5,839
IL-7 anti-PD-1*1 W142H *2	7,235

Tabla 8. La determinación de ED50 de la Figura 18B se refiere a la concentración requerida para alcanzar el 50% de la actividad antagonista de PD1/PDL1 medida por ELISA para cada molécula de IL-7 anti-PD-1.

A continuación, los inventores evaluaron la afinidad de las diferentes construcciones por el receptor CD127 utilizando el ensayo Biacore y el ensayo ELISA. Dado que se eliminó una molécula de IL-7 de la construcción 2 y 3, se esperaba una menor capacidad de unión al receptor CD127 y una menor activación de pSTAT5 para estas moléculas en comparación con las construcciones heterodiméricas de IL-7. Sin embargo, los inventores observaron que la molécula IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1 tiene una afinidad similar por el receptor CD127 en comparación con la molécula IL-7 anti-PD-1*2 W142H*2 (BICKI-IL-7 W142H) y como menor afinidad en comparación con las moléculas bifuncionales de IL7 anti-PD-1 que comprenden la forma de tipo salvaje de IL-7 (Figura 19A y Tabla 9). Sorprendentemente, las moléculas IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1 demuestran una alta actividad de pSTAT5 similar a las moléculas bifuncionales de IL7 PD-1 que comprenden la forma de tipo salvaje de IL-7 (Figura 19B). Sobre la base de estas observaciones, podría plantearse la hipótesis de que la forma monomérica de IL-7 combinada con la mutación W142H IL-7 permite una conformación óptima de la molécula de IL-7 para promover la señalización de IL-7 en células T humanas. Incluso con una sola IL7, la molécula con la mutación W142H IL-7 tiene un efecto de activación (pSTAT5) tan bueno como una molécula con IL7 wt con dos citocinas. Este resultado es sorprendente en el contexto de una variante de IL-7 que tiene una menor afinidad por su receptor que la IL-7 de tipo salvaje.

Se sacaron conclusiones similares con moléculas IL-7 anti-PD-1 construidas con un brazo anti-PD-1 fusionado con un mutante IL-7 W142H. Se obtuvo una actividad pSTAT5 alta similar y comparable con el contra PD-1*2 IL-7WT *2, el construcciones IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1 y IL-7 anti-PD-1*1W142H*1 (Figura 19C)

	KD CD127 (M)
IL-7 anti-PD-1*2 tipo salvaje*2	8,7 E-10
IL-7 anti-PD-1*2 W142H*2	3,73 E-8
IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1	4,52 E-8

Tabla 9. Unión de IL7 anti-PD1 de tipo salvaje o mutante IL7 anti-PD1 W142H construido con 1 o 2 IL7. Se inmovilizó CD127 en el chip sensor y se añadieron moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 en dosis crecientes para medir la afinidad.

105/111

Se realizaron experimentos *in vivo* para determinar la eficacia de las diferentes construcciones de IL-7 anti-PD-1. Se inyectó una dosis de moléculas IL-7 anti-PD-1 en ratones a una concentración de molaridad equivalente (34 nM/kg). El día 4 después del tratamiento, se cuantificó la proliferación de células T CD4 y CD8 mediante citometría de flujo utilizando el marcador Ki67. La Figura 20 muestra que las moléculas IL7 anti-PD-1 que tienen un único mutante W142H (IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1 y IL-7 anti-PD-1*1 W142H *1) o que tienen una valencia única de PD-1 y dos citocinas IL7 W142H (anti PD-1*1IL7W142H*2) muestran una alta eficacia en la promoción de la proliferación de células T CD8 y, en menor medida, CD4

Para determinar la capacidad de las moléculas bifuncionales que comprenden un anticuerpo anti-PD1 (una o dos valencias) y una o dos citocinas mutantes IL7 para reactivar la señalización mediada por TCR, se realizó un bioensayo NFAT. La Figura 21A muestra que la molécula bifuncional construida con 2 brazos anti PD-1 y una citocina IL-7 mejora la activación de NFAT en comparación con el anticuerpo anti PD-1 solo, lo que demuestra que la actividad sinérgica del fármaco para fortalecer la señalización mediada por TCR se conserva con una molécula bifuncional IL-7 anti-PD-1 construida con una sola citocina IL-7. Como se ve en la figura 9A, no hubo tal sinergia cuando las células se trataron con la combinación de anti-PD1 más IL7.

Además, los inventores evaluaron a continuación la actividad de la molécula IL-7 anti-PD-1 diseñada con solo una valencia anti PD-1 (Anti PD-1*1) y demostraron que las construcciones IL-7 anti-PD-1*1W142H (IL-7 anti-PD-1*1 W142H *1 y *2) conservan su actividad sinérgica, mientras que el tratamiento de combinación PD-1*1 + isotipo IL-7 W142H*2 muestra menos eficacia para estimular la señalización de TCR (activación de NFAT) (Figura 21B).

Finalmente, la orientación en *cis* específica y la actividad en *cis* de las diferentes construcciones de IL-7 anti-PD-1 fueron analizadas en un ensayo de cocultivo . Se mezclaron células U937 PD-1 + CD127+ con células PD-1-CD127+ (relación 1:1), luego se incubaron con las diferentes construcciones en dosis crecientes. La unión y la señalización de IL-7R (pSTAT5) se cuantificó mediante citometría de flujo. Se determinó la EC50 (nM) de la unión y la activación de pSTAT5 para cada construcción y para cada población de células PD-1 + y PD-1- (Figura 22A y B). Los inventores validaron que una diversidad de moléculas mutadas IL-7 anti-PD-1 (IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1, IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1 IL-7 anti-PD-1*1 W142H*2) sustancialmente se une preferentemente a IL-7R en células PD-1+, con una gran activación de IL7R que señala pSTAT5 en células PD-1+ para estructuras diferentes y representativas.

Ejemplo 9: Las moléculas IL-7 anti-PD-1 construidas con 1 o 2 brazos de citocinas anti PD-1 y 1 o 2 IL7 W142H tienen un buen perfil farmacocinético in vivo

Se evaluó el estudio farmacocinético de las construcciones 2, 3 y 4 de moléculas bifuncionales IL-7 anti-PD-1 tal como se describe en la Figura 17. PD1 KI humanizado A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis de moléculas IL-7 anti-PD-1 (34,4 nM/kg). La concentración de fármaco en plasma se analizó mediante ELISA específico para IgG humana (Figura 23). También se calculó el área bajo la curva (ver Tabla 10) y representa la exposición total al fármaco a lo largo del tiempo para cada construcción. Las construcciones IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1, IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1 y IL-7 anti-PD-1*1W142H*2 demostraron un perfil PK muy mejorado en comparación con el IL-7 anti-PD-1*2WT*1. Se observó una Cmax de 2,8 a 19 veces mayor en comparación con el IL-7 anti-PD-1*1WT*2. Es importante destacar que se mantiene una alta concentración de fármaco (11-15 nM) que corresponde a un valor PK in vivo satisfactorio durante al menos 96 horas con el IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1 IL-7 anti-PD-1*1 W142H* 2 moléculas mientras que sólo se detectan 2 nM de molécula IL-7 anti-PD-1*2WT*2 en el plasma. Una concentración de fármaco residual con el IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1 es 2,5 veces mayor que la concentración de IL-7 anti-PD-1*2WT*2. La exposición al fármaco en plasma a menudo se refiere a la eficacia in vivo. Aquí, los inventores demuestran que todas las moléculas IL-7 anti-PD-1 W142H construidas con un brazo de anti PD-1 permiten una exposición al fármaco a largo plazo después de una sola inyección, lo que sugiere que estas construcciones inducirán una mayor actividad biológica in vivo.

	ABC	Cmax (nM)
IL-7 anti-PD-1*1W142H*1	1597	42,4
IL-7 anti-PD-1*1W142H*2	2024	248,6

Tabla 10. Determinación del área bajo la curva de la Figura 23. El AUC se calculó de 0 a 96 horas después de la inyección intraperitoneal de una dosis de IL-7 anti-PD-1 (34 nM/kg).

También se menciona que, incluso si ciertas moléculas PD-1*2 IL7WT*2 con IL7 de tipo salvaje pueden tener también una buena farmacocinética (en particular para inyección intravenosa) en comparación con IL7 W142H, las moléculas con IL7 W142H tienen otros mejores propiedades: una mejor proliferación de células T (CD4, CD8 como se muestra en la figura 20) y una orientación específica mucho mejor de las células PD1+ frente a las células PD1- (10 a 50 veces como se explica para la figura 15B).

En conjunto, se han obtenido una pluralidad de construcciones de moléculas bifuncionales con IL7 mutada (en particular, W142H) con una farmacocinética muy

107/111

satisfactoria para un uso farmacéutico eficaz (preferiblemente al menos 10 nM después de 24 horas) y con además:

- un efecto ventajoso sustancial sobre la proliferación de LT,
- un alto rendimiento en términos de activación LT a través de IL7R señalando pSTAT5 en células PD-1+, gracias al sorprendente efecto sinérgico sobre las células T entre la parte anti PD1 de la molécula bifuncional y la parte IL7 de la molécula bifuncional,
- una alta orientación específica de las células T PD1+ frente a las células T PD1- (mucho mayor que las moléculas bifuncionales que no tienen IL7 mutado), y la activación en cis de la señalización de IL-7R en las células T primarias agotadas en PD-1+ sobre las células T PD-1- , lo cual es una ventaja sustancial para el tratamiento de tumores; y
- un eficaz efecto antagonista de PD-1/PD-L1 interacción (no sólo una unión a PD1).

MATERIAL Y MÉTODO

PD1 de unión a ELISA

Para el ensayo ELISA de actividad, hPD1 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10377-H08H) se inmovilizó sobre plástico a 0,5 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,2) y se añadió anticuerpo purificado para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió anti-IgG humana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; EUA; referencia 709-035-149) y se reveló mediante métodos convencionales.

Medición de afinidad usando el método Biacore

Evaluación de afinidad por Biacore de IgG fusionada a IL-7 en sus cadenas pesadas para CD127 (A) o CD132 (B). Se inmovilizó CD127 (Sinobiological, 10975-H03H-50) en un biochip CM5 a 20 µg/ml y se añadió la proteína indicada en concentraciones seriadas (0,35; 1,1; 3,3; 10; 30 nM). La afinidad se analizó utilizando dos modelos de reacción de estado. Para evaluar la afinidad de IL-7 por CD132, se inmovilizó CD127 en el biochip CM5 y cada construcción de IL-7 se inyectó a una concentración de 30 nM. El receptor CD132 (Sinobiological 10555-H08B) se añadió a diferentes concentraciones, p. 31,25, 52,5, 125, 250, 500 nm. Se utilizó un modelo de afinidad de estado estacionario para el análisis.

ELISA de unión a CD127

La unión a CD127 se evaluó mediante un método ELISA tipo sándwich. Las proteínas recombinantes dirigidas por el esqueleto del anticuerpo se inmovilizaron, luego se incubaron los anticuerpos fusionados con IL-7 preincubados con proteína recombinante CD127 (marcada con histidina, Sino ref 10975-H08H). La revelación se realizó con una mezcla de un anticuerpo anti-histidina (MBL #D291-6) acoplado a biotina y estreptavidina

108/111

acoplado a peroxidasa (JI 016-030-084). La colorimetría se determinó a 450 nm usando sustrato TMB.

Análisis pSTAT5

Las PBMC aisladas de sangre periférica de voluntarios humanos sanos se incubaron durante 15 minutos con IL-7 recombinante o IL-7 fusionada con IgG. Para determinar la actividad cis, las células U937 transducidas con CD127+ PD-1+ se mezclaron con células U937 transducidas solo con CD127+. Las células se mezclaron en una proporción de 1:1 y se trataron con IL-7 recombinante o los diferentes IgG fusionada con IL-7 construcciones descritas en la presente invención. Cada subconjunto de células se marcó con colorante de proliferación celular (CPDe450 o CPDe670) antes del cocultivo. A continuación, las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anti-pSTAT5 marcado con AF647 (clon 47/Stat5 (pY694)). Los datos se obtuvieron calculando MFI pSTAT5 en la población de células T CD3+.

Análisis de unión celular

Para determinar la unión en cis de la IgG fusionada con moléculas de IL-7, se mezclaron células U937 o CHO transducidas con CD127+ PD-1+ con CHO o U937 transducidas solo con CD127+. Las células se mezclaron en una proporción de 1:1 y se trataron con las diferentes construcciones de IgG fusionadas con IL-7 descritas en la presente invención. Cada subconjunto de células se marcó con colorante de proliferación celular (CPDe450 o CPDe670) antes del cocultivo. Después de 20 minutos de incubación, se detectó la unión de las diferentes moléculas IgG fusionadas con un anticuerpo anti IgG-PE (Biolegend, clon HP6017) y se analizó por citometría de flujo.

Farmacocinética de la IgG fusionó IL-7 in vivo

Para analizar la farmacocinética de la inmunocitocina IL-7, se inyectó intraorbital o intraperitonealmente una sola dosis de la molécula a ratones Balb/cRJ (hembra 6-9 semanas) o ratones C57bl/6JrJ (hembra 6-9 semanas). La concentración de fármaco en el plasma se determinó mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-cadena ligera humana inmovilizado (clon NaM76-5F3) diluido en suero que contenía IgG fusionado con IL67. La detección se realizó con una IgG antihumana de burro marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; EUA; referencia 709-035-149) y se reveló mediante métodos convencionales.

Ensayo de activación de células T mediante bioensayo basado en células Promega

La capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para restaurar la activación de las células T se probó utilizando el kit Promega PD-1/PD-L1 (Referencia J1250). Se utilizan dos líneas celulares (1) células T efectoras (Jurkat que expresa de forma estable PD-1, luciferasa

109/111

inducida por NFAT) y (2) células diana activadoras (células CHO K1 que expresan de forma estable PDL1 y proteína de superficie diseñada para estimular los TCR afines en un antígeno- manera independiente. Cuando las células se cocultivan, la interacción PD-L1/PD-1 inhibe la activación mediada por TCR, bloqueando así la activación de NFAT y la actividad de luciferasa. La adición de un anticuerpo anti-PD-1 bloquea la señal inhibidora mediada por PD-1 que conduce a la activación de NFAT y la síntesis de luciferasa y la emisión de la señal de bioluminiscencia. El experimento se realizó según las recomendaciones del fabricante. Se analizaron diluciones en serie del anticuerpo PD-1. Cuatro horas después del cocultivo de células diana PD-L1+, células efectoras PD-1 y anticuerpos anti PD-1, BioGlo™ Se añadió sustrato de luciferina a los pocillos y las placas se leyeron usando Tecan™ luminómetro

Proliferación in vivo

Se inyectó por vía intraperitoneal una dosis única de moléculas bifuncionales (34 nM/kg) a ratones C57bl6JrJ (hembra de 6-9 semanas) que tenían un tumor MC38 subcutáneo. El día 4 después del tratamiento, se recogieron sangre y un tumor MC38 y las células T se tiñeron con un anticuerpo anti CD3, anti CD8, anti CD4 y un anticuerpo anti ki67 para cuantificar la proliferación mediante citometría de flujo.

Anticuerpos y moléculas bifuncionales

Los siguientes anticuerpos y moléculas bifuncionales se han utilizado en los diferentes experimentos divulgados en la presente invención: Pembrolizumabe (Keytrudra, Merck), Nivolumabe (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), y las moléculas bifuncionales como se describen en la presente invención que comprenden un anticuerpo humanizado anti-PD1 que comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28 o un anticuerpo quimérico anti-PD1 que comprende una cadena pesada como se define en SEQ ID NO: 71 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 72.

La construcción 1 comprende dos dominios de unión al antígeno anti PD-1 y dos variantes de IL-7 W142H (la construcción 1 también se denomina IL-7 anti-PD-1*2 W142H*2). Esta molécula corresponde a la construcción ensayada en los ejemplos 1 a 7. Esta molécula también se llama BICKI-IL-7 W142H. En particular, la construcción 1 comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28 o un anticuerpo quimérico anti-PD1 que comprende una cadena pesada como se define en SEQ ID NO: 71 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 72. La molécula también comprende la variante IL7 tal como se describe en SEQ ID No: 5.

110/111

En los ejemplos, una molécula de control denominada BICKI-IL-7 WT corresponde a la construcción 1 pero con IL-7 de tipo salvaje. Comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28. La molécula tiene un isotipo IgG4 S288P.

Otra molécula de control es anti-PD1*2 (sin IL7). La molécula comprende una cadena pesada como se define en SEQ ID NO: 79 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 80.

La construcción 2 comprende dos dominios de unión al antígeno anti PD-1 y una única variante de IL-7 W142H (la construcción 2 también se denomina IL-7 anti-PD-1*2 W142H*1). En particular, la construcción 2 comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28. La molécula comprende particularmente una cadena pesada unida a IL-7 W142H como se define en SEQ ID NO: 83 (agujero) o una cadena pesada como se define es SEQ ID NO: 81 (perilla) y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 80.

La construcción 3 comprende un único dominio de unión al antígeno anti PD-1 y una única variante de IL-7 W142H (la construcción 3 también se denomina IL-7 anti-PD-1*1 W142H*1). En particular, la construcción 3 comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28. La molécula comprende una cadena pesada unida a IL-7 W142H como se define en SEQ ID NO: 83, una región Fc como se define en SEQ ID NO: 75 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 80.

Una construcción de control llamada anti-PD-1*1 es similar a la construcción 3 pero sin la variante IL-7. Tal control comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28. La molécula comprende una cadena pesada como se define en SEQ ID NO: 81, una región Fc como se define en SEQ ID NO: 75 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 80.

La construcción 4 comprende un único dominio de unión al antígeno anti PD-1 y dos variantes de IL-7 W142H (la construcción 4 también se denomina anti PD-1*1 IL-W142H*2). En particular, la construcción 4 comprende una cadena pesada variable (VH) como se define en SEQ ID NO: 24 y una cadena ligera variable (VL) como se define en SEQ ID NO: 28. La molécula comprende una cadena pesada unida a IL-7 W142H como se define en SEQ ID NO: 83, una región Fc unida a IL-7 W142H como se define en SEQ ID NO: 76 y una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 80.

Las construcciones 2, 3 y 4 se diseñaron con un isotipo IgG1 N298A y las secuencias de aminoácidos se mutaron en la porción Fc en para crear una perilla en CH2 y CH3 de las

111/111

cadenas pesadas A y un orificio en CH2 y CH3 de las cadenas pesadas B. Todas las construcciones IL-7 anti-PD-1 y anti PD-1*1 comprenden un isotipo mutado IgG1N298A excepto la construcción anti PD-1*2 (que carece de IL-7) y IL-7 anti-PD-1*2wt*2 (BICKI- IL-7 WT) que se construyeron con un isotipo IgG4 S288P.