

NUEVOS INMUNOCONJUGADOS DE INTERLEUCINA-7

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a polipéptidos de interleucina-7 mutante, inmunoconjugados, particularmente inmunoconjugados que comprenden un polipéptido de interleucina-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1. Además, la invención se refiere a moléculas de polinucleótidos que codifican el polipéptido de interleucina-7 mutante o inmunoconjugados, y vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de polinucleótidos. La invención se refiere además a métodos para producir el polipéptido de interleucina-7 mutante o inmunoconjugados, composiciones farmacéuticas que los comprenden, y usos de estos.

Antecedentes

La interleucina-7 (IL-7) es una citocina segregada principalmente por las células estromales en los tejidos linfoides. Está implicada en la maduración de los linfocitos, por ejemplo, al estimular la diferenciación de células madre hematopoyéticas multipotentes en linfoblastos. IL-7 es esencial para el desarrollo y la supervivencia de los linfocitos T, así como para la homeostasis de los linfocitos T maduros. La falta de IL-7 produce la detención del ciclo de las células inmunitarias inmaduras (Lin J. *et al.* (2017), *Anticancer Res.* 37(3):963-967).

IL-7 se une al receptor de IL-7, que está compuesto por la cadena alfa de IL-7R (IL-7R α , CD127), así como por la cadena gamma común (γ c, CD132, IL-2R γ), que es común a las interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Rochman Y. *et al.*, (2009) *Nat Rev Immunol.* 9:480–490). Mientras que γ c se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas, IL-7R α se expresa casi exclusivamente en las células del linaje linfóide (Mazzucchelli R. y Durum S.K. (2007) *Nat Rev Immunol.* 7(2):144-54). IL-7R α se encuentra en la superficie de los linfocitos T, en todo su rango de diferenciación de indiferenciados a efectores, mientras que su expresión se reduce en linfocitos T diferenciados terminalmente y está prácticamente ausente en la superficie de linfocitos T reguladores. Los niveles de expresión de mRNA y proteínas de IL-7R α están regulados negativamente por IL-2, por lo tanto, IL-7R α está regulada negativamente en los linfocitos T recientemente activados que expresan la IL-2R α (CD25) (Xue H.H, *et al.* 2002, *PNAS.* 99(21):13759-64), este mecanismo asegura la expansión clonal rápida mediada por IL-2 de los linfocitos T cebados recientemente, mientras que la función de IL-7 es mantener

por igual todos los clones de linfocitos T. IL-7R α también se describió recientemente en una población de precursores caracterizada recientemente de linfocitos T CD8, linfocitos T CD8 similares a células madre TCF-1⁺ PD-1⁺, que se encuentra en el tumor de pacientes con cáncer que responden al bloqueo de PD-1 (Hudson *et al.*, 2019, Immunity 51, 1043-1058; Im *et al.*, PNAS, vol. 117, N.º 8, 4292-4299; Siddiqui *et al.*, 2019, Immunity 50, 195–211; Held *et al.*, Sci., Transl. Med. 11; eaay6863 (2019); Vodnala y Restifo, Nature, vol. 576, 19/26 diciembre de 2019). Si bien no existen al día de hoy descripciones científicas del efecto de IL-7 sobre los linfocitos T CD8 similares a células madre, se podría usar IL-7 para expandir esta población de linfocitos T reactivos al tumor para aumentar la cantidad de pacientes que responden a los inhibidores del punto de control.

IL-7, IL-7R α y γ_c forman un complejo ternario, que señaliza a través de la vía JAK/STAT (Janus quinasa (JAK)-transductor de señal y activador de la transcripción (STAT)), así como de la cascada de señalización PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), proteína serina/treonina quinasa, proteína quinasa B (AKT)), lo que conduce al desarrollo y la homeostasis de los linfocitos B y T (Niu N. y Qin X. (2013) Cell Mol Immunol. 10(3):187-189, Jacobs *et al.*, (2010), J Immunol. 184(7): 3461–3469).

IL-7 es una proteína monomérica de haz de 4 hélices de 25 kDa. La longitud de hélice varía de 13 a 22 aminoácidos, que es similar a la longitud de hélice de otras interleucinas de unión a cadena gamma común (γ_c , CD132, IL-2R γ). Sin embargo, IL-7 muestra un motivo de giro único en la hélice A, que demostró estabilizar la interacción IL-7/IL-7R α (McElroy, C.A. *et al.*, (2009) Structure 17: 54-65). Mientras que la hélice A interactúa con ambas cadenas del receptor IL-7R α y γ_c , la hélice C interactúa predominantemente con IL-7R α y la hélice D con la cadena γ_c (alineaciones de secuencias y estructurales en función de PDB:3DI2 y PDB:2ERJ). En WO 2020/127377 A1 y WO 2020/236655 A1, se describieron variantes de IL-7 con modificaciones para reducir la heterogeneidad y/o la afinidad/potencia reducida.

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1 o CD279) es un miembro inhibidor de la familia CD28 de receptores, que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 es un receptor de superficie celular y se expresa en células mieloides, linfocitos T y linfocitos B activados (Okazaki *et al.* (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391-779-82; Bennett *et al.* (2003) J Immunol 170:711-8). La estructura de PD-1 es una proteína transmembrana tipo 1 monomérica, que consiste en un dominio extracelular similar a variable de inmunoglobulina y un dominio citoplásmico que contiene un motivo

inhibidor a base de tirosina inmunorreceptor (ITIM) y un motivo de cambio a base de tirosina inmunorreceptor (ITSM). Se identificaron dos ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, que se demostró que regulan de manera descendente la activación de linfocitos T tras la unión a PD-1 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia CD28. Un ligando para PD-1, PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med* 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 da como resultado una disminución en los linfocitos que infiltran tumores y una disminución en la proliferación mediada por el receptor de linfocitos T, lo que permite la evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). La supresión inmunitaria puede revertirse mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2 (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

Los anticuerpos que se unen a PD-1 se describen, por ejemplo, en WO 2017/055443 A1.

Síntesis

La presente invención proporciona un enfoque novedoso para dirigir una forma mutante de IL-7 con propiedades ventajosas para la inmunoterapia directamente a células efectoras inmunitarias, tales como linfocitos T citotóxicos, en lugar de a células tumorales, mediante la conjugación del polipéptido de IL-7 mutante con un anticuerpo que se une a PD-1. Esto da como resultado la administración en cis del mutante de IL-7 a subconjuntos inmunitarios que expresan PD-1, especialmente linfocitos T reactivos al tumor, por ejemplo, subconjuntos de linfocitos T CD8⁺ PD1⁺ TCF⁺ y su progenie.

Los mutantes de IL-7 utilizados en la presente invención se diseñaron para superar los problemas asociados con la inmunoterapia con citocinas, en particular la toxicidad causada por la inducción de VLS, tolerancia del tumor causada por la inducción de AICD e inmunosupresión causada por la activación de linfocitos T_{reg}. Además de eludir el escape de tumores al direccionamiento a tumores como se mencionó anteriormente, el direccionamiento del mutante IL-7 a células efectoras inmunitarias puede aumentar adicionalmente la activación preferencial de los CTL específicos de tumor con respecto a

los linfocitos T_{reg} inmunosupresores debido a menores niveles de expresión de PD-1 e IL-7R α en los T_{reg} que en los CTL. Al usar un anticuerpo que se une a PD-1, la supresión de la actividad de linfocitos T inducida por la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 puede revertirse adicionalmente, lo que mejora aún más la respuesta inmunitaria.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante, que comprende una sustitución de aminoácido en la posición de G85 de IL-7 humana de acuerdo con SEQ ID NO: 28, en donde la sustitución de aminoácido reduce la afinidad de unión del polipéptido de interleucina-7 mutante a IL-7R α en comparación con un polipéptido de interleucina-7 que comprende SEQ ID NO: 28. En un aspecto, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende la sustitución de aminoácido G85E. En un aspecto adicional, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende además una sustitución de aminoácido en la posición K81. En otro aspecto, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende la sustitución de aminoácido K81E.

En un aspecto, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende además al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en T93 y S118, en donde dicha sustitución de aminoácido reduce la glucosilación del polipéptido de interleucina-7 mutante en comparación con un polipéptido de interleucina-7 mutante sin dichas sustituciones de aminoácidos. En un aspecto, dichas sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo de T93A y S118A. En otro aspecto, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende las sustituciones de aminoácidos T93A y S118A.

En aun un aspecto adicional, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende (i) un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente y (ii) un anticuerpo. En un aspecto, dicho anticuerpo se une a PD-1. En un aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en las posiciones 71-73 de acuerdo con la numeración de Kabat, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

En un aspecto, el inmunoconjugado comprende no más de un polipéptido de IL-7 mutante.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende un dominio Fc que se compone de una primera y una segunda subunidad. En un aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de clase IgG, particularmente una subclase IgG1. En un aspecto adicional, el dominio Fc es un dominio Fc humano.

En un aspecto, el anticuerpo es una inmunoglobulina de clase IgG, particularmente una subclase IgG1.

En un aspecto, el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. En un aspecto, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, lo que genera de este modo una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede situar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, lo que genera de este modo una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la que se puede situar la protuberancia

dentro del dominio CH3 de la primera subunidad. En otro aspecto, en la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W) y, en la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V) y, opcionalmente, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En aun un aspecto adicional, en la primera subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza con un residuo de cisteína (E356C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, adicionalmente, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, el polipéptido de IL-7 mutante se fusiona en su aminoácido del extremo amino al aminoácido del extremo carboxi de una de las subunidades del dominio Fc, particularmente la primera subunidad del dominio Fc, opcionalmente a través de un ligador peptídico. En un aspecto, el ligador peptídico tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto, el dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc, particularmente un receptor Fcγ, y/o la función efectora, particularmente la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En un aspecto, dicha una o más sustituciones de aminoácidos están en una o más posiciones seleccionadas del grupo de L234, L235 y P329 (numeración del índice EU de Kabat). En un aspecto, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat).

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 34, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38,

SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.

En un aspecto, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un polipéptido de IL-7 mutante y una molécula de inmunoglobulina IgG1, unidos mediante una secuencia ligadora. En otro aspecto, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un polipéptido de IL-7 mutante y una molécula de inmunoglobulina IgG1, unidos mediante un ligador de SEQ ID NO: 19.

En un aspecto, se proporcionan uno o más polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de IL-7 mutante de la invención o un inmunoconjugado de la invención. En un aspecto, la invención proporciona uno o más vectores, particularmente vectores de expresión, que comprenden los polinucleótidos de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una célula huésped que comprende los polinucleótidos o los vectores de la invención.

En un aspecto, se proporciona un método para producir un polipéptido de IL-7 mutante o un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, que comprende (a) cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido de IL-7 mutante o los inmunoconjugados de la invención, y opcionalmente (b) recuperar el polipéptido de IL-7 mutante o el inmunoconjugado. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-7 mutante o un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, producido mediante dicho método.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-7 mutante o un inmunoconjugado de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-7 mutante o un inmunoconjugado de la invención para su uso como un medicamento.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de IL-7 mutante o un inmunoconjugado de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, dicha enfermedad es cáncer.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso del polipéptido de IL-7 mutante o el inmunoconjugado de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, dicha enfermedad es cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el polipéptido de IL-7 mutante o el inmunoconjugado de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, dicha enfermedad es cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona un método para estimular el sistema inmunitario de un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende el polipéptido de IL-7 mutante o el inmunoconjugado de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de un formato de inmunoconjugado IgG-IL-7, que comprende dos dominios Fab (dominio variable, dominio constante), un dominio Fc heterodimérico y un polipéptido de IL-7 mutante fusionado con un extremo C del dominio Fc.

Figura 2: Perfiles de N-glucosilación de variantes de PD1-IL7 (N-glucanos liberados de las porciones de Fc e IL7). Los rastros en línea continua son de variantes expresadas en células CHO transformadas de manera estable, y los rastros en línea punteada se expresan en células CHO transfectadas de manera transitoria. PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada expresada en células CHO transformadas de manera estable (A) y transfectadas de manera transitoria (D). PD1-IL7 VAR21 parcialmente glucosilada expresada en células CHO transformadas de manera estable (B) y transfectadas de manera transitoria (E). PD1-IL7 VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada expresada en células CHO transformadas de manera estable (C) y transfectadas de manera transitoria (F).

Figuras 3A y 3B: Señalización de IL-7R (STAT5-P) en linfocitos T CD4 con prebloqueo de PD1 y PD1⁺ cocultivados tras el tratamiento con PD1-IL7 VAR21 completa y parcialmente glucosilada (Figura 3A) y PD1-IL7 VAR18/VAR21 completa y parcialmente glucosilada (Figura 3B). Señalización de IL-7R (STAT5-P) representada como la frecuencia de linfocitos T de STAT5-P en linfocitos T CD4 PD1⁺ (línea continua) y con prebloqueo de PD-1 (línea punteada) cocultivados después de 12 min tras la exposición. Para la PD1-IL7 VAR21 completa y parcialmente glucosilada, se agruparon los datos de dos lotes de producción diferentes con diferentes sistemas de expresión (expresión transitoria y estable) (media $\pm$ SEM).

Figura 4: Exposición como la concentración de fármaco detectable en el suero de ratones humanizados después de 4 y 72 horas tras la primera y segunda administración subcutánea de PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada, PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada y PD1-IL7wt.

Figuras 5A y 5B: Señalización de IL-7R (STAT5-P) en linfocitos T CD4 con prebloqueo de PD1 y PD1⁺ cocultivados tras el tratamiento con las moléculas de referencia 5-8 (Figura 5A) y las moléculas de referencia 9-10 (Figura 5B) en comparación con PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada. Señalización de IL-7R (STAT5-P) representada como la frecuencia de STAT5-P en linfocitos T CD4 PD1⁺ (línea continua) y con prebloqueo de PD-1 (línea punteada) después de 12 minutos tras la exposición. Media $\pm$ SEM de 3 donantes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la presente, se usan términos como generalmente se usan en la técnica, a menos que se definan de otro modo a continuación.

Como se usa en la presente, la expresión "mutación de aminoácido" pretende abarcar sustituciones, eliminaciones, inserciones y modificaciones de aminoácidos. Se puede realizar cualquier combinación de sustitución, eliminación, inserción y modificación para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas, por ejemplo, unión reducida a IL-7R α y/o IL-2R γ . Las eliminaciones e inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen eliminaciones e inserciones de aminoácidos en el extremo amino y/o carboxi. Un ejemplo de una eliminación de extremo es la eliminación del residuo en la posición 1 de la IL-7 humana de longitud completa. Las mutaciones de aminoácidos preferidas son sustituciones de aminoácidos. Con el fin de alterar, por ejemplo, las características de unión de un polipéptido de IL-7, se prefieren particularmente las sustituciones de aminoácidos no conservadoras, es decir, el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas diferentes. Las sustituciones de aminoácidos preferidas incluyen reemplazar un aminoácido hidrófobo por uno hidrófilo. Las sustituciones de aminoácidos incluyen el reemplazo mediante aminoácidos no naturales o derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos estándar (por ejemplo, 4-hidroxiprolina, 3-metilhistidina, ornitina, homoserina, 5-hidroxilisina). Las mutaciones de aminoácidos se pueden generar mediante métodos genéticos o químicos conocidos en la técnica. Los métodos genéticos

pueden incluir mutagénesis dirigida al sitio, PCR, síntesis génica y similares. Se contempla que también pueden ser útiles métodos para alterar el grupo de cadena lateral de un aminoácido mediante métodos que no sean la modificación por ingeniería genética, tal como modificación química.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un receptor) y su componente de unión (por ejemplo, un ligando). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, una porción de unión al antígeno y un antígeno, o un receptor y su ligando). La afinidad de una molécula X con su componente Y puede representarse en general mediante la constante de disociación (K_D), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on} , respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre y cuando la relación de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad puede medirse mediante métodos bien establecidos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en la presente. Un método particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmones superficiales (SPR).

IL-7 se une al receptor de IL-7, que está compuesto por la cadena alfa de IL-7R (también denominada IL-7R α , IL7R α , IL-7a, IL7Ra o CD127 en la presente), así como por la cadena gamma común (también denominada γ_c , CD132, IL-2R γ , IL-2Rg, IL2Rg, IL-2R γ o IL2R γ), que es común a las interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Rochman Y. *et al.*, (2009) Nat Rev Immunol. 9:480–490).

La afinidad del polipéptido de IL-7 mutante o de tipo silvestre con el receptor de IL-7 puede determinarse de acuerdo con el método establecido en WO 2012/107417 mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), con instrumentos estándar, tales como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y subunidades del receptor, tales como las que pueden obtenerse mediante expresión recombinante (ver, por ejemplo, Shanafelt *et al.*, Nature Biotechnol 18, 1197-1202 (2000)). Alternativamente, la afinidad de unión de los mutantes de IL-7 con el receptor de IL-7 puede evaluarse mediante el uso de líneas celulares que se sabe que expresan una u otra de tales formas del receptor. Se describen más adelante formas de realización ilustrativas y de ejemplo específicas para medir la afinidad de unión.

El término "interleucina-7" o "IL7", como se usa en la presente, se refiere a

cualquier IL7 nativa de cualquier fuente vertebrada, incluso mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique de otro modo. El término abarca IL-7 sin procesar, así como cualquier forma de IL-7 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de IL-7, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Se muestra la secuencia de aminoácidos de una IL-7 humana de ejemplo en SEQ ID NO: 28.

La expresión "mutante de IL-7" o "polipéptido de IL-7 mutante", como se usa en la presente, pretende abarcar cualesquier formas mutantes de diversas formas de la molécula de IL-7, incluso IL-7 de longitud completa, formas truncadas de IL-7 y formas donde IL-7 está ligada a otra molécula, tal como mediante fusión o conjugación química. "Longitud completa", cuando se usa en referencia a IL-7, significa la molécula de IL-7 de longitud natural y madura. Por ejemplo, IL-7 humana de longitud completa se refiere a una molécula que tiene una secuencia de polipéptidos de acuerdo con SEQ ID NO: 28. Las diversas formas de mutantes de IL-7 se caracterizan por tener al menos una mutación de aminoácido que afecte la interacción de IL-7 con IL7Ralfa y/o IL2Rgamma. Esta mutación puede implicar la sustitución, eliminación, truncamiento o modificación del residuo de aminoácido de tipo silvestre ubicado normalmente en esa posición. Se prefieren los mutantes obtenidos mediante sustitución de aminoácido. A menos que se indique lo contrario, un mutante de IL-7 puede denominarse en la presente secuencia de péptidos de IL-7 mutante, polipéptido de IL-7 mutante, proteína de IL-7 mutante, análogo de IL-7 mutante o variante de IL-7.

La designación de diversas formas de IL-7 se lleva a cabo en la presente con respecto a la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28. En la presente, se pueden usar diversas designaciones para indicar la misma mutación. Por ejemplo, una mutación de valina en la posición 15 a alanina se puede indicar como 15A, A15, A₁₅, V15A o Val15Ala.

Como se usa en la presente, "molécula de IL-7 humana" significa una molécula de IL-7 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 91%, al menos alrededor de 92%, al menos alrededor de 93%, al menos alrededor de 94%, al menos alrededor de 95% o al menos alrededor de 96% idéntica a la secuencia de IL-7 humana de SEQ ID NO: 28. Particularmente, la identidad de secuencia es de al menos alrededor de 95%, más particularmente de al menos alrededor de 96%. En formas de realización particulares, la molécula de IL-7 humana es una molécula de IL-7 de longitud completa.

Como se usa en la presente, una forma "de tipo silvestre" de IL-7 es una forma de IL-7 que es en casi todo sentido igual al polipéptido de IL-7 mutante, excepto porque la forma de tipo silvestre tiene un aminoácido de tipo silvestre en cada posición de aminoácido del polipéptido de IL-7 mutante. Por ejemplo, si el mutante de IL-7 es la IL-7 de longitud completa (es decir, IL-7 no fusionada o conjugada con ninguna otra molécula), la forma de tipo silvestre de este mutante es la IL-7 nativa de longitud completa. Si el mutante de IL-7 es una fusión entre IL-7 y otro polipéptido codificado secuencia abajo de IL-7 (por ejemplo, una cadena de anticuerpos), la forma de tipo silvestre de este mutante de IL-7 es IL-7 con una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, fusionada con el mismo polipéptido secuencia abajo. Además, si el mutante de IL-7 es una forma truncada de IL-7 (la secuencia mutada o modificada dentro de la porción no truncada de IL-7), entonces la forma de tipo silvestre de este mutante de IL-7 es una IL-7 truncada de manera similar que tiene una secuencia de tipo silvestre. A los efectos de comparar la afinidad de unión al receptor de IL-7, la unión al receptor de IL-7 o la actividad biológica de diversas formas de mutantes de IL-7 con la forma de tipo silvestre correspondiente de IL-7, la expresión "de tipo silvestre" abarca formas de IL-7 que comprenden una o más mutaciones de aminoácidos que no afectan la unión al receptor de IL-7 en comparación con la IL-7 nativa natural. En ciertas formas de realización de acuerdo con la invención, el polipéptido de IL-7 de tipo silvestre con el que se compara el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

"Linfocito T regulador" o "linfocito T_{reg}" significa un tipo especializado de linfocito T CD4⁺ que puede suprimir las respuestas de otros linfocitos T, lo que se llama tolerancia periférica. Los linfocitos T_{reg} se caracterizan por la expresión elevada de la subunidad α del receptor de IL-2 (CD25), IL-7R α (CD127) baja o ausente y el factor de transcripción Forkhead box P3 (FOXP3) (Sakaguchi, Annu Rev Immunol 22, 531-62 (2004)), y cumplen un papel fundamental en la inducción y el mantenimiento de autotolerancia periférica a antígenos, incluso los expresados por tumores. Como se usa en la presente, la expresión "células efectoras" se refiere a una población de linfocitos cuya supervivencia y/o homeostasis son afectadas por IL-7. Las células efectoras incluyen linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de memoria y linfocitos T cebados recientemente, incluso linfocitos T similares a células madre reactivos al tumor.

Como se usa en la presente, el término "PD1", "PD1 humana", "PD-1" o "PD-1 humana" (también denominada proteína de muerte celular programada 1 o muerte programada 1) se refiere a la proteína humana PD1 (SEQ ID NO: 21, proteína sin secuencia de señal)/(SEQ ID NO: 22, proteína con secuencia de señal). Ver también la

entrada de UniProt N.º Q15116 (versión 156). Como se usa en la presente, un anticuerpo "que se une a PD-1", "que se une específicamente a PD-1" o "anticuerpo anti-PD-1" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a PD-1, especialmente un polipéptido de PD-1 expresado en una superficie celular, con afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento a PD-1. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-PD-1 a una proteína no PD-1 no relacionada es menor de alrededor de 10% de la unión del anticuerpo a PD-1 según lo medido, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA), citometría de flujo (FACS) o un ensayo de resonancia de plasmones superficiales con el uso de un sistema biosensor, tal como un sistema Biacore®. En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a PD-1 tiene un valor de KD de la afinidad de unión para la unión a PD-1 humana de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ o $\leq 0.001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En una forma de realización, el valor de KD de la afinidad de unión se determina en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales mediante el uso del dominio extracelular (ECD) de PD-1 humana (PD-1-ECD, ver SEQ ID NO: 27) como antígeno.

La "unión específica" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de un anticuerpo de unirse a un antígeno específico (por ejemplo, PD-1) se puede medir o mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o bien otras técnicas conocidas por una persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, la técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (analizada, por ejemplo, en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo a una proteína no relacionada es menor de alrededor de 10% de la unión del anticuerpo al antígeno según lo medido, por ejemplo, mediante SPR. El anticuerpo comprendido en el inmunconjugado descrito en la presente se une específicamente a PD-1.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido" se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) ligados de manera lineal por enlaces amida (también denominados enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término

"polipéptido" puede usarse en lugar de cualquiera de estos términos o de manera intercambiable con estos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, incluso, entre otras, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, incluso mediante síntesis química. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, pero no tienen necesariamente tal estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, pero en cambio pueden adoptar un gran número de diferentes conformaciones, se denominan no plegados.

Un polipéptido "aislado" o una variante o derivado de este significa un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere un nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a los fines de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado, ya sea de manera parcial o sustancial, mediante cualquier técnica adecuada.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin tener en cuenta sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, mediante el uso de *software* disponible para el público, tal como el *software* BLAST, BLAST-2, Clustal W, Megalign (DNASTAR) o el paquete de programas FASTA. Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualesquier algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en la longitud total de las secuencias que se comparan. A los fines de la presente, sin embargo, se generan valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos mediante el programa ggsearch

del paquete FASTA, versión 36.3.8c o posterior, con una matriz de comparación BLOSUM50. El paquete de programas FASTA fue creado por W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227-258; y Pearson *et al.* (1997) Genomics 46:24-36 y está disponible al público en http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml. Alternativamente, se puede usar un servidor público al que se puede acceder en http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi para comparar las secuencias, mediante el programa ggsearch (global protein:protein) y las opciones por defecto (BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2) para garantizar que se realice una alineación global, más que local. El porcentaje de identidad de aminoácidos se proporciona en el encabezado de alineación de salida.

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o un constructo, por ejemplo, ARN mensajero (mARN), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amida, tal como el que se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico cualesquiera, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido.

Polinucleótido o molécula de ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado a los fines de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que contienen normalmente la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas monocatenarias positivas y negativas, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además tales moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma o un terminador de la transcripción.

"Polinucleótido (o ácido nucleico) aislado que codifica [por ejemplo, un inmunoconjugado de la invención]" se refiere a una o más moléculas de polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo y/o polipéptidos de IL-7 (o fragmentos de estos), que incluyen tales moléculas de polinucleótidos en un único vector o en vectores separados, y tales moléculas de ácidos nucleicos presentes en una o más ubicaciones en una célula huésped.

La expresión "casete de expresión" se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Por lo general, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribirá y un promotor. En ciertas formas de realización, el casete de expresión comprende secuencias de polinucleótidos que codifican inmunoconjugados de la invención o fragmentos de estos.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN que se utiliza para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al que está operativamente asociado en una célula. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de mRNA estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, la molécula o proteína de ácido ribonucleico que el gen codifica se produce mediante la transcripción celular y/o maquinaria de traducción. En una forma de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican inmunoconjugados de la invención o fragmentos de estos.

Las expresiones "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera indistinta y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluso la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de esta, independientemente de la cantidad de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido

nucleico a una célula parental, ya que puede contener mutaciones. Se incluye en la presente la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica buscada mediante cribado o seleccionada en la célula transformada originalmente. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar los inmunoconjugados de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células HEK, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en su sentido más amplio y comprende diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, a excepción de posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, en donde tales variantes generalmente están presente en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen por lo general diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante una variedad de técnicas, que incluyen, entre otras, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fago y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana. Tales métodos y otros métodos de ejemplo para la elaboración de anticuerpos monoclonales se describen en la presente.

Un anticuerpo "aislado" es un anticuerpo que se separó de un componente de su entorno natural, es decir, que no está en su medio natural. No se requiere un nivel de purificación particular. Por ejemplo, un anticuerpo aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los anticuerpos producidos de manera recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a los fines de la invención, ya que son anticuerpos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado, ya sea de manera parcial o sustancial, mediante cualquier técnica adecuada. Como tales, los inmunoconjugados de la presente invención están aislados. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica hasta más de 95% o 99% de pureza según se determina mediante, por ejemplo, métodos electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de fase inversa o de intercambio iónico). Para obtener una reseña de métodos para evaluar la pureza de los anticuerpos, ver, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan de manera indistinta en la presente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para obtener una reseña de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005). Para obtener una reseña de fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); ver también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses N.º 5,571,894 y 5,587,458. Para obtener un análisis de fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítopo de unión al receptor de rescate y que tienen una mayor semivida in vivo, ver la patente estadounidense N.º 5,869,046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat Med* 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003). Los anticuerpos de dominio

único son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6,248,516 B1). Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse con diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

La expresión "molécula de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que tiene la estructura de un anticuerpo natural. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la clase IgG son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150,000 daltons compuestas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas que están unidas mediante un enlace disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene un dominio variable (VH), también denominado dominio pesado variable o región variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominados región constante de la cadena pesada. De manera similar, del extremo N al C, cada cadena liviana tiene un dominio variable (VL), también denominado dominio liviano variable o región variable de la cadena liviana, seguido de un dominio liviano constante (CL), también denominado región constante de la cadena liviana. La cadena pesada de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir adicionalmente en subtipos, por ejemplo, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) y α_2 (IgA₂). La cadena liviana de una inmunoglobulina se puede asignar a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante. Una inmunoglobulina consiste esencialmente en dos moléculas Fab y un dominio Fc, ligados a través de la región bisagra de inmunoglobulina.

La expresión "dominio de unión al antígeno" se refiere a la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a parte o la totalidad de un antígeno y que es complementaria a este. Un dominio de unión al antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables de anticuerpo (también denominados regiones variables de anticuerpo). En particular, un dominio de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) de anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una

cadena pesada o liviana de anticuerpo que participa en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen, en general, estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones de marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Ver, por ejemplo, Kindt *et al.*, Kuby Immunology, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Como se usa en la presente en relación con las secuencias de la región variable, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Como se usa en la presente, las posiciones de aminoácidos de todos los dominios y regiones constantes de la cadena pesada y liviana están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito en Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y en la presente se denomina "numeración de acuerdo con Kabat" o "numeración de Kabat". Específicamente, el sistema de numeración de Kabat (ver páginas 647-660 de Kabat, *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) se usa para el dominio constante de la cadena liviana CL del isotipo kappa y lambda, y el sistema de numeración del índice EU de Kabat (ver páginas 661-723) se usa para los dominios constantes de la cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 y CH3), que en la presente se clarifica adicionalmente al mencionarse como "numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat" en este caso.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en la presente, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos de contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Las HVR de ejemplo en la presente incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR que se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígeno que se producen en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen los residuos de aminoácidos de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

"Marco" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable que no sean residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen por lo general en el siguiente orden en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y por lo general dos, en donde todas o sustancialmente todas las HVRR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Tales dominios variables se denominan en la presente "región variable humanizada". Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. En algunas formas de realización, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del cual derivan los residuos de las HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, de un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se sometió a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados"

comprendidas en la presente invención son aquellas en las que la región constante se modificó o cambió adicionalmente a partir de la del anticuerpo original para obtener las propiedades de acuerdo con la invención, en especial, con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor Fc (FcR).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humano se deriva de un mamífero transgénico no humano, por ejemplo, un ratón, una rata, o un conejo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humano se deriva de una línea celular de hibridoma. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados a partir de colecciones de anticuerpos humanos también se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos en la presente.

La "clase" de un anticuerpo o inmunoglobulina se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

La expresión "dominio Fc" o "región Fc" se usa en la presente para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y variantes de regiones Fc. Si bien los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar levemente, en general, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define para que se extienda desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, los anticuerpos producidos por las células huésped también se pueden someter a escisión posterior a la traducción de uno o más, particularmente uno o dos, aminoácidos del extremo C de la cadena pesada. Por lo tanto, un anticuerpo producido por una célula huésped mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico específica que codifica una cadena pesada de longitud completa puede incluir la cadena pesada de longitud completa o puede incluir una variante escindida de la cadena pesada de longitud completa (también denominada en la presente "cadena

pesada variante escindida"). Este puede ser el caso si los dos aminoácidos finales del extremo C de la cadena pesada son glicina (G446) y lisina (K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Por lo tanto, la lisina (Lys447) del extremo C, o la glicina (Gly446) y lisina (K447) del extremo C, de la región Fc pueden estar presentes o no. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas que incluyen dominios Fc (o una subunidad de un dominio Fc como se define en la presente) se indican en la presente sin el dipéptido de glicina-lisina del extremo C si no se indica lo contrario. En una forma de realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprendida en un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, comprende un dipéptido de glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente, comprendida en un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, comprende un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las composiciones de la invención, tales como las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, comprenden una población de inmunoconjugados de la invención. La población de inmunoconjugados puede comprender moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida. La población de inmunoconjugados puede consistir en una mezcla de moléculas que tienen una cadena pesada de longitud completa y moléculas que tienen una cadena pesada variante escindida, en donde al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% de los inmunoconjugados tienen una cadena pesada variante escindida. En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de inmunoconjugados de la invención comprende un inmunoconjugado que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido de glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, una composición que comprende una población de inmunoconjugados de la invención comprende un inmunoconjugado que comprende una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización de la invención, tal composición comprende una población de inmunoconjugados que comprende moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente; moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de

un dominio Fc como se especifica en la presente con un residuo de glicina del extremo C adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat); y moléculas que comprenden una cadena pesada que incluye una subunidad de un dominio Fc como se especifica en la presente con un dipéptido de glicina-lisina del extremo C adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). A menos que se especifique de otro modo en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (ver también anteriormente). Como se usa en la presente, una "subunidad" de un dominio Fc se refiere a uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc dimérico, es decir, un polipéptido que comprende regiones constantes del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, capaz de autoasociarse de manera estable. Por ejemplo, una subunidad de un dominio Fc de IgG comprende un dominio constante CH2 de IgG y CH3 de IgG.

Una "modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc" es una manipulación de la cadena principal del péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de una subunidad del dominio Fc que reduce o evita la asociación de un polipéptido que comprende la subunidad del dominio Fc con un polipéptido idéntico para formar un homodímero. Como se usa en la presente, una modificación que promueve la asociación incluye particularmente modificaciones separadas a cada una de las dos subunidades del dominio Fc que se desean asociar (es decir, la primera y la segunda subunidad del dominio Fc), en donde las modificaciones son complementarias entre sí con el fin de promover la asociación de las dos subunidades del dominio Fc. Por ejemplo, una modificación que promueve la asociación puede alterar la estructura o carga de una o ambas subunidades del dominio Fc para hacer que su asociación sea estérica o electrostáticamente favorable, respectivamente. Por lo tanto, la (hetero)dimerización se produce entre un polipéptido que comprende la primera subunidad del dominio Fc y un polipéptido que comprende la segunda subunidad del dominio Fc, que pueden no ser idénticas en el sentido de que los componentes adicionales fusionados con cada una de las subunidades (por ejemplo, porciones de unión al antígeno) no son iguales. En algunas formas de realización, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido en el dominio Fc, específicamente una sustitución de aminoácido. En una forma de realización particular, la modificación que promueve la asociación comprende una mutación de aminoácido

separada, específicamente una sustitución de aminoácido, en cada una de las dos subunidades del dominio Fc.

La expresión "funciones efectoras", cuando se usa en referencia a anticuerpos, se refiere a esas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), secreción de citocinas, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígenos, regulación descendente de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo inmunitario que conduce a la lisis de células diana recubiertas con anticuerpos por parte de células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las que se unen específicamente los anticuerpos o derivados de estos que comprenden una región Fc, en general por medio de la parte proteica que está en el extremo N con respecto a la región Fc. Como se usa en la presente, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en la cantidad de células diana que se lisan en un momento determinado, en una concentración determinada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, necesario para lograr la lisis de una cantidad determinada de células diana en un momento determinado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción de ADCC es con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, mediante los mismos métodos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento (conocidos por las personas del oficio de nivel medio), pero que no se sometió a modificación por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción de ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácido que reduce la ADCC es con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácido en el dominio Fc. En la técnica se conocen ensayos adecuados para medir la ADCC (ver, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 2006/082515 o la publicación PCT N.º WO 2012/130831).

Un "receptor Fc de activación" es un receptor Fc que, tras el acoplamiento por parte de un dominio Fc de un anticuerpo, provoca eventos de señalización que estimulan

la célula que porta el receptor a que realice funciones efectoras. Los receptores Fc de activación humanos incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89).

Como se usa en la presente, se considera que las expresiones "modificar, modificado, modificación por ingeniería genética" incluyen cualquier manipulación de la cadena principal del péptido o las modificaciones posteriores a la traducción de un polipéptido natural o recombinante o un fragmento de este. La modificación por ingeniería genética incluye modificaciones de la secuencia de aminoácidos, del patrón de glucosilación o del grupo de cadena lateral de aminoácidos individuales, así como combinaciones de estos enfoques.

"Unión reducida", por ejemplo, unión reducida a un receptor Fc o CD25, se refiere a una disminución en la afinidad para la interacción respectiva, según se mide, por ejemplo, mediante SPR. Con fines de claridad, la expresión también incluye la reducción de la afinidad a cero (o por debajo del límite de detección del método analítico), es decir, supresión completa de la interacción. Por el contrario, "mayor unión" se refiere a un aumento en la afinidad de unión para la interacción respectiva.

Como se usa en la presente, el término "inmunoconjugado" se refiere a una molécula de polipéptido que incluye al menos una molécula de IL-7 y al menos un anticuerpo. La molécula de IL-7 puede unirse al anticuerpo mediante diversas interacciones y en diversas configuraciones descritas en la presente. En formas de realización particulares, la molécula de IL-7 está fusionada con el anticuerpo mediante un ligador peptídico. Los inmunoconjugados particulares de acuerdo con la invención consisten esencialmente en una molécula de IL-7 y un anticuerpo unidos mediante una o más secuencias ligadoras.

"Fusionado" significa que los componentes (por ejemplo, un anticuerpo y una molécula de IL-7) están ligados mediante enlaces peptídicos, o directamente o bien a través de uno o más ligadores peptídicos.

Como se usan en la presente, los términos "primera" y "segunda" con respecto a subunidades del dominio Fc, etc., se usan a los fines de distinguir cuando existe más de uno de cada tipo de porción. No se pretende que el uso de estos términos confiera un orden u orientación específica del inmunoconjugado a menos que se indique explícitamente.

Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se le administraría la composición.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un amortiguador, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en la presente, "tratamiento" (y variaciones gramaticales de este, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica para alterar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se trata y se puede realizar o a modo de profilaxis o bien durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado patológico y la remisión o pronóstico mejorado. En algunas formas de realización, se usan inmunoconjugados de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

Polipéptido de IL-7 mutante

Las variantes de IL-7 de acuerdo con la presente invención tienen propiedades ventajosas para la inmunoterapia.

El polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante de acuerdo con la invención comprende al menos una mutación de aminoácido que reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con la subunidad α del receptor de IL-7 y/o la subunidad IL-2R γ .

Por ejemplo, se pueden generar mutantes de IL-7 humana (hIL-7) con afinidad reducida con IL-7R α y/o IL-2R γ mediante una sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 81 u 85, o combinaciones de estas (la numeración es en relación con la secuencia de IL-7 humana SEQ ID NO: 28). Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo incluyen K81E y G85E. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante de acuerdo con la invención comprende una sustitución de aminoácido en la posición G85 de IL-7 humana de acuerdo con SEQ ID NO: 28. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende la sustitución de aminoácido G85E de acuerdo con SEQ ID NO: 28. En una forma de realización adicional, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones K81 y G85 de IL-7 humana de acuerdo con SEQ ID NO: 28. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende las sustituciones de aminoácidos K81E y G85E de acuerdo con SEQ ID NO: 28.

El polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante de acuerdo con la invención puede comprender al menos una mutación de aminoácido que mejore la homogeneidad del polipéptido, preferentemente en una de las posiciones de aminoácidos 93 y 118 o combinaciones de estas. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo incluyen T93A y S118A. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende además las sustituciones de aminoácidos T93A y S118A. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende las sustituciones de aminoácidos G85E, T93A y S118A. En una forma de realización, el polipéptido de interleucina-7 (IL-7) mutante comprende las sustituciones de aminoácidos K81E, G85E, T93A y S118A.

En algunas formas de realización de la invención, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. En algunas formas de realización de la invención, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas formas de realización de

la invención, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En algunas formas de realización de la invención, el polipéptido de interleucina-7 mutante comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Los mutantes de IL-7 particulares de la invención comprenden una mutación de aminoácido seleccionada del grupo de K81E, G85E, T93A y S118A de IL-7 humana de acuerdo con SEQ ID NO: 28. Un mutante de IL-7 particular de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29. Un mutante de IL-7 particular de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. Un mutante de IL-7 particular de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. Un mutante de IL-7 particular de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. Estos mutantes exhiben una afinidad sustancialmente reducida con el receptor de interleucina 7 en comparación con una forma de tipo silvestre del mutante de IL-7.

Otras características de los mutantes de IL-7 divulgados en la presente incluyen una afinidad reducida con IL-7R α para permitir la administración mediada por PD-1 de IL-7 en cis (en la misma célula) en linfocitos T CD4 que expresan PD-1, en comparación con IL-7 de tipo silvestre que se administra principalmente en trans (en la célula en cercanía) cuando está en un inmunoconjugado de PD1-IL-7.

En ciertas formas de realización, dicha mutación de aminoácido reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con la IL-R α y/o la IL-2R γ al menos 5 veces, específicamente al menos 10 veces, más específicamente al menos 25 veces.

La reducción de la afinidad de IL-7 con la IL-7R α y/o la IL-2R γ , en combinación con la eliminación de la N-glucosilación de IL-7, da como resultado una proteína IL-7 con propiedades mejoradas. Por ejemplo, la eliminación del sitio de N-glucosilación da como resultado un producto más homogéneo cuando el polipéptido de IL-7 mutante se expresa en células de mamífero, tales como células CHO o HEK. La eliminación de los sitios de N-glucosilación de IL-7 se puede lograr mediante mutaciones de aminoácidos en una posición correspondiente al residuo 72, 93 o 118 de IL-7 humana.

Por lo tanto, en ciertas formas de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende una mutación de aminoácido adicional que elimina el sitio de N-glucosilación de IL-7 en una posición correspondiente al residuo 93 o 118 de IL-7 humana. En una forma de realización, dicha mutación de aminoácido adicional que elimina el sitio de N-glucosilación de IL-7 en una posición correspondiente al residuo 93 o 118 de IL-7 humana

es una sustitución de aminoácido. En una forma de realización específica, dicha mutación de aminoácido adicional es la sustitución de aminoácido T93A. En otra forma de realización específica, dicha mutación de aminoácido adicional es la sustitución de aminoácido S118A. En otra forma de realización específica, el polipéptido de IL-7 mutante comprende las sustituciones de aminoácidos T93A y S118A. En ciertas formas de realización, el polipéptido de IL-7 mutante es esencialmente una molécula de IL-7 de longitud completa. En ciertas formas de realización, el polipéptido de IL-7 mutante es una molécula de IL-7 humana. En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 con al menos una mutación de aminoácido que reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con IL-7R α en comparación con un polipéptido de IL-7 que comprende SEQ ID NO: 28 sin dicha mutación. En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 con al menos una mutación de aminoácido que reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con IL-7R α o IL-2R γ en comparación con un polipéptido de IL-7 que comprende SEQ ID NO: 28 sin dicha mutación. En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 con al menos una mutación de aminoácido que reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con IL-7R α e IL-2R γ en comparación con un polipéptido de IL-7 que comprende SEQ ID NO: 28 sin dicha mutación. En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28 con al menos una mutación de aminoácido que reduce la afinidad del polipéptido de IL-7 mutante con IL-7R α y/o IL-2R γ en comparación con un polipéptido de IL-7 que comprende SEQ ID NO: 28 sin dicha mutación.

En una forma de realización específica, el polipéptido de IL-7 mutante aún puede generar una o más de las respuestas celulares seleccionadas del grupo que consiste en: proliferación en linfocitos T, funciones efectoras en un linfocito T cebado, actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL), proliferación en un linfocito B activado, diferenciación en un linfocito B activado, proliferación en una célula natural killer (NK), diferenciación en una célula NK, secreción de citocinas por parte de una célula NK o un linfocito T activado, y citotoxicidad antitumoral killer activada por NK/linfocito (LAK).

En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comprende no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6 o no más de 5 mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de IL-2 de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, la secuencia de IL-7 humana de SEQ ID NO: 28. En una forma de realización particular, el polipéptido de IL-7 mutante comprende no más de 5 mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de IL-7 de tipo

silvestre correspondiente, por ejemplo, la secuencia de IL-7 humana de SEQ ID NO: 28.

Inmunos conjugados

Los inmunos conjugados descritos en la presente comprenden una molécula de IL y un anticuerpo. Tales inmunos conjugados aumentan significativamente la eficacia del tratamiento con IL-7 mediante el direccionamiento directo de IL-7, por ejemplo, a un microentorno tumoral. De acuerdo con la invención, un anticuerpo comprendido en el inmunos conjugado puede ser una inmunoglobulina o un anticuerpo completo, o una porción o variante de estos que tenga una función biológica, tal como afinidad de unión específica al antígeno.

Los beneficios generales del tratamiento con inmunos conjugados son claramente evidentes. Por ejemplo, un anticuerpo comprendido en un inmunos conjugado reconoce un epítipo específico de tumor y da como resultado el direccionamiento de la molécula de inmunos conjugado al sitio tumoral. Por lo tanto, se pueden administrar concentraciones altas de IL-7 al microentorno tumoral, lo que da como resultado la activación y proliferación de una variedad de células efectoras inmunitarias mencionadas en la presente mediante el uso de una dosis del inmunos conjugado que es mucho menor que la que se necesitaría para IL-7 no conjugada. Sin embargo, esta característica de los inmunos conjugados de IL-7 puede también agravar los potenciales efectos secundarios de la molécula de IL-7: Debido a la semivida en circulación significativamente mayor del inmunos conjugado de IL-7 en el torrente sanguíneo en comparación con IL-7 no conjugada, aumenta la probabilidad de que IL-7 u otras porciones de la molécula de la proteína de fusión activen componentes que están presentes por lo general en la vasculatura. La misma preocupación aplica para otras proteínas de fusión que contienen IL-7 fusionada con otra porción, tal como Fc o albúmina, lo que da como resultado una mayor semivida de IL-7 en circulación. Por lo tanto, son particularmente ventajosos los inmunos conjugados que comprenden un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente con toxicidad reducida en comparación con las formas de tipo silvestre de IL-7.

Como se describió anteriormente en la presente, dirigir IL-7 directamente a las células efectoras inmunitarias en lugar de a las células tumorales puede ser ventajoso para la inmunoterapia con IL-7.

En consecuencia, la invención proporciona un polipéptido de IL-7 mutante como se describió anteriormente en la presente, y un anticuerpo que se une a PD-1. En una

forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante y el anticuerpo forman una proteína de fusión, es decir, el polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico con el anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. En una forma de realización específica, el polipéptido de IL-7 mutante está fusionado en su aminoácido del extremo amino con el aminoácido del extremo carboxi de una de las subunidades del dominio Fc, opcionalmente a través de un ligador peptídico. En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas formas de realización, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina, particularmente una molécula de inmunoglobulina de clase IgG, más particularmente una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁. En una forma de realización tal, el polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo amino con una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo es una molécula Fab o una molécula scFv. En una forma de realización, el anticuerpo es una molécula Fab. En otra forma de realización, el anticuerpo es una molécula scFv. El inmunoconjugado también puede comprender más de un anticuerpo. En los casos en los que el inmunoconjugado está compuesto por más de un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos primero y segundo, cada anticuerpo puede seleccionarse independientemente de diversas formas de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, el primer anticuerpo puede ser una molécula Fab y el segundo anticuerpo puede ser una molécula scFv. En una forma de realización específica, cada uno de dichos anticuerpos primero y segundo es una molécula scFv o cada uno de dichos anticuerpos primero y segundo es una molécula Fab. En una forma de realización particular, cada uno de dichos anticuerpos primero y segundo es una molécula Fab. En una forma de realización, cada uno de dichos anticuerpos primero y segundo se une a PD-1.

Formatos de inmunoconjugado

Se describen formatos de inmunoconjugado de ejemplo en la publicación PCT N.º WO 2011/020783, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Estos inmunoconjugados comprenden al menos dos anticuerpos. Por lo tanto, en una forma de realización, el inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención comprende un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente, y al menos un primer y un segundo anticuerpo. En una forma de realización particular, dichos anticuerpos primero y segundo se seleccionan independientemente del grupo que consiste en una molécula Fv, particularmente una molécula scFv, y una molécula Fab. En una forma de realización

específica, dicho polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo amino o carboxi con dicho primer anticuerpo y dicho segundo anticuerpo comparte un enlace peptídico del extremo amino o carboxi con i) el polipéptido de IL-7 mutante o ii) el primer anticuerpo. En una forma de realización particular, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un polipéptido de IL-7 mutante y anticuerpos primero y segundo, particularmente moléculas Fab, unidos mediante una o más secuencias ligadoras. Tales formatos tienen la ventaja de que se unen con alta afinidad al antígeno diana (PD-1), pero proporcionan solo una unión monomérica al receptor de IL-7, con lo cual se evita el direccionamiento del inmunoconjugado a células inmunitarias que tienen receptor de IL-7 en ubicaciones distintas al sitio diana. En una forma de realización particular, un polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con un primer anticuerpo, particularmente una primera molécula Fab, y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con un segundo anticuerpo, particularmente una segunda molécula Fab. En otra forma de realización, un primer anticuerpo, particularmente una primera molécula Fab, comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con un polipéptido de IL-7 mutante, y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con un segundo anticuerpo, particularmente una segunda molécula Fab. En otra forma de realización, un primer anticuerpo, particularmente una primera molécula Fab, comparte un enlace peptídico del extremo amino con un primer polipéptido de IL-7 mutante, y comparte además un péptido del extremo carboxi con un segundo anticuerpo, particularmente una segunda molécula Fab. En una forma de realización particular, un polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con una primera región variable de la cadena pesada y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con una segunda región variable de la cadena pesada. En otra forma de realización, un polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con una primera región variable de la cadena liviana y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con una segunda región variable de la cadena liviana. En otra forma de realización, una primera región variable de la cadena pesada o liviana está unida mediante un enlace peptídico del extremo carboxi a un polipéptido de IL-7 mutante y está unida además mediante un enlace peptídico del extremo amino a una segunda región variable de la cadena pesada o liviana. En otra forma de realización, una primera región variable de la cadena pesada o liviana está unida mediante un enlace peptídico del extremo amino a un polipéptido de IL-7 mutante y está unida además mediante un enlace peptídico del extremo carboxi a una segunda región variable de la cadena pesada o liviana. En una forma de realización, un polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con una primera cadena pesada o

liviana de Fab y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con una segunda cadena pesada o liviana de Fab. En otra forma de realización, una primera cadena pesada o liviana de Fab comparte un enlace peptídico del extremo carboxi con un polipéptido de IL-7 mutante y comparte además un enlace peptídico del extremo amino con una segunda cadena pesada o liviana de Fab. En otras formas de realización, una primera cadena pesada o liviana de Fab comparte un enlace peptídico del extremo amino con un polipéptido de IL-7 mutante y comparte además un enlace peptídico del extremo carboxi con una segunda cadena pesada o liviana de Fab. En una forma de realización, el inmunoconjugado comprende un polipéptido de IL-7 mutante que comparte un enlace peptídico del extremo amino con una o más moléculas scFv y que comparte además un enlace peptídico del extremo carboxi con una o más moléculas scFv.

Sin embargo, los formatos particularmente adecuados de los inmunoconjugados de acuerdo con la presente invención comprenden una molécula de inmunoglobulina como anticuerpo. Tales formatos de inmunoconjugado se describen en WO 2012/146628, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En consecuencia, en formas de realización particulares, el inmunoconjugado comprende un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente y una molécula de inmunoglobulina que se une a PD-1, particularmente una molécula de IgG, más particularmente una molécula de IgG₁. En una forma de realización, el inmunoconjugado comprende no más de un polipéptido de IL-7 mutante. En una forma de realización, la molécula de inmunoglobulina es humana. En una forma de realización, la molécula de inmunoglobulina comprende una región constante humana, por ejemplo, un dominio CH1, CH2, CH3 y/o CL humano. En una forma de realización, la inmunoglobulina comprende un dominio Fc humano, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En una forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante comparte un enlace peptídico del extremo amino o carboxi con la molécula de inmunoglobulina. En una forma de realización, el inmunoconjugado consiste esencialmente en un polipéptido de IL-7 mutante y una molécula de inmunoglobulina, particularmente una molécula de IgG, más particularmente una molécula de IgG₁, unidos mediante una o más secuencias ligadoras. En una forma de realización específica, el polipéptido de IL-7 mutante está fusionado en su aminoácido del extremo amino con el aminoácido del extremo carboxi de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina, opcionalmente mediante un ligador peptídico.

El polipéptido de IL-7 mutante puede estar fusionado con el anticuerpo directamente o mediante un ligador peptídico, que comprende uno o más aminoácidos,

por lo general alrededor de 2-20 aminoácidos. En la técnica se conocen ligadores peptídicos y se los describe en la presente. Los ligadores peptídicos no inmunogénicos adecuados incluyen, por ejemplo, los ligadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ o $G_4(SG_4)_n$. "n" es generalmente un número entero de 1 a 10, por lo general de 2 a 4. En una forma de realización, el ligador peptídico tiene una longitud de al menos 5 aminoácidos, en una forma de realización una longitud de 5 a 100, en una forma de realización adicional de 10 a 50 aminoácidos. En una forma de realización particular, el ligador peptídico tiene una longitud de 15 aminoácidos. En una forma de realización, el ligador peptídico es $(GxS)_n$ o $(GxS)_nG_m$, en donde G=glicina, S=serina y $(x=3, n= 3, 4, 5$ o $6, y m=0, 1, 2$ o $3)$ o $(x=4, n=2, 3, 4$ o $5 y m= 0, 1, 2$ o $3)$, en una forma de realización $x=4$ y $n=2$ o 3 , en una forma de realización adicional $x=4$ y $n=3$, en una forma de realización adicional $x=4, n=2$ y $m=4$. En una forma de realización particular, el ligador peptídico es $(G_4S)_2G_4$ (SEQ ID NO: 19). En una forma de realización, el ligador peptídico tiene (o consiste en) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Un ligador peptídico alternativo comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 20.

En una forma de realización particular, el inmunoconjugado comprende una molécula de IL-7 mutante y una molécula de inmunoglobulina, particularmente una molécula de inmunoglobulina de subclase IgG₁, que se une a PD-1, en donde la molécula de IL-7 mutante está fusionada en su aminoácido del extremo amino con el aminoácido del extremo carboxi de una de las cadenas pesadas de inmunoglobulina mediante el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19.

En una forma de realización particular, el inmunoconjugado comprende una molécula de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el anticuerpo comprende un dominio Fc, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana, compuesto por una primera subunidad y una segunda subunidad, y la molécula de IL-7 mutante está fusionada en su aminoácido del extremo amino con el aminoácido del extremo carboxi de una de las subunidades del dominio Fc mediante el ligador peptídico de SEQ ID NO: 19.

Anticuerpos contra PD-1

El anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención se une a PD-1, particularmente PD-1 humana, y es capaz de dirigir el polipéptido de IL-7 mutante a un sitio diana donde se expresa PD-1, particularmente a un linfocito T que expresa PD-1, por ejemplo, asociado con un tumor.

Se describen anticuerpos contra PD-1 adecuados que pueden usarse en el

inmunoconjugado de la invención en WO 2017/055443 A1, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

El inmunoconjugado de la invención puede comprender dos o más anticuerpos, que pueden unirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes. Sin embargo, en formas de realización particulares, cada uno de estos anticuerpos se une a PD-1. En una forma de realización, el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención es monoespecífico. En una forma de realización particular, el inmunoconjugado comprende un solo anticuerpo monoespecífico, particularmente una molécula de inmunoglobulina monoespecífica.

El anticuerpo puede ser cualquier tipo de anticuerpo o fragmento de este que retenga la unión específica a PD-1, particularmente PD-1 humana. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, moléculas Fv, moléculas scFv, moléculas Fab y moléculas F(ab')₂. Sin embargo, en formas de realización particulares, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad. En algunas formas de realización, el anticuerpo es una inmunoglobulina, particularmente una inmunoglobulina de clase IgG, más particularmente una inmunoglobulina de subclase IgG₁.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en las posiciones 71-73 de acuerdo con la numeración de Kabat, una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en las posiciones 71-73 de acuerdo con la numeración de Kabat, y (b)

una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, la región variable de la cadena pesada y/o liviana es una región variable humanizada. En algunas formas de realización, la región variable de la cadena pesada y/o liviana comprende regiones de marco humanas (FR).

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En algunas formas de realización, la región variable de la cadena pesada y/o liviana es una región variable humanizada. En algunas formas de realización, la región variable de la cadena pesada y/o liviana comprende regiones de marco humanas (FR).

En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende

una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

En una forma de realización particular, el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una forma de realización, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que comprende una región constante humana, particularmente una molécula de inmunoglobulina de clase IgG que comprende un dominio CH1, CH2, CH3 y/o CL humano. Se proporcionan secuencias de ejemplo de dominios constantes humanos en SEQ ID NO: 24 y 25 (dominios CL kappa y lambda humanos, respectivamente) y SEQ ID NO: 26 (dominios constantes de la cadena pesada de IgG1 humana CH1-CH2-CH3). En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25, particularmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. Particularmente, la región constante de la cadena pesada puede comprender mutaciones de aminoácidos en el dominio Fc como se describe en la presente.

Dominio Fc

En formas de realización particulares, el anticuerpo comprendido en los immunoconjugados de acuerdo con la invención comprende un dominio Fc, compuesto por una primera y una segunda subunidad. El dominio Fc de un anticuerpo consiste en un par de cadenas de polipéptidos que comprenden dominios de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, cuyas subunidades comprenden los dominios constantes de la cadena pesada de IgG CH2 y CH3. Las dos subunidades del dominio Fc

son capaces de asociarse de manera estable entre sí. En una forma de realización, el inmunoconjugado de la invención comprende no más de un dominio Fc.

En una forma de realización, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado es un dominio Fc de IgG. En una forma de realización particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁. En otra forma de realización, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄. En una forma de realización más específica, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₄ que comprende una sustitución de aminoácido en la posición S228 (numeración del índice EU de Kabat), particularmente la sustitución de aminoácido S228P. Esta sustitución de aminoácido reduce el intercambio de brazo Fab *in vivo* de anticuerpos IgG₄ (ver Stubenrauch *et al.*, Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). En una forma de realización particular adicional, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En una forma de realización incluso más particular, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁ humana. Se proporciona una secuencia de ejemplo de una región Fc de IgG₁ humana en SEQ ID NO: 23.

Modificaciones del dominio Fc que promueven la heterodimerización

Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención comprenden un polipéptido de IL-7 mutante, particularmente un polipéptido de IL-7 mutante único (no más de uno), fusionado con una u otra de las dos subunidades del dominio Fc, por lo que las dos subunidades del dominio Fc están generalmente comprendidas en dos cadenas de polipéptidos no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización conducen a varias combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza del inmunoconjugado en la producción recombinante, será entonces ventajoso introducir en el dominio Fc del anticuerpo una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en formas de realización particulares, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de acuerdo con la invención comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de interacción proteína-proteína más amplia entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humana está en el dominio CH3 del dominio Fc. Por lo tanto, en una forma de realización, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

Existen varios enfoques de modificaciones en el dominio CH3 del dominio Fc para forzar la heterodimerización, que se describen, por ejemplo, en WO 96/27011,

WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954, WO 2013096291. Por lo general, en todos estos enfoques, tanto el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc como el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc están modificados por ingeniería genética de manera complementaria para que cada dominio CH3 (o la cadena pesada que lo comprende) ya no pueda homodimerizarse consigo mismo sino que se vea forzado a heterodimerizarse con el otro dominio CH3 modificado por ingeniería genética de manera complementaria (de modo que el primer y el segundo dominio CH3 se heterodimericen y no se formen homodímeros entre los dos primeros o los dos segundos dominios CH3).

En una forma de realización específica, dicha modificación que promueve la asociación de la primera y segunda subunidades del dominio Fc es una modificación denominada "botón en ojal", que comprende una modificación de "botón" en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc.

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Generalmente, el método implica introducir una protuberancia ("botón") en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfaz de un segundo polipéptido, de manera tal que la protuberancia se puede ubicar en la cavidad para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen mediante el reemplazo de cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar con respecto a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido mediante el reemplazo de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en una forma de realización particular, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, lo que genera una protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad que se puede posicionar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, y, en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, un residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido

que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, lo cual genera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad dentro de la cual se puede posicionar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad.

Dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor se selecciona preferentemente del grupo que consiste en arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor se selecciona preferentemente del grupo que consiste en alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V).

La protuberancia y la cavidad se pueden elaborar al alterar el ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica del sitio o síntesis de péptidos.

En una forma de realización específica, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc (la subunidad de "botones"), el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y, en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (la subunidad de "ojal"), el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V). En una forma de realización, en la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza adicionalmente con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, en la primera subunidad del dominio Fc y adicionalmente, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C) o el residuo de ácido glutámico en la posición 356 se reemplaza con un residuo de cisteína (E356C) (particularmente el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína), y, en la segunda subunidad del dominio Fc y adicionalmente, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de cisteína (Y349C) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). La introducción de estos dos residuos de cisteína da como resultado la formación de un enlace disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, lo cual estabiliza aún más el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

En una forma de realización particular, la primera subunidad del dominio Fc

comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A y Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En algunas formas de realización, la segunda subunidad del dominio Fc comprende además las sustituciones de aminoácidos H435R y Y436F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización particular, el polipéptido de IL-7 mutante se fusiona (opcionalmente mediante un ligador peptídico) a la primera subunidad del dominio Fc (que comprende la modificación de "botón"). Sin desear limitarse a la teoría, la fusión del polipéptido de IL-7 mutante a la subunidad que contiene botón del dominio Fc minimizará (adicionalmente) la generación de inmunoconjugados que comprenden dos polipéptidos de IL-7 mutante (choque estérico de dos polipéptidos que contienen botón).

Otras técnicas de modificación de CH3 para forzar la heterodimerización se contemplan como alternativas de acuerdo con la invención y se describen, por ejemplo, en WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en EP 1870459. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácidos específicas en la interfaz de dominio CH3/CH3 entre las dos subunidades del dominio Fc. Una forma de realización preferida para el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención son las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en uno de los dos dominios CH3 (del dominio Fc) y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el otro de los dominios CH3 del dominio Fc (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otra forma de realización, el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención comprende la mutación de aminoácido T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, y de manera adicional las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otra forma de realización, el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención comprende las mutaciones de aminoácidos S354C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, o dicho anticuerpo comprende las mutaciones de aminoácidos Y349C, T366W en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos S354C, T366S, L368A, Y407V en los dominios CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc y de manera adicional las mutaciones de aminoácidos R409D; K370E en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc y las mutaciones de aminoácidos D399K; E357K en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2013/157953. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366K y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido L351D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otra forma de realización, el primer dominio CH3 comprende además la mutación de aminoácido L351K. En una forma de realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende además una mutación de aminoácido seleccionada de Y349E, Y349D y L368E (preferentemente L368E) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2012/058768. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A, K409F. En una forma de realización adicional, el segundo dominio CH3 comprende una mutación de aminoácido adicional en la posición T411, D399, S400, F405, N390, o K392, por ejemplo, seleccionada de a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E o T411W, b) D399R, D399W, D399Y o D399K, c) S400E, S400D, S400R, o S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V o F405W, e) N390R, N390K o N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F o K392E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización adicional, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos L351Y e Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366V y K409F. En una forma de realización adicional, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407A y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos T366A, K409F. En una forma de realización adicional, el

segundo dominio CH3 comprende además las mutaciones de aminoácidos K392E, T411E, D399R y S400R (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2011/143545, por ejemplo, con la modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 368 y 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2011/090762, que también usa la tecnología de botones en ojales descrita anteriormente. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366W y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407A. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido T366Y y un segundo dominio CH3 comprende la mutación de aminoácido Y407T (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En una forma de realización, el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado o su dominio Fc es de la subclase IgG₂ y se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2010/129304.

En una forma de realización alternativa, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media los efectos de direccionamiento electrostático, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. Generalmente, este método implica reemplazar uno o más residuos de aminoácidos en la interfaz de las dos subunidades del dominio Fc con residuos de aminoácidos con carga de manera tal que la formación de homodímeros se vuelva electrostáticamente desfavorable, pero que la heterodimerización se vuelva electrostáticamente favorable. En una forma de realización tal, un primer dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido de K392 o N392 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferentemente K392D o N392D) y un segundo dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido de D399, E356, D356 o E357 con un aminoácido con carga positiva (por ejemplo, lisina (K) o arginina (R), preferentemente D399K, E356K, D356K o E357K, y con mayor preferencia D399K y E356K). En una forma de realización adicional, el primer dominio CH3 comprende además la sustitución de aminoácido de K409 o R409 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D),

preferentemente K409D o R409D). En una forma de realización adicional, el primer dominio CH3 comprende adicional o alternativamente la sustitución de aminoácido de K439 y/o K370 con un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D)) (todas las numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, se usa alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2007/147901. En una forma de realización, un primer dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos K253E, D282K y K322D y un segundo dominio CH3 comprende las mutaciones de aminoácidos D239K, E240K y K292D (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En aun otra forma de realización, se puede usar alternativamente el enfoque de heterodimerización descrito en WO 2007/110205.

En una forma de realización, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos K392D y K409D, y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos D356K y D399K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc que reducen la unión al receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc le confiere al inmunoconjugado propiedades farmacocinéticas favorables, que incluyen una larga semivida en suero que contribuye a una buena acumulación en el tejido diana y una relación favorable de distribución en tejido-sangre. Al mismo tiempo, puede, no obstante, conducir a un direccionamiento indeseable del inmunoconjugado a células que expresan receptores Fc en lugar de a las células portadoras de antígeno preferidas. Además, la coactivación de las vías de señalización del receptor Fc puede conducir a una liberación de citocinas que, en combinación con el polipéptido de IL-7 y la larga semivida del inmunoconjugado, da como resultado una activación excesiva de los receptores de citocinas y graves efectos secundarios tras la administración sistémica. En consecuencia, en formas de realización particulares, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de acuerdo con la invención exhibe una afinidad de unión reducida con un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. En una forma de realización tal, el dominio Fc (o el anticuerpo que comprende dicho dominio Fc) exhibe menos de 50%, preferentemente menos de 20%, con mayor preferencia menos de 10% y con máxima preferencia menos de 5% de la afinidad de unión con un receptor Fc, en

comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa), y/o menos de 50%, preferentemente menos de 20%, con mayor preferencia menos de 10% y con máxima preferencia menos de 5% de la función efectora, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa). En una forma de realización, el dominio Fc (o un anticuerpo que comprende dicho dominio Fc) no se une sustancialmente a un receptor Fc y/o induce una función efectora. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En una forma de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fcγ humano de activación, más específicamente FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, más específicamente FcγRIIIa humano. En una forma de realización, la función efectora es una o más seleccionadas del grupo de CDC, ADCC, ADCP y secreción de citocinas. En una forma de realización particular, la función efectora es ADCC. En una forma de realización, el dominio Fc exhibe una afinidad de unión sustancialmente similar al receptor de Fc neonatal (FcRn), en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa. Se logra una unión a FcRn sustancialmente similar cuando el dominio Fc (o un anticuerpo que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de alrededor de 70%, particularmente más de alrededor de 80%, más particularmente más de alrededor de 90% de la afinidad de unión de un dominio Fc de IgG₁ nativa (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgG₁ nativa) con FcRn.

En ciertas formas de realización, el dominio Fc se modifica por ingeniería genética para que tenga una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En formas de realización particulares, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc con un receptor Fc y/o la función efectora. Por lo general, la misma una o más mutaciones de aminoácidos están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En una forma de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor Fc. En una forma de realización, la mutación de aminoácido reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor Fc al menos 2 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces. En formas de realización en las que hay más de una mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc al receptor Fc, la combinación de estas mutaciones de aminoácidos puede reducir la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor Fc al menos 10 veces, al menos 20 veces o incluso al menos 50 veces. En una forma de realización, el anticuerpo que comprende

un dominio Fc modificado por ingeniería genética exhibe menos de 20%, particularmente menos de 10%, más particularmente menos de 5% de la afinidad de unión con un receptor Fc en comparación con un anticuerpo que comprende un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. En una forma de realización particular, el receptor Fc es un receptor Fc γ . En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En algunas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc de activación. En una forma de realización específica, el receptor Fc es un receptor Fc γ humano de activación, más específicamente Fc γ RIIIa, Fc γ RI o Fc γ RIIa humano, más específicamente Fc γ RIIIa humano. Preferentemente, se reduce la unión a cada uno de estos receptores. En algunas formas de realización, también se reduce la afinidad de unión a un componente del complemento, específicamente la afinidad de unión a C1q. En una forma de realización, la afinidad de unión al receptor Fc neonatal (FcRn) no se reduce. Una unión a FcRn sustancialmente similar, es decir, preservación de la afinidad de unión del dominio Fc con dicho receptor, se logra cuando el dominio Fc (o un anticuerpo que comprende dicho dominio Fc) exhibe más de alrededor de 70% de la afinidad de unión de una forma no modificada por ingeniería genética del dominio Fc (o un anticuerpo que comprende dicha forma no modificada por ingeniería genética del dominio Fc) con FcRn. El dominio Fc, o el anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención que comprende dicho dominio Fc, puede exhibir más de alrededor de 80% e incluso más de alrededor de 90% de tal afinidad. En ciertas formas de realización, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado se modifica por ingeniería genética para que tenga una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc no modificado por ingeniería genética. La función efectora reducida puede incluir, entre otras, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) reducida, secreción de citocinas reducida, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario por parte de células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce la apoptosis reducida, reticulación de anticuerpos unidos a la diana reducida, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido. En una forma de realización, la función efectora reducida es una o más seleccionadas del grupo de CDC reducida, ADCC reducida, ADCP reducida y secreción de citocinas reducida. En una forma de realización particular, la función efectora reducida es ADCC reducida. En una forma de realización, la ADCC reducida es menos de 20% de la ADCC inducida por un

dominio Fc no modificado por ingeniería genética (o un anticuerpo que comprende un dominio Fc no modificado por ingeniería genética).

En una forma de realización, la mutación de aminoácido que reduce la afinidad de unión del dominio Fc a un receptor Fc y/o la función efectora es una sustitución de aminoácido. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización más específica, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo de L234, L235 y P329 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En algunas formas de realización, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329. En una forma de realización más específica, la sustitución de aminoácido es P329A o P329G, particularmente P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329 y una sustitución de aminoácido adicional en una posición seleccionada de E233, L234, L235, N297 y P331 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización más específica, la sustitución de aminoácido adicional es E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D o P331S. En formas de realización particulares, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos en las posiciones P329, L234 y L235 (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En formas de realización más particulares, el dominio Fc comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", "PGLALA" o "LALAPG"). Específicamente, en formas de realización particulares, cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración del índice EU de Kabat), es decir, en cada una de la primera y segunda subunidades del dominio Fc, el residuo de leucina en la posición 234 se reemplaza con un residuo de alanina (L234A), el residuo de leucina en la posición 235 se reemplaza con un residuo de alanina (L235A) y el residuo de prolina en la posición 329 se reemplaza con un residuo de glicina (P329G) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización tal, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG₁, particularmente un dominio Fc de IgG₁ humana. La combinación de sustituciones de aminoácidos "P329G LALA" elimina casi por completo la unión al receptor Fcγ (así como al complemento) de un dominio Fc de IgG₁ humana,

como se describe en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. WO 2012/130831 también describe métodos para preparar tales dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión al receptor Fc o funciones efectoras.

Los anticuerpos IgG₄ exhiben una afinidad de unión reducida a receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con los anticuerpos IgG₁. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el dominio Fc del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado de la invención es un dominio Fc de IgG₄, particularmente un dominio Fc de IgG₄ humana. En una forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en la posición S228, específicamente la sustitución de aminoácido S228P (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Para reducir adicionalmente su afinidad de unión a un receptor Fc y/o su función efectora, en una forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición L235, específicamente la sustitución de aminoácido L235E (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otra forma de realización, el dominio Fc de IgG₄ comprende una sustitución de aminoácido en la posición P329, específicamente la sustitución de aminoácido P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). En una forma de realización particular, el dominio Fc de IgG₄ comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones S228, L235 y P329, específicamente las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Tales mutantes de dominio Fc de IgG₄ y las propiedades de unión al receptor Fc se describen en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

En una forma de realización particular, el dominio Fc que exhibe una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o una función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG₁ nativa, es un dominio Fc de IgG₁ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y opcionalmente P329G, o un dominio Fc de IgG₄ humana que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y opcionalmente P329G (numeraciones de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

En ciertas formas de realización, se ha eliminado la N-glucosilación del dominio Fc. En una forma de realización tal, el dominio Fc comprende una mutación de aminoácido en la posición N297, particularmente una sustitución de aminoácido que reemplaza asparagina con alanina (N297A) o ácido aspártico (N297D) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de los dominios Fc descritos anteriormente en la presente y en la publicación PCT N.º WO 2012/130831, los dominios Fc con unión al receptor Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense N.º 6,737,056) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Tales mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluso el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense N.º 7,332,581).

Se pueden preparar dominios Fc mutantes mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos con métodos genéticos o químicos conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir la mutagénesis específica del sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) con instrumentos estándar, tales como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc, tales como los que pueden obtenerse mediante expresión recombinante. Alternativamente, se puede evaluar la afinidad de unión de los dominios Fc o anticuerpos que comprenden un dominio Fc con receptores Fc mediante el uso de líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

Se puede medir la función efectora de un dominio Fc, o un anticuerpo que comprende un dominio Fc, mediante métodos conocidos en la técnica. Se describen ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente estadounidense N.º 5,500,362; Hellstrom *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patente estadounidense N.º 5,821,337; Bruggemann *et al.*, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Alternativamente, se pueden emplear métodos de ensayos no radioactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células natural killer (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede

evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 652-656 (1998).

En algunas formas de realización, se reduce la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q. En consecuencia, en algunas formas de realización en donde el dominio Fc está modificado por ingeniería genética para tener una función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye una CDC reducida. Se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para determinar si el dominio Fc, o el anticuerpo que comprende el dominio Fc, es capaz de unirse a C1q y por ende tiene actividad de CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg *et al.*, Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

La unión a FcRn y las determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* también se pueden realizar mediante métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova S.B. *et al.*, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006); WO 2013/120929).

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante es una molécula de IL-7 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos G85E (la numeración es en relación con la secuencia de IL-7 humana SEQ ID NO: 28); y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante es una molécula de IL-7 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos K81E y G85E (la numeración es en relación con la secuencia de IL-7 humana SEQ ID NO: 28); y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un

polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante es una molécula de IL-7 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos G85E, T93A y S118A (la numeración es en relación con la secuencia de IL-7 humana SEQ ID NO: 28); y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante es una molécula de IL-7 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos K81E, G85E, T93A y S118A (la numeración es en relación con la secuencia de IL-7 humana SEQ ID NO: 28); y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29, y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante y un anticuerpo que se une a PD-1, en donde el polipéptido de IL-7 mutante comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32, y en donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (b) una región variable de la cadena liviana (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En una forma de realización de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el anticuerpo es una inmunoglobulina de clase IgG, que comprende un dominio Fc de IgG₁ humana compuesto por una primera y una segunda subunidad,

en donde en la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W) y, en la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V) y, opcionalmente, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo de alanina (L368A) (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat), y en donde además cada subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En esta forma de realización, el polipéptido de IL-7 mutante puede estar fusionado en su aminoácido del extremo amino con el aminoácido del extremo carboxi de la primera subunidad del dominio F, a través de un ligador peptídico de SEQ ID NO: 19.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 34, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 37.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 34, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 38.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 34, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 39.

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 33, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 34, y un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 40.

Polinucleótidos

La invención proporciona además polinucleótidos aislados que codifican un inmunoconjugado como se describe en la presente o un fragmento de este. En algunas formas de realización, dicho fragmento es un fragmento de unión al antígeno.

Los polinucleótidos que codifican inmunoconjugados de la invención pueden expresarse como un solo polinucleótido que codifica todo el inmunoconjugado o como múltiples (por ejemplo, dos o más) polinucleótidos que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que se coexpresan pueden asociarse a través de, por ejemplo, puentes disulfuro u otros medios para formar un inmunoconjugado funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena liviana de un anticuerpo puede ser codificada por un polinucleótido separado de la porción del inmunoconjugado que comprende la porción de la cadena pesada del anticuerpo y el polipéptido de IL-7 mutante. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asociarán con los polipéptidos de la cadena

liviana para formar el inmunoconjugado. En otro ejemplo, la porción del inmunoconjugado que comprende una de las dos subunidades del dominio Fc y el polipéptido de IL-7 mutante puede ser codificada por un polinucleótido separado de la porción del inmunoconjugado que comprende la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Cuando se coexpresan, las subunidades del dominio Fc se asociarán para formar el dominio Fc.

En algunas formas de realización, el polinucleótido aislado codifica todo el inmunoconjugado de acuerdo con la invención como se describe en la presente. En otras formas de realización, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido comprendido en el inmunoconjugado de acuerdo con la invención como se describe en la presente.

En una forma de realización, un polinucleótido aislado de la invención codifica la cadena pesada del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado (por ejemplo, una cadena pesada de inmunoglobulina) y el polipéptido de IL-7 mutante. En otra forma de realización, un polinucleótido aislado de la invención codifica la cadena liviana del anticuerpo comprendido en el inmunoconjugado.

En ciertas formas de realización, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otras formas de realización, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (mARN). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Se pueden preparar polipéptidos de IL-7 mutante útiles en la invención mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación, con métodos genéticos o químicos conocidos en la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir la mutagénesis específica del sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación. La secuencia de IL-7 humana nativa se muestra en SEQ ID NO: 28. La sustitución o inserción puede implicar residuos de aminoácidos naturales y no naturales. La modificación de aminoácidos incluye métodos de modificación química conocidos tales como la adición de sitios de glucosilación o uniones de carbohidratos, y similares.

Los anticuerpos de la invención se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aísla uno o más polinucleótidos que codifican el inmunoconjugado (fragmento), por ejemplo, como se

describió anteriormente, y se los inserta en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Tal polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales. En una forma de realización, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante de un inmunoconjugado (fragmento) junto con señales adecuadas de control de la transcripción/traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el inmunoconjugado (fragmento) (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en la presente, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Si bien un "codón de detención" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualesquier secuencias flanqueantes, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en un solo constructo de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en constructos de polinucleótido separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan después de la traducción o junto con esta en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas con un polinucleótido que codifica el inmunoconjugado de la invención, o variante o derivado de este. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, entre otros, elementos o motivos especializados, tales como un péptido de señal secretor o un dominio funcional heterólogo. Hay una asociación operativa cuando una región codificante de un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras

de tal manera que la expresión del producto génico queda bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con esta) están "asociados operativamente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del mRNA que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere en la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o no interfiere en la capacidad de transcripción de la plantilla de ADN. Por lo tanto, una región promotora estaría asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fue capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células. En la presente se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, entre otras, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, entre otros, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con el intrón A), virus del simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tal como, por ejemplo, virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado, tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De manera similar, las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, entre otros, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión también puede incluir otras características, tales como un origen de replicación y/o elementos de integración al cromosoma, tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas segregadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez iniciada la exportación de la cadena de proteínas en crecimiento a lo largo del retículo endoplasmático rugoso. Las personas del oficio de nivel medio están al tanto de que los polipéptidos segregados por células de vertebrado tienen generalmente un péptido de señal fusionado con el extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma segregada o "madura" del polipéptido. Alternativamente, se puede usar un péptido de señal de mamífero heterólogo o un derivado funcional de este. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder de activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón.

Un ADN que codifica una secuencia de proteínas corta que podría usarse para facilitar una purificación posterior (por ejemplo, una etiqueta de histidina) o ayudar a etiquetar el inmunoconjugado se puede incluir dentro o en los extremos del inmunoconjugado (fragmento) que codifica el polinucleótido.

En una forma de realización adicional, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En ciertas formas de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, solas o en combinación, descritas en la presente en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En una forma de realización tal, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado o transfectado con) uno o más vectores que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican el inmunoconjugado de la invención. Como se usa en la presente, la expresión "célula huésped" se refiere a cualquier clase de sistema celular que puede modificarse por ingeniería genética para generar los inmunoconjugados de la invención o fragmentos de estos. En la técnica se conocen células huésped adecuadas para replicar y soportar la expresión de inmunoconjugados. Tales células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen vector para la siembra de fermentadores a gran escala a fin de obtener cantidades suficientes del inmunoconjugado para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células

eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, particularmente cuando no se necesita glucosilación. Luego de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de célula bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, que incluyen cepas de hongos y levadura cuyas vías de glucosilación se "humanizaron", lo que dio como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, *Nat Biotech* 22, 1409-1414 (2004), y Li *et al.*, *Nat Biotech* 24, 210-215 (2006). Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se identificaron numerosas cepas baculovirales que pueden usarse en conjunto con células de insecto, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas). También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamífero que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), línea de riñón embrionario humano (células 293 o linfocitos 293T como se describen, por ejemplo, en Graham *et al.* *J Gen Virol* 36, 59 (1977)), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describen, por ejemplo, en Mather, *Biol Reprod* 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describen, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad Sci* 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO dhfr⁻ (Urlaub y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para obtener una reseña de ciertas líneas de células huésped de mamífero que son adecuadas para la producción de proteínas, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*,

vol. 248 (B.K.C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ), páginas 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En una forma de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionario humano (HEK) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20).

En la técnica se conocen tecnologías estándar para expresar genes extraños en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido de IL-7 mutante fusionado o con la cadena pesada o bien con la cadena liviana de un anticuerpo pueden modificarse por ingeniería genética para expresar también la otra de las cadenas de anticuerpo, de modo que el producto de fusión de IL-7 mutante expresado sea un anticuerpo que tenga tanto una cadena pesada como una cadena liviana.

En una forma de realización, se proporciona un método para producir un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos que codifican el inmunoconjugado, como se proporciona en la presente, en condiciones adecuadas para la expresión del inmunoconjugado, y opcionalmente recuperar el inmunoconjugado de la célula huésped (o el medio de cultivo de la célula huésped).

En el inmunoconjugado de la invención, el polipéptido de IL-7 mutante puede fusionarse mediante ingeniería genética con el anticuerpo, o puede conjugarse químicamente con el anticuerpo. La fusión genética del polipéptido de IL-7 con el anticuerpo puede diseñarse de modo que la secuencia de IL-7 se fusiona directamente con el polipéptido o indirectamente mediante una secuencia ligadora. La composición y longitud del ligador pueden determinarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden evaluarse para determinar su eficacia. En la presente se describen ligadores peptídicos particulares. También se pueden incluir secuencias adicionales para incorporar un sitio de escisión para separar los componentes individuales de la fusión si se desea, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa. Además, la proteína de fusión de IL-7 también se puede sintetizar químicamente mediante el uso de métodos de síntesis de polipéptidos como se conoce en la técnica (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield). Los polipéptidos de IL-7 mutante pueden conjugarse químicamente con otras moléculas, por ejemplo anticuerpos, mediante el uso de métodos

de conjugación química conocidos. Para este propósito, se pueden usar reactivos de reticulación bifuncionales, tales como reactivos de reticulación homofuncionales o heterofuncionales conocidos en la técnica. El tipo de reactivo de reticulación que se ha de usar depende de la naturaleza de la molécula que se ha de acoplar a IL-7 y las personas del oficio de nivel medio pueden identificarlo rápidamente. Adicional o alternativamente, la IL-7 mutante y/o la molécula con la cual se la pretende conjugar pueden derivatizarse químicamente de modo que ambas puedan conjugarse en una reacción separada como también se conoce en la técnica.

Los inmunoconjugados de la invención comprenden un anticuerpo. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos no naturales pueden construirse mediante síntesis de péptidos en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 4,186,567) o pueden obtenerse, por ejemplo, al cribar colecciones combinatorias que comprenden cadenas pesadas variables y cadenas livianas variables (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5,969,108 de McCafferty). Los inmunoconjugados, anticuerpos y métodos para producirlos también se describen en detalle, por ejemplo, en las publicaciones PCT N.º WO 2011/020783, WO 2012/107417 y WO 2012/146628, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Se puede usar cualquier especie animal de anticuerpo en los inmunoconjugados de la invención. Los anticuerpos no limitativos útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, primate o humano. Si el inmunoconjugado es para uso humano, se puede usar una forma quimérica del anticuerpo, en donde las regiones constantes del anticuerpo son de un ser humano. También se puede preparar una forma humanizada o completamente humana del anticuerpo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5,565,332 de Winter). La humanización puede lograrse mediante diversos métodos, que incluyen, entre otros, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo donante) en regiones constantes y de marco humanas (por ejemplo, anticuerpo receptor) con o sin retención de residuos de marco esenciales (por ejemplo, los que son importantes para retener una buena afinidad de unión al antígeno o buenas funciones de anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos esenciales para la interacción anticuerpo-antígeno) en regiones constantes y de marco humanas, o (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "disfrazados" con una

sección de tipo humano mediante el reemplazo de residuos superficiales. Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se analizan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes estadounidenses N.º 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 y 7,087,409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "resurgimiento"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "la transposición de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describe el enfoque de "selección guiada" de la transposición de FR). Las regiones de marco humanas que se pueden utilizar para la humanización incluyen, entre otras: regiones de marco seleccionadas mediante el método de "mejor ajuste" (ver, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296, (1993)); las regiones de marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena pesada o liviana (ver, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones de marco maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones de marco de la línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones de marco derivadas de cribado de colecciones de FR (ver, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Se pueden producir anticuerpos humanos mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Se describen anticuerpos humanos de manera general en van Dijk y van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20:450-459 (2008). Se pueden preparar anticuerpos humanos mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se modificó para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición a antígenos. Tales animales contienen normalmente la totalidad o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, los cuales reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena o están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente a los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, y en líneas generales, los locus de inmunoglobulina endógena se han inactivado. Para obtener una reseña de métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Ver también, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6,075,181 y 6,150,584, que describen la tecnología

XENOMOUSE™; la patente estadounidense N.º 5,770,429, que describe la tecnología HUMAB®; la patente estadounidense N.º 7,041,870, que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la combinación con una región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos también se pueden elaborar mediante métodos basados en hibridoma. Se describieron líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). También se describen anticuerpos humanos generados a través de la tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Otros métodos incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7,189,826 (que describe la producción de anticuerpos de IgM humana monoclonales de líneas de células de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268, (2006) (que describe hibridomas humano-humano). También se describe la tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos mediante el aislamiento a partir de colecciones de anticuerpos humanos, como se describe en la presente.

Es posible aislar los anticuerpos útiles de la invención mediante el cribado de colecciones de combinaciones en busca de anticuerpos con la actividad o las actividades deseadas. Se analizan métodos para el cribado de colecciones de combinaciones, por ejemplo, en Lerner *et al.* en *Nature Reviews* 16:498-508 (2016). Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de métodos para generar colecciones de expresión en fago y para cribar tales colecciones en búsqueda de anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Tales métodos se analizan, por ejemplo, en Frenzel *et al.* en *mAbs* 8:1177-1194 (2016); Bazan *et al.* en *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 8:1817-1828 (2012) y Zhao *et al.* en *Critical Reviews in Biotechnology* 36:276-289 (2016), así como en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y en

Marks y Bradbury en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003).

En ciertos métodos de expresión en fago, se clonan por separado repertorios de genes de VH y VL mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que luego pueden cribarse en busca de fago de unión al antígeno como se describe en Winter *et al.* en *Annual Review of Immunology* 12: 433-455 (1994). El fago expresa por lo general fragmentos de anticuerpo, o como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin que sea necesaria la construcción de hibridomas. Alternativamente, se puede clonar el repertorio indiferenciado (por ejemplo, de ser humano) para proporcionar una sola fuente de anticuerpos contra un amplio rango de no autoantígenos y también autoantígenos sin inmunización alguna, como describen Griffiths *et al.* en *EMBO Journal* 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden elaborar de manera sintética colecciones indiferenciadas al clonar segmentos de genes V sin redistribución a partir de células madre, y al usar cebadores de PCR que contienen secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr la redistribución *in vitro*, como lo describen Hoogenboom y Winter en *Journal of Molecular Biology* 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones en fago de anticuerpo humano incluyen, por ejemplo: las patentes estadounidenses N.º 5,750,373; 7,985,840; 7,785,903 y 8,679,490, así como las publicaciones de patente estadounidense N.º 2005/0079574, 2007/0117126, 2007/0237764 y 2007/0292936. Otros ejemplos de métodos conocidos en la técnica para el cribado de colecciones de combinaciones en busca de anticuerpos con una actividad o actividades deseadas incluyen la expresión de ribosomas y mRNA, así como también métodos para la expresión y selección de anticuerpos en bacterias, células de mamífero, células de insecto o células de levadura. Se analizan métodos para la expresión superficial de levadura, por ejemplo, en Scholler *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 503:135-56 (2012) y Cherf *et al.* en *Methods in Molecular biology* 1319:155-175 (2015), así como en Zhao *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 889:73-84 (2012). Se describen métodos para la expresión de ribosomas, por ejemplo, en He *et al.* en *Nucleic Acids Research* 25:5132-5134 (1997) y en Hanes *et al.* en *PNAS* 94:4937-4942 (1997).

Puede ser conveniente una modificación química adicional del inmunoconjugado de la invención. Por ejemplo, los problemas de inmunogenicidad y semivida corta se pueden mejorar mediante la conjugación con polímeros de cadena sustancialmente lineal, tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) (ver, por ejemplo, WO

87/00056).

Los inmunoconjugados preparados como se describe en la presente pueden purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores, tales como la carga neta, hidrofobicidad, hidrofiliidad, etc., y serán evidentes para las personas del oficio de nivel medio. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad, se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une el inmunoconjugado. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de IL-7 mutante. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad de inmunoconjugados de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Por ejemplo, se pueden usar cromatografía de afinidad de proteína A o G y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar un inmunoconjugado esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza del inmunoconjugado puede determinarse mediante cualquiera de una variedad de métodos analíticos conocidos, incluso electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta presión y similares.

Composiciones, formulaciones y vías de administración

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inmunoconjugado como se describe en la presente, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos que figuran más adelante. En una forma de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los inmunoconjugados proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, una composición farmacéutica comprende cualquiera de los inmunoconjugados proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

También se proporciona un método para producir un inmunoconjugado de la invención en una forma adecuada para la administración in vivo, en donde el método comprende (a) obtener un inmunoconjugado de acuerdo con la invención, y (b) formular el inmunoconjugado con al menos un portador farmacéuticamente aceptable, con lo cual una preparación del inmunoconjugado se formula para la administración in vivo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado disuelta o dispersada en un

portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no son generalmente tóxicas para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o negativa de otro tipo cuando se las administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. Las personas del oficio de nivel medio conocerán la preparación de una composición farmacéutica que contiene un inmunoconjugado y opcionalmente un ingrediente activo adicional a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. Mack Printing Company, 1990, que se incorpora en la presente por referencia. Además, para la administración en animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA o las autoridades correspondientes en otros países. Las composiciones preferidas son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquier solventes, amortiguadores, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes, antioxidantes, proteínas, fármacos, estabilizadores de fármacos, polímeros, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes endulzantes, agentes saborizantes, tintes, materiales similares y combinaciones de estos, como conocería una persona del oficio de nivel medio (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. Mack Printing Company, 1990, páginas 1289-1329, que se incorpora en la presente por referencia). Excepto en el caso de que un portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Un inmunoconjugado de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea, para el tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración de dosis puede llevarse a cabo mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo que depende, en parte, de si la administración es breve o crónica.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para la administración

mediante inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, los inmunoconjugados de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en amortiguadores compatibles desde el punto de vista fisiológico, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o amortiguador de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los inmunoconjugados pueden estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de los inmunoconjugados de la invención en la cantidad necesaria en el solvente adecuado con una variedad de los demás ingredientes mencionados a continuación, según sea necesario. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de un medio líquido previamente esterilizado mediante filtración de este. El medio líquido debe amortiguarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe primero volverse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de elaboración y almacenamiento, y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse mínimamente en un nivel seguro, por ejemplo, menor de 0.5 ng/mg de proteína. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros: amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes

quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener compuestos que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones para inyección oleosa adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleatos de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed. Mack Printing Company, 1990). Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En formas de realización particulares, se puede generar una absorción prolongada de una composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de estos.

Además de las composiciones descritas anteriormente, los inmunoconjugados también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los inmunoconjugados pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los inmunoconjugados de la invención pueden elaborarse mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional con el uso de uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Los inmunoconjugados se pueden formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutra, o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o base libre. Estas incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición de proteínas, o las formadas con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio o calcio o férrico; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

Métodos y composiciones terapéuticos

Se puede usar cualquiera de los polipéptidos de IL-7 mutante e inmunoconjugados proporcionados en la presente en métodos terapéuticos. Los inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención pueden usarse como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres.

Para su uso en métodos terapéuticos, los inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención se formularían, dosificarían y administrarían de una forma conforme a una buena práctica médica. Los factores que se han de considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos.

Los inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención pueden ser

particularmente útiles para tratar estados patológicos en donde la estimulación del sistema inmunitario del huésped es beneficiosa, en particular afecciones en donde es conveniente una respuesta inmunitaria celular mejorada. Estos pueden incluir estados patológicos en donde la respuesta inmunitaria del huésped es insuficiente o deficiente. Los estados patológicos para los que se pueden administrar los inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención comprenden, por ejemplo, un tumor o una infección en donde una respuesta inmunitaria celular sería un mecanismo crítico para la inmunidad específica. Los inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención se pueden administrar per se o en cualquier composición farmacéutica adecuada.

En un aspecto, se proporcionan inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención para su uso como un medicamento. En aspectos adicionales, se proporcionan inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En ciertas formas de realización, se proporcionan inmunoconjugados y polipéptidos de IL-7 mutante de la invención para su uso en un método de tratamiento. En una forma de realización, la invención proporciona un inmunoconjugado como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una forma de realización, la invención proporciona un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un inmunoconjugado y una IL-7 mutante para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del inmunoconjugado. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. En formas de realización adicionales, la invención proporciona un inmunoconjugado para su uso en la estimulación del sistema inmunitario. En ciertas formas de realización, la invención proporciona un inmunoconjugado y/o una IL-7 mutante para su uso en un método de estimulación del sistema inmunitario en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del inmunoconjugado para estimular el sistema inmunitario. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" es un mamífero, preferentemente un ser humano. "Estimulación del sistema inmunitario" de

acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incluir cualquiera de uno o más de un aumento general en la función inmunitaria, un aumento en la función de los linfocitos T, un aumento en la función de los linfocitos B, una restauración de la función de los linfocitos, un aumento en la expresión de los receptores de IL-2, un aumento en el grado de respuesta de los linfocitos T, un aumento en la actividad de las células natural killer o la actividad de células killer activadas por linfocina (LAK) y similares.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una IL-7 mutante y/o un inmunoconjugado de la invención en la elaboración o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad en un individuo que lo necesite. En una forma de realización, el medicamento es para su uso en un método para tratar una enfermedad que comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz del medicamento. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En una forma de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. En una forma de realización adicional, el medicamento es para estimular el sistema inmunitario. En una forma de realización adicional, el medicamento es para su uso en un método para estimular el sistema inmunitario en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del medicamento para estimular el sistema inmunitario. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano. "Estimulación del sistema inmunitario" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incluir cualquiera de uno o más de un aumento general en la función inmunitaria, un aumento en la función de los linfocitos T, un aumento en la función de los linfocitos B, una restauración de la función de los linfocitos, un aumento en la expresión de los receptores de IL-2, un aumento en el grado de respuesta de los linfocitos T, un aumento en la actividad de las células natural killer o la actividad de células killer activadas por linfocina (LAK) y similares.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad en un individuo. En una forma de realización, el método comprende administrar a un individuo que tiene tal enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de una IL-7 mutante y/o un inmunoconjugado de la invención. En una forma de realización, se administra una composición a dicho individuo, que comprende la IL-7

mutante y/o el inmunoconjugado de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable. En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo. En una forma de realización particular, la enfermedad es cáncer. En ciertas formas de realización, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente antineoplásico si la enfermedad a tratar es cáncer. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para estimular el sistema inmunitario en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una IL-7 mutante y/o un inmunoconjugado para estimular el sistema inmunitario. De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, un "individuo" puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano. "Estimulación del sistema inmunitario" de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores puede incluir cualquiera de uno o más de un aumento general en la función inmunitaria, un aumento en la función de los linfocitos T, un aumento en la función de los linfocitos B, una restauración de la función de los linfocitos, un aumento en la expresión de los receptores de IL-2, un aumento en el grado de respuesta de los linfocitos T, un aumento en la actividad de las células natural killer o la actividad de células killer activadas por linfocina (LAK) y similares.

En ciertas formas de realización, la enfermedad a tratar es un trastorno proliferativo, particularmente cáncer. Los ejemplos no limitativos de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer hematológico, cáncer de piel, carcinoma de células escamosas, cáncer de hueso y cáncer de riñón. Otros trastornos de proliferación celular que pueden tratarse con un inmunoconjugado de la presente invención incluyen, entre otros, neoplasias ubicadas en el: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, región torácica y sistema genitourinario. También se incluyen lesiones o afecciones precancerosas y metástasis de cáncer. En ciertas formas de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata y cáncer de vejiga. Una persona del oficio de nivel medio reconoce fácilmente que, en muchos casos, los inmunoconjugados pueden no proporcionar una

cura sino tan solo un beneficio parcial. En algunas formas de realización, un cambio fisiológico que genere algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una cantidad de inmunoconjugado que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz". El sujeto, paciente o individuo que necesita tratamiento es por lo general un mamífero, más específicamente un ser humano.

En algunas formas de realización, una cantidad eficaz de un inmunoconjugado de la invención se administra a una célula. En otras formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado de la invención se administra a un individuo para el tratamiento de la enfermedad.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada de un inmunoconjugado de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la vía de administración, el peso corporal del paciente, el tipo de molécula (por ejemplo, que comprende o no un dominio Fc), la gravedad y el curso de la enfermedad, si el inmunoconjugado se administra con fines preventivos o terapéuticos, las intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, los antecedentes médicos del paciente y la respuesta al inmunoconjugado, así como el criterio del médico a cargo. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de los ingredientes activos en una composición y las dosis adecuadas para el sujeto individual. En la presente se contemplan diversos cronogramas de dosis, que incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples a lo largo de diversos puntos temporales, administración de bolo e infusión en pulsos.

El inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente en un momento o a lo largo de una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1 mg/kg - 10 mg/kg) de inmunoconjugado puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría variar de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, según la afección, el tratamiento se sostendría por lo general hasta que se produzca una inhibición deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del inmunoconjugado estaría en el rango de alrededor de 0.005 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg . En otros ejemplos no

limitativos, una dosis también puede comprender de alrededor de 1 microgramo/kg/peso corporal, alrededor de 5 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 10 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 50 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 100 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 200 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 350 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 500 microgramos/kg/peso corporal, alrededor de 1 miligramo/kg/peso corporal, alrededor de 5 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 10 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 50 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 100 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 200 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 350 miligramos/kg/peso corporal, alrededor de 500 miligramos/kg/peso corporal, a alrededor de 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier rango derivable de estos. En los ejemplos no limitativos de un rango derivable de los números enumerados en la presente, se puede administrar un rango de alrededor de 5 mg/kg/peso corporal a alrededor de 100 mg/kg/peso corporal, de alrededor de 5 microgramos/kg/peso corporal a alrededor de 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., en función de los números descritos anteriormente. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de alrededor de 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Tales dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, una vez a la semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del inmunoconjugado). Se puede administrar una dosis inicial de carga más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. Es posible monitorear fácilmente el progreso de este tratamiento mediante ensayos y técnicas convencionales.

Los inmunoconjugados de la invención se usarán por lo general en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. Para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, los inmunoconjugados de la invención, o las composiciones farmacéuticas de estos, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Las personas del oficio de nivel medio saben determinar una cantidad terapéuticamente eficaz, especialmente a la luz de la divulgación detallada que se proporciona en la presente.

Para una administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*, tales como ensayos de cultivo celular. Luego, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante que incluya la IC₅₀ determinada en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres

humanos.

Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, mediante técnicas conocidas en la técnica. Una persona del oficio de nivel medio podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos en función de los datos de animales.

La cantidad y el intervalo de dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de los inmunoconjugados que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosis para paciente habituales para la administración mediante inyección varían de alrededor de 0.1 a 50 mg/kg/día, por lo general de alrededor de 0.5 a 1 mg/kg/día. Los niveles en plasma terapéuticamente eficaces pueden alcanzarse al administrar múltiples dosis por día. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC.

En los casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz de los inmunoconjugados puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Una persona del oficio de nivel medio será capaz de optimizar las dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación indebida.

Una dosis terapéuticamente eficaz de los inmunoconjugados descritos en la presente proporcionará por lo general un beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad y la eficacia terapéutica de un inmunoconjugado puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivo celular o animales experimentales. Se pueden usar ensayos de cultivo celular y estudios en animales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para 50% de una población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de una población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los inmunoconjugados que exhiben índices terapéuticos altos. En una forma de realización, el inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención exhibe un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosis adecuadas para su uso en seres humanos. La dosis está preferentemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o nula toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango en función de diversos factores, por ejemplo, la forma de dosis empleada, la vía de administración utilizada, el estado del sujeto y similares. El médico puede seleccionar la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en

vista de la afección del paciente. (Ver, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, cap. 1, página 1, incorporado en la presente por referencia en su totalidad).

El médico a cargo de pacientes tratados con inmunoconjugados de la invención sabría cómo y cuándo finalizar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad, disfunción orgánica y similares. Por el contrario, el médico a cargo también sabría cómo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuese adecuada (sin generar toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el manejo del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se ha de tratar, la vía de administración y similares. Por ejemplo, la gravedad de la afección puede evaluarse, en parte, mediante métodos estándar de evaluación diagnóstica. Además, la dosis y quizás la frecuencia de la dosis también variarán en función de la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual.

La dosis terapéutica máxima de un inmunoconjugado que comprende un polipéptido de IL-7 mutante como se describe en la presente puede aumentarse respecto de aquellas utilizadas para un inmunoconjugado que comprende IL-7 de tipo silvestre.

Otros agentes y tratamientos

Los inmunoconjugados de acuerdo con la invención pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes en el tratamiento. Por ejemplo, un inmunoconjugado de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión "agente terapéutico" abarca cualquier agente administrado para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite tal tratamiento. Tal agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la afección particular que se trata, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico, un activador de la apoptosis celular o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a los inductores apoptóticos. En una forma de realización particular, el agente terapéutico adicional es un agente antineoplásico, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de la topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de la quinasa, un antagonista del receptor, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente

antiangiogénico.

Tales otros agentes están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad utilizada de inmunoconjugado, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Los inmunoconjugados se usan por lo general en las mismas dosis y con las vías de administración descritas en la presente, o de alrededor de 1 a 99% de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía que se determine adecuada de manera empírica/clínica.

Tales tratamientos conjuntos indicados anteriormente abarcan la administración conjunta (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del inmunoconjugado de la invención puede ocurrir antes de, simultáneamente con y/o después de la administración del adyuvante y/o agente terapéutico adicional. Los inmunoconjugados de la invención también pueden usarse en combinación con radioterapia.

Artículos de elaboración

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de elaboración que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de elaboración comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz, por sí misma o en combinación con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección determinada. Además, el artículo de elaboración puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende un inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de algún otro modo. El artículo de elaboración en esta

forma de realización de la invención también puede comprender un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. Alternativa o adicionalmente, el artículo de elaboración también puede comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el p comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Secuencias de aminoácidos

	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
HVR-H1 mínima de PD-1	SSYT	1
HVR-H2 mínima de PD-1	SGGGRDIY	2
HVR-H3 mínima de PD-1	GRVYF	3
HVR-L1 mínima de PD-1	TSDNSF	4
HVR-L2 mínima de PD-1	RSSTLES	5
HVR-L3 mínima de PD-1	NYDVPW	6
fragmento de FR-H3 (RDN en las posiciones de Kabat 71-73)	RDN	7
HVR-H1 de PD-1	GFSFSSY	8
HVR-H2 de PD-1	GGR	9
HVR-H3 de PD-1	TGRVYFALD	10
HVR-L1 de PD-1	SESVDTSNSF	11
HVR-L2 de PD-1	RSS	12
HVR-L3 de PD-1	NYDVPW	13
VH de PD-1 (1, 2, 3, 4)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVL LTGRVYFALDSWGQGTLVTVSS	14

VL de PD-1 (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSD NSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNYDVP WTFGQGTKVEIK	15
VL de PD-1 (2)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESVDTSD NSFIHWYQQRPQGQSPRLLIYRSSTLESGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQNYDV PWTFGQGTKVEIK	16
VL de PD-1 (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSN SFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQNYDVPWT FGQGTKVEIK	17
VL de PD-1 (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSN SFIHWYQQKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQNYDVPWT FGQGTKVEIK	18
Ligador	GGGGS GGGGS GGGG	19
Ligador alternativo	GGGGS GGGGS GGGGS	20
hPD-1 (sin secuencia de señal)	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATF TCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFE DRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARR NDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRA EVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLLGSV LLVWVLAVICSR AARGTIGARRTGQPLKEDPSA VPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTE YATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRP EDGHCSWPL	21
hPD-1 (con secuencia de señal)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRP WNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAIS LAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR PAGQFQTLVVGVGGLLGSVLLVWVLAVICSR AARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELD FQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGT SPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	22
Dominio Fc de IgG1 humana	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	23

Dominio CL kappa humano	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	24
Dominio CL lambda humano	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS	25
Región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (CH1-CH2-CH3)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS P	26
Dominio extracelular (ECD) de hPD-1	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATF TCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFE DRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARR NDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRA EVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV	27

Secuencias de aminoácidos de IL-7

	Modificac ión	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
IL7 humana de tipo silvestre	-	DCDIEGKDGGKQYESVLMVSIQQLLDISMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLN CTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKE QKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKHEH	28
IL7-VAR21 completamente glucosilada	G85E	DCDIEGKDGGKQYESVLMVSIQQLLDISMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEETTILLN CTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKE QKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKHEH	29

IL7-VAR21 parcialmente glucosilada	G85E, T93A, S118A	DCDIEGKDGGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEETTILLN CAGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKALK EQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH	30
IL7-VAR18/VAR21 completamente glucosilada	K81E, G85E	DCDIEGKDGGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLLEVSEETTILLN CTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKE QKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH	31
IL-7- VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada	K81E, G85E, T93A, S118A	DCDIEGKDGGKQYESVLMVMSIDQLLDSMKEI GSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLLEVSEETTILLN CAGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKALK EQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH	32
Cadena A		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDT SDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	33
Cadena H (VAR21 completamente glucosilada, VAR21 parcialmente glucosilada, VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada, moléculas de referencia 9-10) C2184230856		EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	34

Cadena H (PD1-IL7wt, PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada, moléculas de referencia 5-8) C01483382		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	35
Cadena K de PD1-IL7-wt	-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGGSGGGGSGGGGSDCDIEGKD GK QYESVLMVSI DQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRK PAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCF LKRLLEIKTCWNKILMGTKEH	36

Cadena K de PD1-IL7-VAR21 completamente glucosilada	G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQ YESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLLKVSEETTILLNCTGQVKGRKPA LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKR LLQEIKTCWNKILMGTKEH	37
Cadena K de PD1-IL7-VAR21 parcialmente glucosilada	G85E, T93A, S118A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQ YESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLLKVSEETTILLNCAGQVKGRKPA ALGEAQPTKSLEENKALKEQKKLNDLCFLK RLLQEIKTCWNKILMGTKEH	38

Cadena K de PD1-IL7-VAR18/VAR21 completamente glucosilada	K81E, G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQ YESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLLLEVSEETTILLNCTGQVKGRKPA LGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKR LLQEIKTCWNKILMGTKEH	39
Cadena K de PD1-IL7-VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada	K81E, G85E, T93A, S118A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKDGKQ YESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLLLEVSEETTILLNCAGQVKGRKPA ALGEAQPTKSLEENKALKEQKKLNDLCFLK RLLQEIKTCWNKILMGTKEH	40

Cadena K de molécula de referencia 5	D74E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGSDCDIEGKD GK QYESVLMV/SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGEFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKP AALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFL KRLLEIKTCWNKILMGTKEH	41
Cadena K de molécula de referencia 6	SS2 (C2S/C1 41S, C47S/C9 2S)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGSDSDIEGKD GK QYESVLMV/SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHISDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGDFDLHLLKVSEGTTILLNSTGQVKGRKP AALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFL KRLLEIKTSWNKILMGTKEH	42

Cadena K de molécula de referencia 7	SS3 (C47S/C92S, C34S/C129S)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGSDCDIEGKD GK QYESVLMV SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHISDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGDFDLHLLKVSEGTTILLNSTGQVKGRKP AALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLSFL KRLLQEIKTCWNKILMGTKEH	43
Cadena K de molécula de referencia 8	W142H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGSDCDIEGKD GK QYESVLMV SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRK PAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCF LKRLLEIKTCHNKILMGTKEH	44

Cadena K de molécula de referencia 9	D74N	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKD GKQY ESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTG NFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAAL GEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH	45
Cadena K de molécula de referencia 10	D74N, K81E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKD GKQY ESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTG NFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAAL GEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRL LQEIKTCWNKILMGTKEH	46

Cadena K de PD1-IL7-VAR18/VAR21 completamente glucosilada (ligador SEQ ID NO: 20)	K81E, G85E	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGGSGGGGSGGGGSDCDIEGKDGK QYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFN FFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMN STGDFDLHLLLEVSEETTILLNCTGQVKGRKP AALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFL KRLLQEIKTCWNKILMGTKEH	47
Cadena A - Figura 1A		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDT SDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	48
Cadena H - Figura 1A		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	49

Cadena K de PD1-IL7-wt - Figura 1A		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SSYTMWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDI YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGGGGGSGGGGSGGGGDCDIEGKDQKQ YESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNST GDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPA ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLK RLLQEIKTCWNKILMGTKEH	50
------------------------------------	--	---	----

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Cabe destacar que se pueden poner en práctica diversas otras formas de realización de acuerdo con la descripción general proporcionada anteriormente.

Un formato de ejemplo de un inmunoconjugado de acuerdo con la invención se muestra como representaciones esquemáticas en la Figura 1. El inmunoconjugado IgG-IL7 comprende dos dominios Fab (dominio variable, dominio constante), un dominio Fc heterodimérico y un polipéptido de IL-7 mutante fusionado con un extremo C del dominio Fc. El inmunoconjugado IgG-IL7 está compuesto por polipéptidos de secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 50.

Las secuencias proporcionadas para los formatos de ejemplo se refieren a inmunoconjugados con secuencias de IL-7 de tipo silvestre. Sin embargo, cualquier polipéptido de IL-7 mutante como se divulga en la presente puede incorporarse en dichos formatos en lugar de una IL-7 de tipo silvestre.

Ejemplo 1

Ejemplo 1.1 Producción y análisis de proteínas de fusión de PD1-IL7v

Los constructos de fusión de variantes de anticuerpo IL7 (IL7v), como en la Tabla 1, se producen en células CHO. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. El análisis del producto final consiste en la determinación del contenido de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica) y el porcentaje del pico principal (determinado mediante electroforesis capilar SDS no reducida: CE-SDS).

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de proteínas de fusión de PD1-IL7 evaluadas

Descripción	Variante de IL7	ID	SEQ NO	ID
PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada	G85E	P1AG3724	33, 34, 37	
PD1-IL7 VAR21 parcialmente glucosilada	G85E, T93A, S118A	P1AG3725	33, 34, 38	
PD1-IL7 VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada	K81E, G85E, T93A, S118A	P1AG3727	33, 34, 40	

Producción de proteínas similares a IgG en células CHO. Algunos de los constructos de fusión de anticuerpo IL7 descritos en la presente se produjeron mediante el uso de cultivos en matraz de agitación o mediante el uso de un proceso de fermentación alimentado por lotes. La producción recombinante de cultivos en matraz de agitación se realizó mediante transfección transitoria de células ExpiCHO-S™ en un medio definido y libre de suero. Para la producción de constructos de fusión de variante de anticuerpo IL7, las células se cotransfectaron con plásmidos que contienen las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina respectivas. Para la transfección, se usó ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (gibco). Se recolectaron sobrenadantes de cultivos celulares a los 10-12 días después de la transfección. Para la fermentación alimentada por lotes, se usó un sistema de vectores patentados para la expresión de proteínas estables en células CHO K1 adaptadas a suspensión. Las proteínas se

expresaron en grupos de células transfectadas durante un proceso de fermentación alimentado por lotes en minibiorreactores automatizados mediante el uso de alimentaciones y medios de cultivo celular definidos químicamente y patentados de Roche. Los sobrenadantes celulares se recolectaron mediante centrifugación y filtración posterior (filtro de 0.2 μm).

Purificación de proteínas similares a IgG. Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares filtrados de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: PBS pH 7.4; amortiguador de elución: acetato de sodio 100 mM, pH 3.0). La elución se logró a pH 3.0 seguida de la neutralización inmediata del pH de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15; N.º de art.: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM a pH 6.0.

Análisis de proteínas similares a IgG. Las concentraciones de las proteínas purificadas se determinaron mediante la medición de la absorción a 280 nm con el uso del coeficiente de extinción en masa calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor con un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido de agregados se realizó mediante cromatografía HPLC mediante el uso de una columna analítica de exclusión por tamaño (BioSuite High Resolution) equilibrada en amortiguador de corrida 25 (KH_2PO_4 200 mM, KCl 250 mM pH 6.2).

Tabla 2: Pico del producto de monómero determinado mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica y pico del producto principal determinado mediante CE-SDS no reducida.

Variante de PD1-IL7	ID de lote	Pico de monómero (%)	Pico principal (%)
PD1-IL7_VAR21 (completamente glucosilada)	P1AG3724-183	85.8	79.1
	P1AG3724-083	97.7	99.1

PD1-IL7_VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3725-153	90.7	81.6
	P1AG3725-083	98.7	99.2
PD1-IL7_VAR18/VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3727-155	94.9	71.9
	P1AG3727-083	97.2	99.1

Resultados. Los constructos de variantes de PD1-IL7 se purificaron mediante cromatografía de proteína A y exclusión por tamaño. El análisis de calidad del material purificado reveló que el contenido de monómero estaba por encima de 85% según lo medido mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Tabla 2). El pico de producto principal fue >70% mediante electroforesis capilar no reducida (Tabla 2). En conclusión, todas las variantes de PD1-IL7 se produjeron con buena calidad.

Ejemplo 1.2 Producción y análisis de proteínas de fusión de PD1-IL7v adicionales (moléculas de referencia 5, 7 y 8)

Los constructos de fusión de variantes de anticuerpo IL7 descritos en la Tabla 3 se produjeron en células CHO. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. El análisis del producto final consiste en la determinación del contenido de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica) y el porcentaje del pico principal (determinado mediante electroforesis capilar SDS no reducida: CE-SDS). Las moléculas de referencia 5, 7 y 8 comprenden porciones de IL7, como se divulga en WO 2020/127377 A1. Son del mismo formato que otros constructos de fusión divulgados en la presente que comprenden una porción de IL7 fusionada con el extremo N del anticuerpo contra PD-1 (Figura 1).

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de proteínas de fusión de PD1-IL7 evaluadas

Descripción	Variante de IL7	ID	SEQ ID NO
Molécula de referencia 5	D74E	P1AF9647-027	33, 35, 41
Molécula de	SS3 (C47S/C92S,	P1AF9649-012	33, 35, 43

referencia 7	C34S/C129S)		
Molécula de referencia 8	W124H	P1AF9650-004	33, 35, 44

Clonación. Los cADN correspondientes se clonaron en el sistema de vector de evitria con técnicas de clonación convencionales (sin PCR). Los plásmidos de vector de evitria se sintetizaron mediante síntesis génica. Se preparó ADN de plásmido en condiciones de baja endotoxina en función de cromatografía de intercambio aniónico. Se determinó la concentración de ADN al medir la absorción a una longitud de onda de 260 nm. La exactitud de las secuencias se verificó mediante secuenciación de Sanger (con dos reacciones de secuenciación por plásmido).

Producción de proteínas similares a IgG en células CHO. Los constructos de fusión de anticuerpo IL7 descritos en la presente se produjeron por Evitria mediante el uso del sistema de vectores patentado con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y mediante el uso de células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó sus medios patentados, libres de componentes animales y libres de suero (eviGrow y eviMake2) y su reactivo de transfección patentado (eviFect). Los sobrenadantes celulares se recolectaron mediante centrifugación y filtración posterior (filtro de 0.2 μ m).

Purificación de proteínas similares a IgG. Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares filtrados de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: citrato de sodio 20 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 7.5; amortiguador de elución: citrato de sodio 20 mM, pH 3.0). La elución se logró a pH 3.0 seguida de la neutralización inmediata del pH de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15; N.º de art.: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0.

Análisis de proteínas similares a IgG. Las concentraciones de las proteínas purificadas se determinaron mediante la medición de la absorción a 280 nm con el uso del coeficiente de extinción en masa calculado sobre la base de la secuencia de

aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor con un LabChipGXII o LabChip GX Touch (Perkin Elmer). La determinación del contenido de agregados se realizó mediante cromatografía HPLC a 25°C mediante el uso de una columna analítica de exclusión por tamaño (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (KH_2PO_4 200 mM, KCl 250 mM pH 6.2, 0.02% de NaN_3).

Tabla 4: Pico de producto de monómero, subproductos de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) determinados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica.

Variante de PD1-IL7	ID	Pico de monómero (%)	Pico de HMW (%)	Pico de LMW (%)
Molécula de referencia 5	P1AF9647-027	97	1.9	1
Molécula de referencia 7	P1AF9649-012	94.1	1.9	4
Molécula de referencia 8	P1AF9650-004	99.1	0.9	0

Tabla 5: Pico del producto principal determinado mediante CE-SDS no reducida.

Variante de PD1-IL7	ID	Pico principal (%)
Molécula de referencia 5	P1AF9647-027	99.11
Molécula de referencia 7	P1AF9649-012	91.7
Molécula de referencia 8	P1AF9650-004	94.54

Resultados. Los constructos de variantes de PD1-IL7 purificados se purificaron mediante cromatografía de proteína A y exclusión por tamaño. La molécula de referencia 7 se desglucosiló con PNGaseF antes del análisis de CE-SDS para obtener un pico homogéneo. El análisis de calidad del material purificado reveló que el contenido de monómero estaba por encima de 94% mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Tabla 4) y que el pico de producto principal estaba entre 91% y 99% mediante electroforesis capilar no reducida (Tabla 5). En conclusión, todas las variantes de PD1-IL7 se produjeron con buena calidad.

Ejemplo 1.3 Producción y análisis de proteínas de fusión de PD1-IL7v adicionales (PD1-IL7wt, moléculas de referencia 6, 9 y 10)

Los constructos de fusión de variantes de anticuerpo IL7 descritos en la Tabla 6 se produjeron en células CHO. Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. El análisis del producto final consiste en la determinación del contenido de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica) y el porcentaje del pico principal (determinado mediante electroforesis capilar SDS no reducida: CE-SDS). La molécula de referencia 6 comprende una porción de IL7 como se divulga en WO 2020/127377 A1. Las moléculas de referencia 9 y 10 comprenden porciones de IL7 como se divulga en WO 2020/236655 A1. Son del mismo formato que otros constructos de fusión divulgados en la presente que comprenden una porción de IL7 fusionada con el anticuerpo contra PD-1 (Figura 1).

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de polipéptidos de proteínas de fusión de PD1-IL7 evaluadas.

Descripción	Variante de IL7	ID	SEQ ID NO
PD1-IL7wt	-	P1AF5572-018	33, 35, 36
PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada	K81E, G85E	P1AG0950-001	33, 35, 47
Molécula de referencia 6	SS2 (C2S/C141S, C47S/C92S)	P1AF9648-033	33, 35, 42
Molécula de referencia 9	D74N	P1AG8273-001	33, 35, 45
Molécula de referencia 10	D74N/K81E	P1AG8275-001	33, 35, 46

Clonación. La expresión de todos los genes está bajo el control de un promotor de CMV humano.

Producción de proteínas similares a IgG en células CHO K1. Los anticuerpos descritos en la presente se prepararon por WuXi Biologics mediante el uso del sistema de vectores patentado con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y mediante el uso de células CHO K1 adaptadas a suspensión. Para la producción, WuXi Biologics usó medios definidos químicamente disponibles en el comercio y cultivó las

células después de la transfección en las siguientes condiciones: 36.5°C + 6% de dióxido de carbono.

Los sobrenadantes se recolectaron mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0.2 µm), y las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante recolectado mediante métodos estándar.

Determinación del título (PA-HPLC). La cuantificación de los constructos que contienen Fc en los sobrenadantes se realizó mediante HPLC de proteína A en un sistema de HPLC Agilent con detector de UV. Los sobrenadantes se inyectan en POROS 20 A (Applied Biosystems). El área de pico eluida a 280 nm se integra y se convierte en concentración mediante el uso de una curva de calibración generada con estándares analizados en la misma ejecución.

Purificación de proteínas similares a IgG. Las proteínas se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares filtrados de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivos celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A. La elución fue seguida de la neutralización inmediata del pH de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15; N.º de art.: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Äkta Pure & HiLoad 26/600 Superdex 200; ambas de Cytiva conocida formalmente como GE Healthcare) en histidina 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 6.0.

Análisis de proteínas similares a IgG. Las concentraciones de las proteínas purificadas se determinaron mediante la medición de la absorción a 280 nm (Little Lunatic, conocida formalmente como Dropsense 16; Unchained Labs) con el uso del coeficiente de extinción en masa calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411- 1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor con un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido de agregados se realizó mediante cromatografía HPLC a 25°C mediante el uso de una columna analítica de exclusión por tamaño (TSKgel G3000 SW XL).

Tabla 7: Pico de producto de monómero, subproductos de alto peso molecular (HMW) y bajo peso molecular (LMW) determinados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) analítica.

Variante de PD1-IL7	ID	Pico de monómero (%)	Pico de HMW (%)	Pico de LMW (%)
PD1-IL7wt	P1AF5572-018	99.6	0.4	0
PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada	P1AG0950-001	99	1	0
Molécula de referencia 6	P1AF9648-033	99.1	0.9	0
Molécula de referencia 9	P1AG8273-001	96.1	0.5	3.4
Molécula de referencia 10	P1AG8275-001	93.3	0.7	6

Tabla 8: Pico del producto principal determinado mediante CE-SDS no reducida.

Variante de PD1-IL7	ID	Pico principal (%)
PD1-IL7wt	P1AF5572-018	100
PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada	P1AG0950-001	99
Molécula de referencia 6	P1AF9648-033	100
Molécula de referencia 9	P1AG8273-001	95.6
Molécula de referencia 10	P1AG8275-001	93.6

Resultados. Los constructos de variantes de PD1-IL7 purificados se purificaron mediante cromatografía de proteína A y exclusión por tamaño. La molécula de referencia 9 se desglucosiló con PNGaseF antes del análisis de CE-SDS para obtener un pico homogéneo. El análisis de calidad del material purificado reveló que el contenido de monómero estaba por encima de 93% mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño analítica (Tabla 7) y que el pico de producto principal estaba entre 95% y 99% mediante electroforesis capilar no reducida (Tabla 8). En conclusión, todas las variantes de PD1-IL7 se produjeron con buena calidad.

Ejemplo 1.4 Análisis del patrón de N-glucano mediante etiquetado de 2-AB de oligosacáridos liberados y cromatografía HILIC

Tabla 9: Configuración del análisis

Instrumentación	Dionex Ultimate 3000 equipado con un detector de fluorescencia (FLD), un calentador de columna y un muestreador automático con capacidad de refrigeración
Columna	Waters Acquity BEH Glycan Column, 2.1 x 150 mm, 1.7 µm)
Dispositivos adicionales	NanoSep® Centrifugal Devices 10 K Omega (Pall Life Science) Cartuchos de diol HyperSep-96 (60300-635, Thermo Scientific) o cartuchos GlycoClean TM S-plus, Glyko N.º: GC210 (365) Estación de limpieza, código de producto: Glyko GC100 (conectado a una fuente de vacío) (tapones de sellado incluidos)
Reactivos	N-glucosidasa F (PNGase F) (Roche) (sin glicerol, N.º 11 365 185 001) Amortiguador de digestión (formato de amonio 10 mM pH 8.6) Signal 2-AB-plus Labelling Kit, Prozyme GKK-804 Tripsina (grado de secuenciación modificado), Prozyme V511B Amortiguador de resuspensión (Trypsin) suministrado con V511B

Tabla 10: Muestras analizadas con respecto a sus N-glucanos unidos a la parte de Fc del anticuerpo contra PD1 y la porción de IL7

Variante de PD1-IL7	ID	Conc. [g/L]
PD1-IL7-VAR21 (G85E) (completamente glucosilada)	P1AG3724-183	1.25
PD1-IL7-VAR21 (G85E) (completamente glucosilada)	P1AG3724-083	1.38
PD1-IL7-VAR21 (G85E) (parcialmente glucosilada)	P1AG3725-153	2.14
PD1-IL7-VAR21 (G85E) (parcialmente glucosilada)	P1AG3725-083	1.54
PD1-IL7-VAR18/VAR21 (K81E, G85E) (parcialmente glucosilada)	P1AG3727-155	1.82
PD1-IL7-VAR18/VAR21 (K81E, G85E) (parcialmente glucosilada)	P1AG3727-083	1.14

Se vertieron 200 µg de cada muestra en NanoSep® Centrifugal Devices 10 K. El intercambio de amortiguador con el amortiguador de digestión (formato de amonio 10 mM pH 8.6) se realizó mediante centrifugación 3x hasta que estuvo casi seco y se volvió a llenar con 350 µL. Después de la etapa de centrifugación final, se agregaron 48 µL de amortiguador de digestión, 2 µL de N-glucosidasa F (PNGase F, sin glicerol, Roche, N.º de cat. 11 365 185 001) y 20 µL de solución de tripsina (1.0 mg/mL de amortiguador de resuspensión, Prozyme V511B) y se incubaron en la unidad NanoSep a 37°C durante 16-18 horas (durante la noche). Los oligosacáridos ligados a N liberados de la parte de Fc y la porción de IL7 se recolectaron de la unidad NanoSep y se colocaron en tubos con tapa de rosca Eppendorf de 1.5 mL mediante centrifugación por flujo continuo. El etiquetado de 2-AB de los N-glucanos liberados se realizó con Signal 2-AB-plus Labelling Kit (Prozyme GKK-804) de acuerdo con las instrucciones del proveedor (nota: la reacción debe ocurrir en la oscuridad). Para la limpieza de los N-glucanos etiquetados con 2-Ab, se prepararon cartuchos de diol HyperSep-96 al equilibrarlos con 1 mL de agua, seguido de 1 mL de 96% (v/v) de acetonitrilo en una estación de limpieza Glyko mediante la aplicación de vacío (las cavidades no usadas se bloquearon con tiras de tapones de sellado). Las muestras de N-glucano etiquetado con 2-AB se mezclaron con 1 mL de 96% (v/v) de acetonitrilo y se cargaron en los cartuchos de diol HyperSep-96 equilibrados, y se aplicó un vacío muy bajo. El cartucho se lavó con 3 x 0.75 ml de 96% (v/v) de acetonitrilo y las muestras se transfirieron de los cartuchos de diol HyperSep-96 a los dispositivos de centrifugación de 2 ml. Se agregaron 100 µL de 20% (v/v) de agua/acetonitrilo y se dejó que la penetración durara ~ 2-3 minutos. Los glucanos se eluyeron mediante centrifugación por flujo continuo (~ 2 min a 5000 rcf) (o mediante vacío en la estación de limpieza Glyko) y se diluyeron 1:1 con 96% (v/v) de acetonitrilo para el análisis cromatográfico. Se cargaron 10 µL de cada muestra de oligosacáridos en la columna de glucano HILIC-BEH para la separación mediante la aplicación de los siguientes parámetros cromatográficos:

Temperatura de la columna: 60°C

Sistema de eluyentes: Eluyente A: formato de amonio 100 mM pH 4.5

Eluyente B: 100% de acetonitrilo - amortiguador A

Temperatura del muestreador automático: 10°C

Detección (Dionex-UPLC): Fluorescencia (λ_{ex} =330 nm; λ_{em} =420 nm)

Sensibilidad: 6

Velocidad de recolección de datos: 5.00 Hz

Tiempo de respuesta: 2

Gradiente:

Tiempo [min]	Flujo [mL/min]	Eluyente A [%]	Eluyente B [%]
0	0.5	25	75
50	0.5	46	54
51	0.25	100	0
55	0.25	100	0
56	0.25	25	75
56.1	0.5	25	75
65	0.5	25	75

Resultados. Las variantes de PD1-IL7 se generaron como una versión completamente glucosilada (PD1-IL7-VAR21 completamente glucosilada [P1AG3724]) que contiene todos los secuencias de N-glucosilación nativos (N70, N91 y N116) y como versiones parcialmente glucosiladas (PD1-IL7-VAR21 parcialmente glucosilada [P1AG3725] y PD1-IL7-VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada [P1AG3727]) que contienen solo un secuencia de N-glucosilación nativo N70 y que tiene los secuencias N91 y N116 mutados. Ambas versiones de PD1-IL7-VAR21 exhiben la misma mutación de G85E en la secuencia de aminoácidos de IL7, pero difieren en la cantidad de sitios de N-glucosilación en la secuencia de aminoácidos que potencialmente están ocupados por estructuras de glicol ligadas a N. Se identificó otra variable potencial en el sistema de

expresión mediante el uso de células CHO transfectadas de manera transitoria con vectores episomales o transformadas mediante vectores de expresión integrados de manera estable. Ambas variables pueden tener influencia en el patrón de glucosilación (Figura 2). El grado general de glucosilación está afectado por la cantidad de sitios de N-glucosilación disponibles en la parte de IL-7. La PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada con todos los sitios de N-glucosilación mostraron señales de glucano sialidado complejo más intensas que los sitios de N-glucosilación mutados (parcialmente glucosilados; Figura 2, A-C). Los tipos de estructuras de N-glucano pueden verse afectadas por el modo de expresión. Los lotes de PD1-IL7 expresados en células CHO transfectadas de manera estable mostraron cantidades significativas de N-glucanos bi, tri, tetra y pentaantenarios sialidados complejos en la parte de IL7, mientras que los lotes de expresión transitoria pueden tener solo pequeñas estructuras sialidadas complejas, pero principalmente glucanos neutros o incluso ningún glucano unido a IL7 (Figura 2 A-C en comparación con E-F). Por lo tanto, la designación "completamente glucosilada" o "parcialmente glucosilada" no necesariamente refleja el estado de glucosilación eficaz de la molécula, sino que se usa para describir la presencia de los secuencias de N-glucosilación. El grado y/o tipo de glucosilación parece no afectar las propiedades de unión de IL7 al receptor de IL7, como se muestra en los Ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 2

Ejemplo 2.1 Determinación de afinidad de las variantes de PD1-IL7 con el receptor de IL7 humana

Tabla 11: Parámetros de ejecución de SPR

Instrumentación	Biacore 8K (Cytiva)
Chip	C1 (N.º 903 y 908)
Fc1 a 8	IgG específica de Fc anti-P329G (interna de Roche)
Captura	Variantes de PD1-IL7 5 nM durante 140 s, 10 µL/min
Analito	Dilución en serie de dos veces de 2.34 a 300 nM de biotina avi de hu IL7Rα- IL2Rγ-Fc (heterodímero del ECD de las cadenas de IL7Rα e IL2Rγ fusionadas con un Fc)
Amortiguador de corrida	HBS-EP (HEPES 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, 0.005% de tensioactivo P20 (BR-1006-69, Cytiva) + 1 mg/mL de BSA
T°	25°C

Flujo	30 μ L/min
Asociación	240 s
Disociación	800 s
Regeneración	Glicina 10 mM pH 2 durante 2 x 60 s

Se realizaron experimentos de SPR en un Biacore 8K con HBS-EP + 1 mg/mL de BSA como amortiguador de corrida. El anticuerpo específico de Fc anti-P329G (interno de Roche) se inmovilizó directamente mediante acoplamiento de amina en un chip C1 (Cytiva). Los constructos de PD1-IL7 se capturaron durante 140 s a 5 nM. Se pasaron triplicados (duplicados para P1AG3727- 083) de una serie de diluciones en serie de 2 veces de 2.34 a 300 nM de heterodímero de IL7Ra-IL2Rg-Fc humano sobre el ligando a 30 μ L/min durante 240 s para registrar la fase de asociación. La fase de disociación se controló durante 800 s y se activó al cambiar de la solución de muestra a amortiguador de corrida. La superficie del chip se regeneró después de cada ciclo mediante el uso de dos inyecciones de glicina 10 mM pH 2 por 60 s. Las diferencias totales en el índice de refracción se corrigieron mediante la sustracción de la respuesta obtenida en la celda de flujo de referencia (que solo contiene IgG específica de Fc anti P329G). Las constantes de afinidad se derivaron de las constantes de velocidad cinética al ajustar a una fijación de Langmuir 1:1 mediante el *software* de evaluación Biacore (Cytiva).

Luego, se analizaron las variantes de PD1-IL7 para la unión al receptor de IL7 (Tabla 12).

Tabla 12: Descripción de las muestras analizadas para la unión al receptor de IL7.

Variantes de PD1-IL7	ID	Conc. [g/L]
PD1-IL7wt	P1AF5572-018	4.4
PD1-IL7-VAR21 (completamente glucosilada)	P1AG3724-183	1.25
PD1-IL7-VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3725-153	2.14
PD1-IL7-VAR18/VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3727-083	1.14
Molécula de referencia 5	P1AF9647-027	0.76
Molécula de referencia 6	P1AF9648-033	2.5

Molécula de referencia 7	P1AF9649-012	1.35
Molécula de referencia 8	P1AF9650-004	3.81
Molécula de referencia 9	P1AG8273-001	2.5
Molécula de referencia 10	P1AG8275-001	2.3

Nombre de muestra de analitos	ID de TAPIR	Conc. [g/L]
biotina IL7R α -IL2R γ -Fc humana	P1AF4984-007	1.43

Resultados. Se compararon las variantes de PD1-IL7 y las moléculas de referencia para la unión al receptor de IL7 humana (Tabla 13). La afinidad de las variantes de PD1-IL7 con el receptor de IL7 se determinó mediante el uso del heterodímero recombinante de los dominios extracelulares de la cadena alfa del receptor de IL7 y la cadena gamma del receptor de IL2 común fusionados con un Fc humano.

Tabla 13: Unión de variantes de PD1-IL7 al receptor de IL7 humana: constantes de afinidad determinadas mediante resonancia de plasmones superficiales a 25°C. Promedio de triplicados (duplicados para P1AG3727- 083), desviación estándar en paréntesis.

Variante de PD1-IL7	ID	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [M]
PD1-IL7wt	P1AF5572-018	7.27E+05 (2.21E+04)	2.47E-04 (1.03E-05)	3.4E-10 (1.4E-11)
PD1-IL7-VAR21 (completamente glucosilada)	P1AG3724-183	2.40E+05 (3.15E+04)	2.90E-03 (2.48E-04)	1.22E-08 (1.68E-09)
PD1-IL7-VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3725-153	2.62E+05 (3.48E+04)	5.62E-03 (2.87E-04)	2.17E-08 (2.4E-09)
PD1-IL7-VAR18/VAR21 (parcialmente glucosilada)	P1AG3727-083	1.08E+05 (2.83E+03)	1.27E-02 (0)	1.18E-07 (2.12E-09)
Molécula de referencia 5	P1AF9647-027	3.52E+05 (6.51E+03)	2.37E-04 (1.98E-05)	6.71E-10 (4.38E-11)
Molécula de referencia 6	P1AF9648-033	1.09E+05 (4.04E+03)	1.08E-03	9.94E-09 (9.24E-11)

Molécula de referencia 7	P1AF9649-012	unión muy débil		
Molécula de referencia 8	P1AF9650-004	3.86E+05 (2.51E+04)	3.27E-04 (3.30E-05)	8.47E-10 (6.66E-11)
Molécula de referencia 9	P1AG8273-001	4.56E+05 (1.96E+04)	3.16E-04 (3.08E-05)	6.96E-10 (9.33E-11)
Molécula de referencia 10	P1AG8275-001	2.26E+05 (1.59E+04)	1.10E-03 (2.25E-04)	4.94E-09 (1.29E-09)

La PD1-IL7-VAR21 completamente glucosilada y parcialmente glucosilada se une al receptor de IL7 humana con una afinidad de entre 10-20 nM y la PD1-IL7-VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada con una afinidad de alrededor de 120 nM, que es de 6 a 12 veces menor. Las moléculas de referencia 5, 8 y 9 tiene una afinidad mayor con el receptor de IL7 humana (alrededor de 0.6 a 0.9 nM) y las moléculas de referencia 6 y 10 son cercanas a PD1-IL7-VAR21 completamente y parcialmente glucosilada con afinidades de 10 y 5 nM, respectivamente. La molécula de referencia 7 difícilmente se une en estas condiciones y se considera inactiva.

Conclusión. Las mutaciones introducidas en IL7 en PD1-IL7-VAR21 completamente y parcialmente glucosilada y PD1-IL7-VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada da como resultado una afinidad reducida con el receptor de IL7 humana, en donde PD1-IL7-VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada tiene una afinidad en el rango de 6 a 12 veces menor que los constructos de PD1-IL7-VAR21.

Ejemplo 2.2 Determinación de afinidad de las variantes de PD1-IL7 con el receptor de IL7 humana

Las mediciones de afinidad mediante SPR se repitieron varias veces en diferentes fechas y los valores de KD medidos varían dentro de un cierto rango de una medición a la otra. En la Tabla 14 hay una descripción general de los diferentes valores medidos. Todas las mediciones se realizaron con la misma configuración, como se describió anteriormente en la sección de configuraciones, y solo el chip es variable (siempre un chip de tipo C1).

Tabla 14: Unión de las variantes de PD1-IL7 de los diferentes sistemas de expresión con el receptor de IL7 humana. Análisis: fecha, replicaciones e identificador de chip. Si n>1: Promedio y desviación estándar en paréntesis. Glucosilación de IL7:

contenido de N-glucosilaciones complejos sializados en la porción de Fc y/o IL-7: ++ contenido alto, + contenido medio, o contenido bajo.

Construido (nombres de muestra de moléculas capturadas)	ID	Análisis	ka [1/Ms]	kd [1/s]	KD [M]	Glucosilación de IL7	Sistema de expresión
PD1-IL7wt	P1AF5572 -018	duplicados 210307 de C1 854	4.44E+05 (7.07E+04)	3.13E-04 (5.59E-05)	7.68E-10 (3.03E-10)	+	CHO transitorias
	P1AF5572 -018	duplicados 210310 de C1 854	3.74E+05 (2.26E+04)	1.81E-04 (2.19E-05)	4.82E-10 (2.9E-11)	+	CHO transitorias
	P1AF5572 -018	duplicados 210318 de C1 854	3.89E+05 (2.97E+04)	2.18E-04 (4.67E-05)	5.67E-10 (1.63E-10)	+	CHO transitorias
	P1AF5572 -018	210909 único C1 908	5.64E+05	2.59E-04	4.59E-10	+	CHO transitorias
	P1AF5572 -018	triplicados 210922 de C1 908	7.27E+05 (2.21E+04)	2.47E-04 (1.03E-05)	3.4E-10 (1.4E-11)	+	CHO transitorias
PD1-IL7- VAR21 completamente glucosilada	P1AG3724 -183	triplicados 210817 de C1 903	2.40E+05 (3.15E+04)	2.90E-03 (2.48E-04)	1.22E-08 (1.68E-09)	++	CHO estables
	P1AG3724 -183	210909 único C1 908	1.52E+05	3.61E-03	2.37E-08	++	CHO estables
	P1AG3724 -083	210909 único C1 908	4.49E+05	2.12E-03	4.72E-09	o	CHO transitorias
PD1-IL7- VAR21 parcialmente	P1AG3725 -153	triplicados 210817 de C1 903	2.62E+05 (3.48E+04)	5.62E-03 (2.87E-04)	2.17E-08 (2.4E-09)	+	CHO estables

glucosilada	P1AG3725 -153	210909 único C1 908	5.31E+05	5.53E-03	1.04E-08	+	CHO establ es
	P1AG3725 -083	210909 único C1 908	2.72E+05	4.81E-03	1.77E-08	o	CHO transit orias
PD1-IL7- VAR18/VAR 21 parcialmente glucosilada	P1AG3727 -083	duplicados 210922 de C1 908	1.08E+05 (2.83E+03)	1.27E-02 (0)	1.18E-07 (2.12E- 09)	o	CHO transit orias
	P1AG3727 -083	210909 único C1 908	8.94E+05	1.87E-02	2.09E-07	o	CHO transit orias

Resultados. Como se describió anteriormente en el Ejemplo 1.4, el grado general de glucosilación está afectado por la cantidad de sitios de N-glucosilación disponibles en la porción de IL-7 y los tipos de estructuras de glucosilación por el modo de expresión.

A pesar de las diferencias en la glucosilación, tanto la PD1-IL7-VAR21 completamente glucosilada como la PD1-IL7-VAR21 parcialmente glucosilada muestran afinidades consistentemente comparables con IL7R en el mismo orden de magnitud (Tabla 14). Los valores de KD varían de 4.7 a 23.7 nM con un promedio de 15 nM y muestran una reducción en la afinidad en comparación con IL7 de tipo silvestre (KD 0.5 nM en promedio). El grado y/o tipo de glucosilación no afecta las propiedades de unión de IL7 al receptor de IL7.

Ejemplo 3

Ejemplo 3.1 Señalización de IL-7R (STAT5-P) en linfocitos T CD4 PD-1⁺ y PD-1⁻ activados tras el tratamiento con dosis crecientes de variantes de PD1-IL7

En el siguiente experimento, las moléculas de PD1-IL7 completamente y parcialmente glucosiladas se compararon en un ensayo de señalización de potencia de STAT5-P y direccionamiento en cis con el fin de evaluar si el patrón de glucosilación afecta la potencia de señalización de la IL-7 mutada a través del receptor de IL-7 en linfocitos T PD-1⁺ y PD-1⁻. Para este propósito, la señalización de IL7R se midió en linfocitos T CD4 PD1⁺ y PD1⁻ (tratados previamente con anti-PD1), aislados, activados y

cocultivados como se describió anteriormente, después de exponerlos a una concentración creciente de PD1-IL7 VAR21 glucosilada o parcialmente glucosilada o PD1-IL7 VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada. Para este propósito, se seleccionaron linfocitos T CD4 de PBMC de donantes sanos con microesferas de CD4 (130-045-101, Miltenyi) y se los activó durante 3 días en presencia de 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD3 unido a la placa (prerrecubierto durante la noche, clon OKT3, N.º 317315, BioLegend) y 1 µg/mL de anticuerpo anti-CD28 soluble (clon CD28.2, N.º 302923, BioLegend) para inducir la expresión de PD-1. Tres días después, las células se recolectaron y se lavaron varias veces para eliminar la IL-2 endógena. Luego, las células se dividieron en dos grupos, uno de los cuales se incubó con una concentración de saturación de anticuerpo anti-PD1 (molécula interna, 10 µg/mL) durante 30 min a RT. Después de varias etapas de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo anti-PD-1 no unido, las células anti-PD1 tratadas previamente y no tratadas (50 µL, 4×10^6 células/mL) se sembraron en una placa con fondo en forma de V antes de ser tratadas durante 12 min a 37°C con concentraciones crecientes de variantes de PD1-IL7 (50 µL, etapas de dilución 1:10 con la concentración máxima de 66 nM). Para preservar el estado de fosforilación, se agregó una cantidad igual de Phosphoflow Fix Buffer I (100 µL, 557870, BD) justo después de 12 minutos de incubación con los diversos constructos. Luego, las células se incubaron durante 30 min adicionales a 37°C antes de permeabilizarlas durante la noche a 80°C con Phosphoflow PermBuffer III (558050, BD). Al día siguiente, se tiñó STAT-5 en su forma fosforilada durante 30 min a 4°C mediante el uso de un anticuerpo anti-STAT-5P (clon 47/Stat5(pY694), 562076, BD). Las células se adquirieron en el FACS BD-LSR Fortessa (BD Bioscience). La frecuencia de STAT-5P se determinó con FlowJo (V10) y se graficó con GraphPad Prism.

Los datos en las Figuras 3A y 3B y en la Tabla 15 muestran la diferencia de potencia de PD1-IL7wt, PD1-IL7 VAR21 completamente y parcialmente glucosilada y PD1-IL7 VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada en linfocitos T CD4 PD-1⁺ y con prebloqueo de PD-1. La potencia medida en los linfocitos T CD4 PD1⁺ refleja la combinación la administración de IL-7 dependiente e independiente de PD1. Por el contrario, la medición de potencia en linfocitos T CD4 con prebloqueo de PD1 representa la administración de IL-7 independiente de PD1, dado que todos los sitios de unión a PD1 están ocupados para impedir la unión a PD-1.

Tabla 15: EC50, actividad en cis y reducción en veces de la potencia de la fosforilación STAT-5 de respuesta a la dosis para los mutantes seleccionados en linfocitos T CD4 PD-1⁺ y con prebloqueo de PD-1 de donantes sanos.

Variante de PD1-IL7	EC50 PD1 ⁺	EC50 PD1 ⁻ (con prebloqueo)	Actividad en cis como EC50 [PD1 ⁻ con prebloqueo]/ EC50 [PD1 ⁺]	Reducción en veces de la potencia como EC50 [PD1 ⁺]/EC50 [PD1 ⁺ PD1- IL7wt]
PD1-IL7wt (P1AF5572-005)	274	765.5	2.79	1.00
PD1-IL7 VAR21, completamente glucosilada (P1AG3724-183/ P1AG3724-083)	135	10423	77.21	0.49
PD1-IL7 VAR21, parcialmente glucosilada (P1AG3725-153, P1AG3725-083)	152.7	15892	104.07	0.56
PD1-IL7 VAR18/VAR21, completamente glucosilada (P1AG0950-001)	900	nd	nd	3.28
PD1-IL7 VAR18/VAR21, parcialmente glucosilada (P1AG3727-083)	595.2	nd	nd	2.17

La actividad en cis, la relación entre la administración de IL-7 dependiente e independiente de PD1 de cada variante de PD1-IL7 se calculó en la Tabla 15 al dividir la EC50 de los linfocitos con prebloqueo de PD-1 por la EC50 de los linfocitos T PD1⁺. Esto proporciona una medición de la potencia de la administración de IL7 dependiente de PD1 para cada uno de los constructos de PD1-IL7, cuando las células expresan el mismo nivel de la cadena IL-7Ra/gamma común.

PD1-IL7wt sirvió como control para mostrar la potencia de la IL-7 natural y la administración de IL-7 independiente de PD-1 a los linfocitos T PD-1⁻. Además, en la Tabla 15, la reducción en veces de EC50 entre las variantes de PD1-IL7 y PD1-IL7wt se calculó al dividir la EC50 de la variante de PD1-IL7 por la EC50 de PD1-IL7wt. Esto indica la pérdida de potencia de la PD1-IL7 VAR18/VAR21 debido a la afinidad reducida a la IL-7Ra.

El patrón de glucosilación de PD1-IL7 VAR21 no afectó su actividad en los linfocitos T PD-1⁺, en donde la variante parcialmente glucosilada sigue siendo tan potente como la variante completamente glucosilada, mientras que muestra una alta actividad en cis como la actividad reducida en 77-100 veces en los linfocitos T PD-1⁻ en comparación con la reducción de 2.79 veces de la actividad para PD1-IL7wt (Figura 3A y Tabla 15). Para los datos de los constructos de PD1-IL7 VAR21 completa y parcialmente glucosilada, se agruparon los datos de dos lotes de muestra diferentes. Un lote se produjo mediante el uso de un sistema de expresión estable (P1AG3724-183 y P1AG3725-153) y el otro mediante el uso de un sistema de expresión transitoria (P1AG3724-083 y P1AG3725-083). Como se describió anteriormente en el Ejemplo 1.4, los diferentes lotes muestran diferentes niveles de glucosilación. La baja desviación estándar entre los lotes demuestra además que el patrón de glucosilación no afecta la actividad de IL7.

PD1-IL7 VAR18/VAR21 parcialmente glucosilada que, aunque es menos potente y tiene una actividad máxima reducida en comparación con PD1-IL7wt y PD1-IL7 VAR21, está virtualmente inactiva en los linfocitos T PD-1⁻, lo que demuestra una administración mediada por cis potente mediante PD-1 (Figura 3B y Tabla 15). Esto es beneficioso en términos de un componente de IL-7 reducido y, por lo tanto, un sumidero periférico reducido para PD1-IL7 VAR18/VAR21, como se demuestra en un estudio *in vivo*. Los ratones humanizados no portadores de tumor se trataron dos veces por vía subcutánea con PD1-IL7wt, PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada o PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada, y se desangraron después de 4 y 72 horas, después del primer y segundo tratamiento con el fin de medir la exposición al fármaco en el suero de ratón. PD1-IL7wt y PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada se depuran rápidamente del suero dentro de las primeras horas después del tratamiento, mientras que PD1-IL7 VAR18/VAR21 completamente glucosilada aún es detectable en el suero después de 72 horas y se acumula después de la segunda dosis (Figura 4). Hay potencialmente beneficios adicionales en tener una afinidad reducida de la IL-7 con el IL-7R como una ventana terapéutica y la capacidad para administrar la dosis para superar la pérdida de exposición debido a anticuerpos antifármaco.

Ejemplo 3.2 Señalización de IL-7R (STAT5-P) en linfocitos T CD4 PD-1⁺ y PD-1⁻ activados tras el tratamiento con dosis crecientes de moléculas de referencia en comparación con PD1-IL7VAR21

En este experimento, el direccionamiento en cis y la potencia de la señalización STAT-5P de las moléculas de referencia 5-10 de PD1-IL7, generadas mediante la fusión

de las variantes de IL-7 con el mismo aglutinante de bloqueo de PD1 usado para PD1-IL7 VAR21, se compararon con PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada. Para este propósito, la señalización de IL7R se midió en linfocitos T CD4 PD1⁺ y PD1⁻ (tratados previamente con anti-PD1), aislados, activados y cocultivados como se describió anteriormente, después de exponer las células a concentraciones crecientes de citocinas dirigidas a inmunidad.

Aunque la molécula de referencia 5 y la molécula de referencia 9 son 9.4 y 7.3 veces más potentes que PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada, ambas moléculas de referencia muestran actividad también en los linfocitos T PD-1⁻, que es solo 2 y 2.5 veces menor que en los linfocitos T PD-1⁺, lo que indica una administración de las variantes de IL-7 independiente de PD-1, de manera similar a lo observado para PD1-IL7wt en el Ejemplo 3.2. Solo la molécula de referencia 6 y la molécula de referencia 10 mostraron una actividad 32 veces y 20 veces reducida en los linfocitos T PD-1⁻, respectivamente, al compararlos con los linfocitos T PD-1⁺, lo que respalda una administración en cis mediada por PD-1 del agonismo de IL-7R, mientras que PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada mostró una actividad 39 veces reducida (Tabla 16, Figura 5). Además, la molécula de referencia 10 es 2.2 veces menos potente que PD1-IL7 VAR21 completamente glucosilada.

Tabla 16: EC50, actividad en cis y reducción en veces de la potencia de la fosforilación STAT-5 de respuesta a la dosis para los mutantes seleccionados en linfocitos T CD4 PD-1⁺ y con prebloqueo de PD-1 de donantes sanos.

Variante de PD1-IL7	EC50 PD1 ⁺	EC50 PD1 ⁻ (con prebloqueo)	actividad en cis como EC50 [PD1 ⁻ con prebloqueo]/ EC50 [PD1 ⁺]	Reducción en veces de la potencia como EC50 [PD1 ⁺]/ EC50 [PD1 ⁺ PD1-IL7 VAR21]
PD1-IL7 VAR21, completamente glucosilada	273.6	10676	39.0	1.0
Molécula de referencia 5	29.04	58.74	2.0	0.1
Molécula de referencia 6	329.3	10570	32.1	1.2
Molécula de referencia 7	3518	461.1	0.1	12.6
Molécula de referencia 8	79.32	355	4.5	0.2

Molécula de referencia 9	37.64	94.45	2.5	0.1
Molécula de referencia 10	621	12845	20.7	2.2

* * *

Si bien la invención anterior se describió con cierto detalle mediante ilustraciones y ejemplos para mayor claridad, las descripciones y ejemplos no se deberían interpretar como limitativos del alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y literatura científica citadas en la presente se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.