PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CITOCINAS ÚNICAS Y MÚLTIPLES Y USOS DE ESTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud incluye una reivindicación de prioridad en virtud de 35 U.S.C. §119 (e) de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/472.939, presentada el 14 de junio de 2023, la solicitud núm. 63/472.972, presentada el 14 de junio de 2023, la solicitud núm. 63/527.948, presentada el 20 de julio de 2023, la solicitud núm. 63/530.784, presentada el 04 de agosto de 2023, y la solicitud núm. 63/641.265, presentada el 01 de mayo de 2024, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente como referencia.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud contiene un listado de secuencias enviado como un formulario legible por computadora denominado “096034_000006WOPT_SequenceListing.xml”, que tiene un tamaño de 1.254.546 bytes, y creado el 13 de junio de 2024. La información contenida en este formulario legible por computadora se incorpora por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se relaciona con proteínas de fusión y con sus usos en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las siguientes modalidades y aspectos de estas se describen e ilustran junto con composiciones y métodos que están destinados a ser ilustrativos, no limitantes en su alcance.

Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión que comprende un polipéptido de supercóntigo y al menos dos de (a)-(c):

a. una o varias variantes de interleucina 15 (IL-15),
b. uno o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y
c. uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA).

En diversas modalidades, el uno o más polipéptidos capaces de unirse al TAA pueden comprender un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1, por sus siglas en inglés).

En diversas modalidades, el TAA puede comprender EGFR, HER2 o DLL.

En diversas modalidades, el receptor de activación puede comprender un grupo de diferenciación (CD, por sus siglas en inglés) 3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, o en donde el receptor coestimulador puede comprender un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp46, NKG2D, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L, o CD40.

En diversas modalidades, la proteína de fusión puede comprender una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15) y una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, una variante de IL-18. En diversas modalidades, la proteína de fusión puede comprender una o más de las variantes de IL-15 y una o más de las variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión puede comprender además un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de

activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, y en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp46, NKG2D, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L, o CD40.

En diversas modalidades, en donde la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), pueden fusionarse cada uno independientemente al extremo C del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), pueden fusionarse cada uno independientemente al extremo N del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18 o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), pueden fusionarse cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de una cadena pesada o una cadena ligera, o fusionarse a uno cualquiera de un dominio C_H2 o región bisagra del anticuerpo.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser un anticuerpo o un fragmento de este. En diversas modalidades, el anticuerpo puede ser un anticuerpo IgA, IgM, IgG, o IgE. En diversas modalidades, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser una región de fragmento cristalizable (Fc, por sus siglas en inglés) o un fragmento de esta. En diversas modalidades, la región de fragmento cristalizable (Fc) puede ser una región Fc de una IgG4,

Fc de botón en ojal (KiH, por sus siglas en inglés) o IgG1. En diversas modalidades, la región de fragmento cristalizable (Fc) puede ser un Fc de botón en ojal (KiH).

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser un polipéptido o proteína capaz de translocarse a un retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés), o un fragmento de este.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede seleccionarse entre una región de fragmento cristalizable (Fc), albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés), beta2microglobulina, transferrina, una región de fragmento de unión al antígeno (región Fab), un anticuerpo VHH, un fragmento variable de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin, por sus siglas en inglés), un dominio de unión de este y un fragmento de este.

En diversas modalidades, la variante de IL-15 puede comprender la secuencia de la Fórmula I:

$X_1WVX_4VISDLKKIEDLIQSMHIX_{22}ATLYTESX_{30}VHPSCKVTAMX_{41}CFLX_{45}ELQX_{49}ISLX_{53}S$ $GDASIHDTVX_{64}NLX_{67}X_{68}LANNSLSSNGX_{79}VTESGCKECEELEX_{93}KNIKEFLQSX_{103}VHIVX_{108}MFIX_{112}TS$, en donde

a. X_1 es cualquier aminoácido,
b. X_4 es cualquier aminoácido,
c. X_{22} es cualquier aminoácido,
d. X_{30} es cualquier aminoácido,
e. X_{41} es cualquier aminoácido,
f. X_{45} es cualquier aminoácido,
g. X_{49} es cualquier aminoácido excepto V,
h. X_{53} es cualquier aminoácido excepto E,

i. X_{64} es cualquier aminoácido,

j. X_{67} es cualquier aminoácido,

k. X_{68} es cualquier aminoácido,

l. X_{79} es cualquier aminoácido,

m. X_{93} es cualquier aminoácido,

n. X_{103} es cualquier aminoácido,

o. X_{108} es cualquier aminoácido, y

p. X_{112} es cualquier aminoácido; (sec. con núm. de ident.: 533).

En diversas modalidades, la variante de IL-18 puede comprender

a1. posiciones del aminoácido 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPP DNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMF TVQNED (sec. con núm. de ident.: 250), con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de la sec. con núm. de ident.: 250, o

a2. posiciones del aminoácido 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de la sec. con núm. de ident.: 251, que comprenden opcionalmente además sustituciones de aminoácidos en una o más de C74, C104, C112, y C164, cada una sustituida independientemente a valina, alanina o serina, o

a3. una variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B; y

b1. opcionalmente, en donde las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una o más de: E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; o M149V o M149I; o

b2. opcionalmente, en donde las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; y M149V o M149I.

En diversas modalidades, la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 pueden comprender además su propéptido (PP, por sus siglas en inglés) o una variante de PP, y opcionalmente en donde el PP o la variante PP está en el extremo N terminal en relación con la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.

En diversas modalidades, la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 pueden comprender además un polipéptido o proteína corto.

En diversas modalidades, la proteína de fusión puede comprender además uno o más sitios de escisión y la proteína de fusión puede escindirse en el uno o más sitios de escisión por una o más proteasas. En diversas modalidades, el uno o más sitios de escisión pueden estar entre la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18 y el polipéptido de supercóntigo, o dentro del PP, entre PP o la variante de PP y la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o dentro del PP, entre el PP o la variante de PP y el polipéptido de supercóntigo, o dentro de la L-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante IL-18, o dentro del PP, o una combinación de estas.

En diversas modalidades, el VHH contra ROR1 puede comprender:

un polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 (región determinante de complementariedad (CDR) 1 de 2A11), un polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.:

326 (CDR2 de 2A11), un polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 (CDR3 de 2A11), o una combinación de estos; O

una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 (CDR1 de 2A11), una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326 (CDR2 de 2A11), una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 (CDR3 de 2A11), o una combinación de estas, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 comprende una o más deleciones, adiciones o una sustitución de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326 comprende una o más deleciones, adiciones o una sustitución de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327, y

en donde:

la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **no** reemplazan los residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327, o

la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **reemplaza** uno o ambos de los residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y/o uno o ambos de los residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **con** un aminoácido que contiene un grupo funcional para reticulación.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una cualquiera de las proteínas de fusión de la invención descritas anteriormente. Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una cualquiera de las proteínas de fusión de la invención descritas en la presente.

Diversas modalidades proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de la invención descritos anteriormente. Diversas modalidades proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de la invención descritos en la presente.

Diversas modalidades proporcionan una célula transfectada con uno cualquiera de los vectores de expresión de la invención descritos anteriormente. Diversas modalidades proporcionan una célula transfectada con uno cualquiera de los vectores de expresión de la invención descritos en la presente. En diversas modalidades, la célula puede ser una célula de mamífero. En diversas modalidades, la célula de mamífero puede ser una célula CHO o una célula HEK-293. En diversas modalidades, la célula puede ser una célula bacteriana o una célula de levadura.

Diversas modalidades proporcionan un método para producir una cualquiera de las proteínas de fusión descritas anteriormente, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas anteriormente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la proteína de fusión, y opcionalmente se secrete en el medio de cultivo celular. Diversas modalidades proporcionan un método para producir una cualquiera de las proteínas de fusión descritas en la presente, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas en la presente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la proteína de fusión, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular. En diversas

modalidades, el método puede comprender además aislar la proteína de fusión. En diversas modalidades, el método puede comprender además purificar la proteína de fusión.

Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK, por sus siglas en inglés), que comprende administrar una cualquiera de las proteínas de fusión descritas anteriormente a un sujeto que las necesita. Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar una cualquiera de las proteínas de fusión descritas en la presente a un sujeto que las necesita. En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cualquiera de las proteínas de fusión descritas anteriormente a un sujeto que las necesita. Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cualquiera de las proteínas de fusión descritas en la presente a un sujeto que las necesita. En diversas modalidades, la enfermedad o afección puede ser cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar al menos dos de lo siguiente a un sujeto que lo necesita:

a. variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15,
b. interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18,
c. un constructo de anticuerpos multiespecíficos que comprende

i. un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y

ii. un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria,

en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, y

en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp46, NKG2D, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L, o CD40, y

d. uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA).

En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al menos dos de lo siguiente a un sujeto que lo necesita:

a. variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15,

b. interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18,

c. un constructo de anticuerpos multiespecíficos que comprende

iii. VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y

iv. un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria,

en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, y

en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp46, NKG2D, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L, o CD40, y

d. uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA).

En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer.

Diversas modalidades proporcionan una variante de interleucina 15 (IL-15) que comprende la secuencia de la Fórmula I: $X_1WVX_4VISDLKKIEDLIQSMHIX_{22}ATLYTESX_{30}VHPSCKVTAMX_{41}CFLX_{45}ELQX_{49}ISLX_{53}SGDASIHDTVX_{64}NLX_{67}X_{68}LANNSLSSNGX_{79}VTESGCKECEELEX_{93}KNIKEFLQSX_{103}VHIVX_{108}MFIX_{112}TS$, en donde

a. X_1 es cualquier aminoácido,
b. X_4 es cualquier aminoácido,
c. X_{22} es cualquier aminoácido,
d. X_{30} es cualquier aminoácido,
e. X_{41} es cualquier aminoácido,
f. X_{45} es cualquier aminoácido,
g. X_{49} es cualquier aminoácido excepto V,
h. X_{53} es cualquier aminoácido excepto E,
i. X_{64} es cualquier aminoácido,
j. X_{67} es cualquier aminoácido,
k. X_{68} es cualquier aminoácido,
l. X_{79} es cualquier aminoácido,

m. X_{93} es cualquier aminoácido,

n. X_{103} es cualquier aminoácido,

o. X_{108} es cualquier aminoácido, y

p. X_{112} es cualquier aminoácido; (sec. con núm. de ident.: 533).

En diversas modalidades de la variante de IL-15,

a. X_1 puede ser N (sec. con núm. de ident.: 534),

b. X_4 puede ser N (sec. con núm. de ident.: 535),

c. X_{22} puede ser D (sec. con núm. de ident.: 536),

d. X_{30} puede ser D (sec. con núm. de ident.: 537),

e. X_{41} puede ser K (sec. con núm. de ident.: 538),

f. X_{45} puede ser L (sec. con núm. de ident.: 539),

g. X_{64} puede ser E (sec. con núm. de ident.: 540),

h. X_{67} puede ser I (sec. con núm. de ident.: 541),

i. X_{68} puede ser I (sec. con núm. de ident.: 542),

j. X_{79} puede ser N (sec. con núm. de ident.: 543),

k. X_{93} puede ser E (sec. con núm. de ident.: 544),

l. X_{103} puede ser F (sec. con núm. de ident.: 545),

m. X_{108} puede ser Q (sec. con núm. de ident.: 546), o

n. X_{112} puede ser N (sec. con núm. de ident.: 547), o

o. cualquiera dos o más de a-o.

En diversas modalidades de la variante de IL-15,

a. X_1 puede ser N (sec. con núm. de ident.: 534),

b. X_4 puede ser N (sec. con núm. de ident.: 535),

c. X_{22} puede ser D (sec. con núm. de ident.: 536),

d. X_{30} puede ser D (sec. con núm. de ident.: 537),

e. X_{41} puede ser K (sec. con núm. de ident.: 538),

f. X_{45} puede ser L (sec. con núm. de ident.: 539),

g. X_{49} puede ser R o K (sec. con núm. de ident.: 548),

h. X_{53} puede ser G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549),

i. X_{64} puede ser E (sec. con núm. de ident.: 540),

j. X_{67} puede ser I (sec. con núm. de ident.: 541),

k. X_{68} puede ser I (sec. con núm. de ident.: 542),

l. X_{79} puede ser N (sec. con núm. de ident.: 543),

m. X_{93} puede ser E (sec. con núm. de ident.: 544),

n. X_{103} puede ser F (sec. con núm. de ident.: 545),

o. X_{108} puede ser Q (sec. con núm. de ident.: 546), o

p. X_{112} puede ser N (sec. con núm. de ident.: 547), o

q. cualquiera dos o más de a-p.

En diversas modalidades de la variante de IL-15,

a. X_1 puede ser N o G (sec. con núm. de ident.: 550),

b. X_4 puede ser N, K o L (sec. con núm. de ident.: 551),

c. X_{22} puede ser D o A (sec. con núm. de ident.: 552),

d. X_{30} puede ser D o N (sec. con núm. de ident.: 553),

e. X_{41} puede ser K o Q (sec. con núm. de ident.: 554),

f. X_{45} puede ser L o S (sec. con núm. de ident.: 555),

g. X_{49} puede ser R o K (sec. con núm. de ident.: 548),

h. X_{53} puede ser G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549),

i. X_{64} puede ser E o Q (sec. con núm. de ident.: 556),

j. X_{67} puede ser I o T (sec. con núm. de ident.: 557),

k. X_{68} puede ser I o S (sec. con núm. de ident.: 558),

l. X_{79} puede ser N o Y (sec. con núm. de ident.: 559),

m. X_{93} puede ser E o A (sec. con núm. de ident.: 560),

n. X_{103} puede ser F o L (sec. con núm. de ident.: 561),

o. X_{108} puede ser Q o T (sec. con núm. de ident.: 562), o

p. X_{112} es N o R (sec. con núm. de ident.: 563), o

q. cualquiera dos o más de a-p.

En diversas modalidades, X_{49} puede ser R o K, y X_{53} puede ser G, K, I o A; (sec. con núm. de ident.: 564).

En diversas modalidades, X_{30} puede ser N (sec. con núm. de ident.: 565). En diversas modalidades, X_{64} puede ser Q (sec. con núm. de ident.: 566). En diversas modalidades, X_1 puede ser G (sec. con núm. de ident.: 567).

En diversas modalidades, la variante de IL-15 puede comprender una variante de IL-15 enumerada en la Tabla 1A o en la Tabla 3A.

Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión IL-15, que comprende una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente; y un polipéptido de supercóntigo. Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión IL-15, que comprende una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas en la presente; y un polipéptido de supercóntigo.

En diversas modalidades, la variante de IL-15 puede fusionarse al extremo C del polipéptido de supercóntigo.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser un anticuerpo o un fragmento de este. En diversas modalidades, el anticuerpo puede ser un

anticuerpo IgA, IgM, IgG, o IgE. En diversas modalidades, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser una región Fc o un fragmento de esta. En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo puede ser una región Fc o un fragmento de esta y el polipéptido de supercóntigo no comprende un Fab. En diversas modalidades, la región Fc puede ser una región Fc de una IgG4, Fc de botón en ojal (KiH) o IgG1. En diversas modalidades, la región Fc puede ser una Fc de botón en ojal (KiH). En diversas modalidades, la variante de IL-15 puede fusionarse al botón del Fc de KiH. En diversas modalidades, la variante de IL-15 puede fusionarse al orificio del Fc de KiH.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente, o una cualquiera de las proteínas de fusión de Il-15 descritas anteriormente. Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas en la presente, o una cualquiera de las proteínas de fusión de Il-15 descritas en la presente.

Diversas modalidades proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente, o una cualquiera de las proteínas de fusión de Il-15 descritas anteriormente. Diversas modalidades proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas en la presente, o una cualquiera de las proteínas de fusión de IL-15 descritas en la presente.

Diversas modalidades proporcionan una célula transfectada con uno cualquiera de los vectores de expresión que comprenden uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente, o una cualquiera de las proteínas de fusión Il-15 descritas anteriormente. Diversas modalidades proporcionan

una célula transfectada con uno cualquiera de los vectores de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos que codifican una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas en la presente, o una cualquiera de las proteínas de fusión Il-15 descritas en la presente. En diversas modalidades, la célula puede ser una célula de mamífero. En diversas modalidades, la célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK-293. En diversas modalidades, la célula puede ser una célula bacteriana o una célula de levadura.

Diversas modalidades proporcionan un método para producir una cualquiera de las variantes de IL-15 o una cualquiera de las proteínas de fusión de IL-15 descritas anteriormente, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas anteriormente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la variante de IL-15 o la proteína de fusión, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular. Diversas modalidades proporcionan un método para producir una cualquiera de las variantes de IL-15 o una cualquiera de las proteínas de fusión de IL-15 descritas en la presente, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas en la presente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la variante de IL-15 o la proteína de fusión, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular. En diversas modalidades, el método puede comprender además aislar la variante de IL-15 o la proteína de fusión, o purificar la variante de IL-15 o la proteína de fusión.

Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente, o una cualquiera de la proteína de fusión IL-15 descrita anteriormente a un sujeto que la necesita. Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar una cualquiera de las variantes de

IL-15 descritas en la presente, o una cualquiera de la proteína de fusión IL-15 descrita en la presente a un sujeto que la necesita. En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas anteriormente, o una cualquiera de la proteína de fusión IL-15 descrita anteriormente a un sujeto que la necesita. Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cualquiera de las variantes de IL-15 descritas en la presente, o una cualquiera de la proteína de fusión IL-15 descrita en la presente a un sujeto que la necesite. En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

La siguiente descripción detallada muestra otras características y ventajas de la invención y se presentan junto con las figuras adjuntas, que ilustran, a manera de ejemplo, diversas características de las modalidades de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades ilustrativas se ilustran en las figuras referenciadas. Se pretende que las modalidades y las figuras descritas en la presente se consideren ilustrativas en lugar de restrictivas.

Las Figuras 1A-1D ilustran ejemplos no limitantes de las proteínas de fusión de acuerdo con diversas modalidades de la presente invención.

Las Figuras 2A-2D muestran el impacto de un anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativo, uno de tres anticuerpos anti-PD1-mutante-IL-15 ilustrativos o la combinación del anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 y de cada una de las tres fusiones de anticuerpos IL-15 mutantes en la liberación de IFNγ mediada por células T purificadas expuestas a una dosis subóptima de

anti-CD3 (Pelicluster CD3, que es capaz de reticular CD3 y activar células T independientemente de la unión de FcγR) durante 72 horas. Para el anti-PD1-pro-IL-18, el artículo de prueba ilustrativo fue Fuse694, el cual incorpora un pro-IL-18 (IL18mutAS escindible de granzima B) en el botón u orificio C-terminal de una versión IgG1-LALA de nivolumab (Fuse691). Para el anti-PD1-mutant-IL-15, los tres artículos de prueba fueron Fuse765 (Figura 2A, triángulo abierto, línea punteada), Fuse773 (Figura 2B, triángulo abierto, línea punteada) y Fuse774 (Figura 2C, triángulo abierto, línea punteada), que incorporaron respectivamente un IL-15m4, IL15m9 o IL15m10 en el botón u orificio C-terminal de Fuse691. Las figuras 2A-2C son gráficos x-y no lineales de la concentración del artículo de prueba versus la liberación de IFNγ. Se muestra una tabla de síntesis de valores EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) en la Figura 2D.

La Figura 3 muestra el impacto de un anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativo, un anticuerpo anti-PD1-mutante IL-15 ilustrativo y un anticuerpo anti-PD1 que incorpora tanto la pro-IL-18 como la IL-15 mutante ilustrativa anteriormente mencionada, sobre la liberación de IFNγ mediada por células T purificadas expuestas a una dosis subóptima de anti-CD3 (Pelicluster CD3, que es capaz de reticular CD3 y activar células T independientemente de la unión de FcγR) durante 72 horas. Se muestra una tabla de síntesis de valores EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 4A-4B muestran la capacidad de un anticuerpo biespecífico (bsAb, por sus siglas en inglés) NKG2D x ROR1 con o sin la incorporación de un mutante pro-IL18 e IL15 ilustrativo para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células NK y la liberación de IFNγ. Las Figuras 4A y 4B son gráficos x-y no lineales de la destrucción de células tumorales versus la concentración del artículo de prueba y la liberación de IFNγ versus la concentración del artículo de prueba, respectivamente. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 5A-5B muestran el impacto de la orientación de una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 a NKG2D ilustrativa sobre la expansión de células NK en PBMC. La Figura 5A y la Figura 5B son gráficos x-y de porcentajes de células NK y números de células NK medidos el día 12, respectivamente, ilustrados en función de una titulación de cada artículo de prueba. En relación con el Fuse926, 100 nM de Fuse916 indujeron aproximadamente una expansión de 6 veces de las células NK.

Las Figuras 6A-6B muestran el impacto de dirigirse a una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 a NKp46 ilustrativas sobre la expansión de células NK en PBMC.

Las Figuras 7A-7B muestran la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a γ9δ2 células T mediante una fusión de citocina con bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la expansión de células T γ9δ2 en PBMC humanas. La Figura 7A y la Figura 7B son gráficos x-y de los porcentajes de γ9δ2 células T y los números de γ9δ2 células T medidos el día 12, respectivamente, ilustrados como una función de una titulación de cada artículo de prueba. En relación con el Fuse966, 100 nM de Fuse923 indujeron una expansión de aproximadamente 12 veces de γ9δ2 células T.

Las Figuras 8A-8B muestran la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a γ9δ2 células T mediante una fusión de citocina con bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por γ9δ2 células T y la destrucción de células tumorales. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 9A-9C muestran el impacto de dirigir una variante de IL-15 ilustrativa y una variante de IL18 ilustrativa a NKp30 más o menos NKp46 en la expansión de células NK de PBMC. Se midieron tanto la frecuencia como el número de células NK

después de 21 días de incubación de PBMC de un donante humano sano con 100 pM de los artículos de prueba descritos a continuación.

Las Figuras 10A-10B muestran la actividad agonista de VHH específico de TCR γ9δ2 fusionado al dominio Fc de IgG1 humana para inducir la lisis redirigida de células P815 transducidas de manera estable con eGFP y luciferasa de luciérnaga (P815) por γ9δ2 células T expandidas. Se muestran gráficos x-y no lineales del porcentaje de destrucción en función de la concentración del artículo de prueba. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 11A-11B muestran la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a 92 células T mediante una fusión de citocina con bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por γ9δ2 células T y la destrucción de células tumorales. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 11A) o la liberación de IFNγ (Figura 11B). Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 12A-12C muestran la actividad agonista de la NKp46 humana (Figuras 12A-12B) y el VHH específico para NKp30 (Figura 12C) humano fusionado al dominio Fc de IgG1 humana para inducir lisis redirigida de células P815 transducidas de manera estable con eGFP y luciferasa de luciérnaga (P815) por γ9δ2 células T expandidas. Se muestran gráficos x-y no lineales del porcentaje de destrucción en función de la concentración del artículo de prueba. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 13A-13B muestran la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a células NK humanas mediante una fusión de citocina

con bsAb NKp46 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por células NK y la destrucción de células tumorales. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 13A) o liberación de IFNγ (Figura 13B). En relación con Fuse1125, la incorporación de citocina(s) en el bsAb potenció tanto la destrucción de células tumorales como la liberación de IFNγ en el orden de rango de Fuse1124>Fuse1127>Fusee1126, lo que indica que la combinación de IL-18 e IL-15 fue la más potente. La lectura diferencial entre los artículos de prueba fue más evidente para la liberación de IFNγ en comparación con la destrucción de células tumorales. Es probable que esto se deba a la alta relación E:T de 3:1, en la que la máxima destrucción de células tumorales puede alcanzarse con un umbral de señalización de células NK más bajo que el de liberación de IFNγ. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Las Figuras 14-15 muestran la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 ilustrativa dirigida a células NK humanas mediante una (1) fusión de citocina con bsAb NKp30 humano × ROR1 humano (Fuse1147 y Fuse1145) o (2) una fusión de citocina con bsAb de ROR1 NKp30 × NKp46 (Fuse1148 y Fuse1146), para inducir la liberación de IFNγ mediada por células NK y la destrucción de células tumorales. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 14) o la liberación de IFNγ (Figura 15). Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

La Figura 16 ilustra un constructo de proteína de fusión ilustrativa que tiene una variante de IL-15 de acuerdo con diversas modalidades de la invención.

Las Figuras 17A-17C ilustran la actividad funcional de las variantes de IL-15 en lo que se refiere a la inducción y liberación de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) por las células indicadoras IL-2 HEK-Blue.

Las Figuras 18A-18B ilustran la actividad funcional de las variantes de IL-15 en lo que se refiere a la γ liberación de IFN mediada por linfocitos T inducida por variantes de IL-15 dirigidas a PD1 en presencia de una baja concentración "subóptima" de anti-CD3.

Las Figuras 19 ilustran la actividad funcional de las variantes de IL-15 en lo que se refiere a la liberación de IFNγ mediada por célula T inducida por variantes de IL-15 dirigidas a PD1 en presencia de células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) alógenas.

Las Figuras 20A-20M ilustran ilustraciones de formatos para proteínas de fusión pro-IL-18. Todas las proteínas incorporan un supercóntigo IgG humano que es IgG1 homodimérica silvestre o que comprende una Fc de la IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal (KIH, por sus siglas en inglés). La pro-IL-18, cuando se incluye en la proteína de fusión se fusiona como (a) un casete singular al extremo C-terminal de la cadena de botón (u ojal) o (b) como casetes singulares tanto para los extremos C-terminales de la cadena de botón como para la cadena de ojal. Los sitios de escisión, cuando están presentes en el casete pro-IL-18, se indican como una forma de estrella. Un dominio de unión al antígeno asociado al tumor (TAA, por sus siglas en inglés), cuando está presente, se fusiona como un casete singular al extremo N-terminal de una cadena de botón (u ojal), o ambas cadenas del heterodímero KIH IgG Fc. El dominio de unión a TAA puede ser un VHH (p. ej., el clon 9G8 específico de EGFR) o un fab (p. ej., el clon C225 específico de EGFR de cetuximab).

Las Figuras 21A-21B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Figura 21A) y la liberación de IFNγ (Figura

21B) inducida por FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), y FUSE686 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo).

Las Figuras 22A-22B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Figura 22A) y la liberación de IFNγ (Figura 22B) inducida por FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo; se dirige tanto a EGFR como a FcγR), o a la combinación de FUSE556 y FUSE422 (IgG1-pro-IL-18; solo se dirige a FcγR).

La Figura 23 ilustra la actividad funcional en relación con la liberación de IFNγ inducida por FUSE691 (nivolumab), FUSE645 (IgG1-pro-IL-18 dirigido a EGFR; no dirigido en este sistema), FUSE694 (nivolumab-pro-IL-18) e IL-18 recombinante humana en cocultivo de células T/DC alogénicas.

Las Figuras 24A-24B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo) y FUSE516 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18 anti-EGFR de un solo brazo). Los gráficos que ilustran la destrucción de 231 células tumorales MDA-MB EGFR+ por PBMC de cada uno de los cuatro donantes humanos normales se muestran en las Figuras 24A-24B.

Las Figuras 25A-25B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducida por la proteína de fusión pro-IL-18 (Figura 25A), liberación de IFNγ (Figura 25A), liberación de granzima B (Figura 25B) y liberación/consumo de IL-18 (Figura 25B) después de 48 horas de cocultivo de PBMC y células tumorales EGFR+ MDA-MB-231. Las proteínas de fusión pro-IL-18 probadas fueron FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), y FUSE516 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18 anti-EGFR de un solo brazo).

Las Figuras 26A-26B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducida por FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), variantes de pro-IL-18 fusionadas al extremo C de FUSE566 con diferentes sitios de escisión de proteasa entre el dominio Fc y pro-IL-18 (Figura 26A), y una variante que contiene la mutación PGLALA en su dominio Fc para suprimir el direccionamiento a los FcγR (FUSE627; Figura 26B). Los sitios de proteasa ensayados fueron granzima A (FUSE658), granzima B (FUSE516), MMP2/9 (FUSE659), y la combinación de granzima A, granzima B y MMP2/9 (FUSE660).

Las Figuras 27A-27B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducida por la proteína de fusión pro-IL-18 (Figura 27A) y la liberación de IFNγ (Figura 27B) después de 48 horas de cocultivo de células NK expandidas y 231 células tumorales EGFR+ MDA-MB en relaciones E:T de 1:1 y 1:5. Las proteínas de fusión pro-IL-18 probadas fueron FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), y FUSE516 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18 anti-EGFR de un solo brazo).

Las Figuras 28A-28B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducida por la proteína de fusión pro-IL-18 (Figura 28A) y la liberación de IFNγ (Figura 28B) después de 48 horas de cocultivo de células NK expandidas y 231 células tumorales EGFR+ MDA-MB en relaciones E:T de 2:1. La proteína de fusión pro-IL-18 probada fue FUSE555 (Fab C225-IgG1-pro-IL-18 anti-EGFR de doble brazo), que se comparó con cetuximab.

Las Figuras 29A-29B ilustran la actividad funcional en lo que se refiere a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos inducida por la proteína de fusión pro-IL-18 (Figura 29A) y la liberación de IFNγ (Figura 29B) después de 48 horas de cocultivo de células NK expandidas y células tumorales HER2+ T47D en relaciones E:T de 5:1. Las

proteínas de fusión pro-IL-18 probadas fueron FUSE624 (Fab IgG1-pro-IL-18 anti-HER2 de doble brazo) y trastuzumab (Herceptin).

La Figura 30 muestra la evaluación de la capacidad de un anticuerpo anti-PDL1 que incorpora una variante de pro-IL-18amut2, diseñada de manera que no pueda ser escindida por la granzima B, para inducir la liberación de IFNγ mediada por las células T. Una tabla de síntesis de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) se muestra debajo de la trama x-y.

Las Figuras 31A-31B muestran la evaluación de la capacidad de un anticuerpo anti-PD1, que incorpora una de dos variantes pro-IL-18 (pro-IL18amut2 o pro-IL18amut9), diseñada de manera que no pueda ser escindida por la granzima B, para inducir la destrucción de células tumorales mediada por las células T (Figura 27A) y la liberación de IFNγ (Figura 27B). Una tabla de breve descripción de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) se muestra debajo de cada gráfica x-y.

La Figura 32 muestra la capacidad de diversas variantes de IL-18 para inducir la liberación no dirigida basada en trans de SEAP a partir de HEK-Blue-IL-18.

Las Figuras 33A-33B muestran la capacidad de diversas variantes de IL-18 dirigidas a PD-1 humana para inducir la liberación basada en cis de IFNγ a partir de PBMC humana derivada de un donante humano sano (Figura 29A) o células T humanas (Figura 29B).

Las Figuras 34A-34B muestran la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral de un tumor de melanoma singeneico agresivo en un modelo de tumor de ratón completamente inmunocompetente.

La Figura 34C muestra el número de diferentes subconjuntos de linfocitos por gramo de tumor que se evaluó a partir de ratones portadores de tumores tratados con PBS (gris claro), anti-PD1 (negro) y Fuse1113 (líneas horizontales).

La Figura 34D ilustra la frecuencia de células mieloides totales (células CD11b+), macrófagos M2 (células CD11b+ F4-80+ CD11c-CD206+) y las relaciones de células T CD8+ a células supresoras derivadas de mieloide totales (MDSC, por sus siglas en inglés; CD11b+ Ly6C+ Ly6G- [M-MDSC] y CD11b+ Ly6C-Mid Ly6G+ [G-MDSC]), células T CD8+ a macrófagos M2, células T CD8+ sensibles anti-PD-1 a MDSC, y células T CD8+ a células T CD4+.

Las Figuras 35A-35B muestran la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral de un tumor de cáncer colorrectal singeneico en un modelo de tumor de ratón completamente inmunocompetente.

Las Figuras 36A-36B muestran la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral en un tumor de cáncer colorrectal singeneico de rápido crecimiento en un modelo de tumor de ratón completamente inmunocompetente.

La Figura 37A muestra ratones C57BL/6 inyectados por vía subcutánea con MC38i. Se recolectó suero a las 0, 24, 72 y 144 horas después del Día 0 de tratamiento y se midió el IFNγ de ratón.

La Figura 37B muestra que los ratones C57BL/6 que albergaban tumores MC38i y experimentaron una CR después del tratamiento con αPD1-HT18cis o αPD-1-IL-18 fueron reexpuestos a MC38i después de 90 días.

La Figura 38 muestra que los ratones BALB/c que albergaban tumores CT26.C y experimentaron una CR después del tratamiento con αPD1-HT18cis fueron reexpuestos a CT26.C después de 65 días en el flanco izquierdo y CT26 parental después de 70 días en el flanco derecho. Como medio de comparación, un grupo de 5 ratones sin tratamiento previo fueron sometidos a la inoculación tumoral equivalente.

La Figura 39 muestra que los ratones C57BL/6 fueron inyectados por vía subcutánea con B16-F10R. Cuando el volumen medio tumoral variaba entre 75-100 mm3, los ratones fueron aleatorizados en grupos de 5 y tratados con PBS, αPD-1, αPD1-HT18cis los días 0, 3 y 6 a 15 mg/kg. Los ratones que experimentaron una CR después del tratamiento con αPD1-HT18cis se redesafiaron con B16-F10 después de 60 días.

La Figura 40 muestra que los ratones C57BL/6 que albergaban tumores B16-F10R fueron tratados los Días 0 y 3. Los ratones se sacrificaron el Día 5, los tumores se recolectaron y se dispersaron en suspensiones de células individuales para la evaluación citométrica de flujo de TIL (células CD45+). TEM y TCM se definieron CD44+ / CD62L-y CD44+ / CD62L -, respectivamente dentro del grupo de CD8+. Las células T CD8 + sensibles a αPD-1 se definieron como células PD1+/TCF1+ dentro del grupo de CD8+.

La Figura 41 muestra que los ratones C57BL/6 que albergaban tumores B16-F10R fueron tratados los Días 0 y 3. Los ratones se sacrificaron el Día 5, los tumores se recolectaron y se dispersaron en suspensiones de células individuales para la evaluación citométrica de flujo de TIL (células CD45+). Todos los subconjuntos mieloides se bloquearon en CD11b. Dentro de ese grupo, los MDSC se definieron como Ly6G+/Ly6Cmid+Ly6G-/Ly6Chigh y los macrófagos M2 como F480+/ CD206+.

Las Figuras 42A y 42B ilustran el impacto de anticuerpos anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativos que contienen diferentes variantes de IL-18 sobre la liberación de IFNγ mediada por PBMC activadas con PeliCluster CD3 durante 48 horas, lavadas y reexpuestas a una concentración 10 veces menor de PeliCluster CD3 durante 48 horas adicionales.

La Figura 43 (paneles A-E) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo C de pro-IL-18 está fusionado al extremo C del botón de una proteína IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal; que tiene una estructura de N a C-terminal que

comprende botones en ojales (KiH) Fc — propéptido (PP) — sitio de escisión de enteroquinasa (EK, por sus siglas en inglés) — IL-18 silvestre o sus variantes. Esto ilustra proteínas de fusión ilustrativas tales como ident.: FUSE-480, FUSE-481, y FUSE-442 en la Tabla 6. Se realizó una modificación adicional a pro-IL-18 para reducir la agregación de la molécula, en donde cada residuo de cisteína tanto en el propéptido como en la IL-18 madura se reemplazó con serina (como en FUSE-480, denominada "IL-18AS"), con alanina (como en FUSE-481, denominada "IL-18AA"), o con valina (como en FUSE-442, denominada "IL-18AV"). Alternativamente, el N-terminal de pro-IL-18 se puede fusionar con el C-terminal de la cadena de ojal de una proteína IgG1 heterodimérica KiH. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E.

La Figura 44 (paneles A-E) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el N-terminal de pro IL-18 se fusionó con el C-terminal de un dominio CH3 de IgG1 (que también es una cadena de botón de una proteína IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal como en la Figura 43), y la pro IL-18 incorporó cuatro sustituciones de aminoácidos que planteaban la hipótesis de reducir la unión a IL-18BP mientras mantenían la unión silvestre al complejo receptor de IL-18, denominado "pro-IL-18mut2". Estas proteínas de fusión tienen una estructura de N a C-terminal que comprende botones en ojales (KiH) Fc — propéptido (PP) — sitio de escisión de enteroquinasa (EK) — IL-18mut2. Se realizó una modificación adicional a la pro-IL-18mut2 para reducir la agregación de la molécula, en donde cada residuo de cisteína tanto en el propéptido como en la IL-18mut2 madura se sustituyó con serina (denominada "IL-18mut2AS", como en FUSE-422; panel B), con alanina (denominada "IL-18mut2AA", como en FUSE-423; panel C), o con valina (denominada "IL-18mut2AV", como en FUSE-424; panel D). La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E.

La Figura 45 (paneles A-D) ilustra proteínas de fusión ilustrativas con (panel A) o sin (panel B) el propéptido para examinar el impacto en el enmascaramiento de la actividad biológica de "IL-18AV" (panel C), en donde se generaron variantes de fusión Fc que incorporan "IL-18AV" con el propéptido (panel A; FUSE-442) o sin (panel B; FUSE-505) el propéptido. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D.

La Figura 46 (paneles A-D) ilustra proteínas de fusión ilustrativas con (panel A) o sin (panel B) el propéptido para examinar el impacto del propéptido en el enmascaramiento de la actividad biológica de "IL-18mut2AV", en donde se generaron variantes de fusión Fc incorporando "IL-18mut2AV" sin el propéptido (por lo tanto, una IL-18 madura con mutación, denominada "matIL-18mut2-AV", ver el panel B; FUSE-441) o con el propéptido (panel A; FUSE-424). Para una proteína de fusión desprovista del propéptido, el sitio de escisión de EK que reemplazó al sitio Caspasa 1 se movió a una posición directamente entre el dominio CH3 del botón y la IL-18AV madura sin la adición de un enlazador flexible. El panel C ilustra la lectura de activación usando el ensayo de células indicadoras HEK-Blue-IL-18AV después de la exposición a una titulación de FUSE-441 (Fc-EK-IL-18AV) o FUSE-424 (Fc-EKpp-IL-18AV) con o sin tratamiento con EK. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D.

La Figura 47 (paneles A-D) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo N de pro-IL-18 está fusionado al extremo C de la proteína Fc de IgG1 o Fc de IgG4; que tiene una estructura de N a C-terminal que comprende Fc de IgG1 - propéptido (PP) - IL-18AV (FUSE-507; panel A) y Fc de IgG4 - propéptido (PP) - IL-18AV (FUSE-509; panel B). El panel C ilustra la lectura de activación usando el ensayo de células indicadoras HEK-Blue-IL-18AV de exponer las células a una titulación de FUSE-507 o FUSE-509 con o sin

tratamiento con EK. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D.

La Figura 48 (paneles A-E) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo N de pro-IL-18 está fusionado al extremo C de HSA con o sin el propéptido (PP); que tiene una estructura de N a C-terminal que comprende HSA - propéptido (PP) - IL-18AV (FUSE-501; panel A) y HSA- IL-18AV (FUSE-503; panel B). Los paneles C y D ilustran la lectura de activación. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E.

La Figura 49 (paneles A-E) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo N de pro-IL-18mut2 está fusionado al extremo C de HSA con o sin el propéptido (PP); que tiene una estructura de N a C-terminal que comprende HSA - propéptido (PP) - IL-18mut2AV (FUSE-502; panel A) y HSA- IL-18mut2AV (FUSE-504; panel B). Los paneles C y D ilustran la lectura de activación. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E.

La Figura 50 (paneles A-D) ilustra proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo C de pro-IL-18 está fusionado al extremo N del botón de una proteína IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal con o sin el propéptido (PP); que tiene una estructura de N a C-terminal que comprende el propéptido (PP) - IL-18AV - botones en ojales (KiH) Fc (FUSE-499; panel A) e IL-18AV - botones en ojales (KiH) Fc (FUSE-500; panel B). El panel C ilustra la lectura de activación. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP con o sin exposición a la Caspasa 1 para cada compuesto se muestra en el panel D.

Las Figuras 51A y 51D ilustran proteínas de fusión ilustrativas con una estructura de extremo N a C: Fc-ppMMP2/9-sitios de escisión-IL-18-AV (FUSE-486), Fc-ppMMP9/2-sitios de escisión-IL-18-AV (FUSE-487), en los que los sitios de escisión son

específicos para las metaloproteasas, MMP2 y MMP9, con la enzima preferida a la izquierda de la barra diagonal, o FUSE-485 (Fc-GzmBpp-IL-18AV) y FUSE-462 (Fc-GzmBpp-IL-18mut2AV). La Figura 51B ilustra la lectura de activación relacionada con FUSE-486 y FUSE-487, con o sin tratamiento con MMP2. La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada uno de FUSE-486 y FUSE-487, con o sin tratamiento con MMP2, se muestra en la Figura 51B. La Figura 51C muestra que FUSE587 estaba aproximadamente 3.000 veces atenuada en relación con la IL-18 humana recombinante. Curiosamente, observamos que la escisión de FUSE587 con MMP2 liberada y la variante de IL-18AV que aún estaba aproximadamente 100 veces atenuada en relación con la IL-18 recombinante. En contraste, la escisión con Granzima B liberó una variante de IL-18AV con actividad similar a la IL-18 recombinante. La escisión con Granzima B da como resultado la liberación de IL-18AV madura sin ningún residuo N-terminal que constituya un voladizo, mientras que los voladizos de polipéptido N-terminal de 11 y 15 aminoácidos permanecen después de la escisión de FUSE486 y FUSE587, respectivamente, con MMP2. Especulamos que estos voladizos podrían estar atenuando la actividad de IL-18AV, aunque en menor grado que el propéptido variante de tamaño completo. Este fenómeno se investigó adicionalmente en la Figura 53 y la Figura 55. Las Figuras 51D y 51G también ilustran proteínas de fusión ilustrativas con una estructura de N a C- terminal: Fc-ppGb-sitios de escisión-IL-18-AV (FUSE-485; B-19D) o Fc-ppGb-sitios de escisión-IL-18mut2-AV (FUSE-462; 51D) o Fab-Cetuximab-Fc-ppGb-sitios de escisión-IL-18-AV (FUSE-517; 51G), en el que el sitio de escisión es específico para granzima B (Gb). La Figura 51E ilustra la lectura de activación relacionada con FUSE-462 y FUSE-485, con o sin tratamiento con granzima B. La Figura 51F muestra la actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada uno de FUSE-462 y FUSE-485, con o sin tratamiento con granzima B. La Figura 51H ilustra la lectura de activación relacionada con

FUSE-517, con o sin tratamiento enzimático. La Figura 51I muestra la actividad biológica definida como el EC50-SEAP para FUSE-517, con o sin tratamiento con granzima B.

La Figura 52 (paneles A-G) ilustra el impacto de IL-18BP sobre la actividad biológica de IL-18 humana recombinante (rhIL-18, por sus siglas en inglés) y los productos de escisión EK de las proteínas de fusión ilustrativas, Fc-ppEK-IL-18-AV (FUSE-442) y Fc-ppEK-IL-18mut2AV (FUSE-424). La actividad biológica definida como el EC50-SEAP para cada compuesto con y sin la adición de IL-18BP (ensayo de competencia) se muestra en los paneles B, D y F, con la correspondiente actividad biológica definida como el EC50-SEAP mostrada en los paneles C, E, y G, respectivamente.

La Figura 53 (panel A) ilustra diagramas de proteínas de fusión ilustrativas en las que el extremo C de pro-IL-18 se fusiona con el extremo N del botón de una proteína IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal con polipéptidos de diferentes tamaños fusionados al extremo N de la IL-18 madura. La Figura 53 (panel B) ilustra la actividad biológica de cada proteína de fusión usando la línea celular reportera IL-18, HEK-Blue IL-18.

Las Figuras 54A, 54B(i), 54B(ii), 54C, 54D(i), 54D(ii) y 54E ilustran proteínas de fusión mutantes diseñadas genéticamente con IL-18 humana de acuerdo con diversas modalidades de la invención.

La Figura 55 muestra el impacto del tamaño de polipéptidos fusionados al extremo N de IL-18 madura sobre la actividad biológica de una única IL-18AV fusionada al extremo N de Fc de IgG1.

La Figura 56A-56H muestra el impacto de la sustitución del residuo de cisteína en los residuos propéptido y cisteína en la IL18 madura, que se fusionaron juntos para formar el casete variante de pro-IL-18, sobre la actividad biológica de cada variante usando el sistema de ensayo HEK azul IL18.

La Figura 57A-57B muestra el impacto de dirigir la pro-IL18 a una proximidad cercana a su complejo receptor (es decir, ‘‘actividad cis’’).

Las Figuras 58A-58E ilustran esquemas de múltiples formatos de anticuerpos biespecíficos anti-ROR1/CD3, también denominados receptores de células T (TCE, por sus siglas en inglés), que ilustran diseños de proteínas de fusión de TCE que comprenden un supercóntigo de Fc IgG1 heterodímero de botón en ojal (KIH) con (1) una región de unión al antígeno (Fab) de fragmento específico para CD3 en el extremo N-terminal de una cadena de perillas (mostrada en los paneles 58A, 58B, 58D y 58E) o una cadena de orificio (mostrada en 58C) de la KIH, y (2) uno o más VHH o fragmento variable de cadena única (scFV) específicos para un antígeno asociado a tumores (TAA) (p. ej., ROR1) en una o más posiciones. Los ejemplos mostrados ilustran el aglutinante TAA unido a (a) el extremo N-terminal de la cadena de agujeros en tándem (58A), (b) el extremo N-terminal de la cadena de agujeros y en el extremo C-terminal de la cadena ligera Fab específica de CD3 (anti-CD3) (58B), (c) el extremo N-terminal de la cadena de botón y en el extremo C-terminal de la cadena ligera Fab específica de CD3 (anti-CD3) (58C), (d) el extremo N y C-terminal de la cadena de agujeros (58D) y (e) solo el extremo N-terminal de la cadena de agujeros (58E).

Las Figuras 59A-59B muestran el rendimiento de producción (59A) y la temperatura de fusión (Tm, por sus siglas en inglés) (2B) de proteínas de fusión ilustrativas (denotadas como FUSE ID, ‘‘FUSE-XXX’’).

Las Figuras 60A-60D muestran la aparente afinidad de unión de los TCE ilustrativos para el CD3 expresado en la membrana celular en células T humanas y en células T de primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés) de cynomolgus.

Las Figuras 61A-61E ilustran la aparente afinidad de unión de los TCE ilustrativos para el ROR1 expresado en la membrana celular usando una serie de líneas celulares

variantes MDA-MB-231 diseñadas genéticamente que expresan diferentes densidades de superficie celular del ROR1. Las Figuras 61F-61K ilustran la capacidad de los TCE ilustrativos específicos para ROR1 para unirse al dominio Ig ROR1 distal de la membrana.

Las Figuras 62A-62D representan la afinidad de unión (KD) para ROR1, determinada mediante interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés), de TCE: FUSE-211 (en la Figura 62A), FUSE-393 (en la Figura 62B) y FUSE-394 (en la Figura 62C), con su afinidad de unión calculada mostrada en la Figura 62D.

Las Figuras 62E-62G ilustran la afinidad de unión por ROR1 de una proteína de fusión 2A11 VHH — Fc (denotada como FUSE-112, en la Figura 62E) y de una proteína de fusión 2A11 VHH *mutante* — Fc (denotada como FUSE-453, en la Figura 62F), con su afinidad de unión calculada que se muestra en la Figura 62G, que demostró el impacto de reemplazar los residuos de cisteína en CDR1 y CDR3 del VHH específico para ROR1.

Las Figuras 62H-62J representan la afinidad de unión para ROR1 de una proteína de fusión 5A1 VHH — Fc (denotada como FUSE-179, en la Figura 62H) y de una proteína de fusión 5A1 VHH *mutante* — Fc (denotada como FUSE-454, en la Figura 64), con su afinidad de unión calculada mostrada en la Figura 62J, que demostró el impacto de reemplazar los residuos de cisteína en CDR1 y CDR3 del VHH específico para ROR1.

Las Figuras 63A-63D ilustran la inducción de TCE de la citotoxicidad dependiente de ROR1 mediada por células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) humana (caracterizada como porcentaje de destrucción) de células tumorales MDA-MB-231, en donde los TCE probados incluyen FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 y las PBMC humanas eran del donante 1 (Figura 63A), donante 2 (Figura 63B) o donante 3 (Figura 63C). La Figura 63D resume la EC_{50} calculada de cada TCE para inducir un porcentaje de destrucción de 50 % de las células tumorales.

Las Figuras 63E-6H ilustran la inducción de los TCE de liberación de IFN-γ a partir de PBMC humanas (caracterizada como concentración de IFN-γ en sobrenadante de cultivo celular) en presencia de células tumorales MDA-MB-231. Los TCE probados incluyen FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394, y las PBMC humanas fueron del donante 1 (Figura 63E), donante 2 (Figura 63F) o donante 3 (Figura 63G). La Figura 63H resume la EC_{50} calculada de cada TCE para inducir el 50 % de una liberación máxima de IFN-γ.

Las Figuras 63I-63O ilustran la capacidad de FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 para mediar la liberación reducida de IFN-γ dependiente de ROR1 de PBMC humanas (promedio de tres donantes) o células Pan-T, mientras mantienen la eficacia citotóxica (máxima eliminación de MDA-MB-231), o "desacoplamiento de la citotoxicidad de la liberación de citocinas" en comparación con un FUSE-277, un TCE prototípico altamente potente que sirve como TCE de control "sin desacoplamiento".

Las Figuras 63P-63V ilustran la destrucción dependiente de ROR1, la inducción de la liberación de citocina y las relaciones de desacoplamiento calculadas después de cocultivos de 24, 48 y 72 horas de efectores de PBMC con dianas tumorales ROR1+ MDA-MB-231.

Las Figuras 64A-64C ilustran la inducción por los TCE de citotoxicidad independiente de ROR1, mediada por PBMC humanas, de células tumorales T47-D (que no expresan ROR1), caracterizada como concentración de IFN-γ en el sobrenadante del cocultivo. Los paneles A-C muestran los resultados en donde las PBMC humanas fueron del donante 1 (panel A), donante 2 (panel B) y donante 3 (panel C), respectivamente.

Las Figuras 65A-65E y 65G-65K ilustran la inducción de los TCE de citotoxicidad independiente de ROR1, mediada por PBMC humanas y liberación de citocinas, respectivamente, en función de la densidad de superficie celular de ROR1. Los datos se

generaron usando una serie de líneas celulares de diferentes orígenes que expresan diferentes números de moléculas ROR1 en sus superficies celulares. Las líneas celulares se muestran en un orden descendente de densidad ROR1 de superficie celular, de alta a baja. Es decir, NCCIT (Figura 65A, G), MDA-MB-231 (Figura 65B, H), NCI-H1975 (Figura 65C, I), DU-145 (Figura 65D, J) y T-47D ROR1-negativo (Figura 65E, K). Las Figura 65F y 65L resumen las potencias de citotoxicidad y liberación de citocinas inducidas por cada uno de los TCE hacia una serie de líneas celulares con diferentes densidades ROR1 de la superficie celular. La Figura 65M ilustra la relación de desacoplamiento calculada para cada TCE a través de la serie de líneas celulares.

Las Figuras 66A-66E y 66G-66K ilustran la inducción de los TCE de citotoxicidad dependiente de ROR1 y liberación de citocinas mediadas por PBMC humanas, respectivamente, en función de la densidad de superficie celular de ROR1 usando una serie de líneas celulares variantes de MDA-MB-231 diseñadas genéticamente que expresan diferentes densidades de superficie celular del ROR1. Las densidades superficiales de ROR1 en el MDA-MB-231 diseñado genéticamente fueron las siguientes: ~2.000.000 de moléculas por célula (MDA++; Figuras 66A, 66G), ~500.000 moléculas por célula (MDA+; Figuras 66B, 66H), ~35.000 moléculas por célula (MDA; Figuras 66C, 66I), ~17.000 moléculas por célula (MDA-bajo; Figuras 66D, 66J), y 0 molécula por célula (MDA-KO; Figuras 66E, 66K). Las Figura 66F y 66L resumen las potencias de citotoxicidad y liberación de citocinas inducidas por cada uno de los TCE hacia células de MDA-MB-231 con diferentes densidades ROR1 de la superficie celular. La Figura 66M representa las relaciones de desacoplamiento calculadas (citotoxicidad a partir de la liberación de citocinas) para cada TCE y la Figura 66N es un análisis de regresión entre la magnitud de IFN© versus la densidad de superficie celular ROR1 de un control de TCE sin desacoplamiento versus un TCE de desacoplamiento ilustrativo.

Las Figuras 67A y 67B representan la expresión inducida por TCE de marcadores de activación, CD69 y CD25, respectivamente, en células T después del cocultivo de PBMC con células tumorales que expresan ROR1. La Figura 67C resume la potencia por la cual cada TCE induce CD69 o CD25, definida como la unión a EC_{50}. La Figura 67D y la Figura 67F son gráficos de barras que ilustran el desacoplamiento de la citotoxicidad de la inducción de los biomarcadores de la superficie celular de la activación de células T, CD69 y CD25. La Figura 67E y la Figura 67G son gráficos de barras que ilustran el desacoplamiento de las CD69 y CD25 de inducción de la liberación de citocina.

Las Figuras 68A-68C ilustran la farmacocinética (PK, por sus siglas en inglés) de los TCE ilustrativos en una dosis única de 5 mg/kg (Figura 68A) o 0,5 mg/kg (Figura 68B) administrada a ratones C57BL/6 silvestre durante un periodo de 10 días. La Figura 68C ilustra los parámetros PK para cada artículo de prueba.

La Figura 69A-169E representa un esquema de dos modelos de tumores de xenoinjerto de ratón humanizado (Figuras 69A y 69C). En ambos casos, el teratoma $ROR1^+$ humano altamente agresivo, NCCIT se inyectó en ratones inmunitarios incompetentes. El crecimiento tumoral a lo largo del tiempo para el primer modelo se muestra en la Figura 69B y el segundo modelo en las Figuras 69D y 69E. En ambos casos, los artículos de prueba consistieron en FUSE-394 y el TCE de control sin desacoplamiento, FUSE-399.

Las Figuras 70A-70E ilustran la capacidad de un TCE ilustrativo para inducir la destrucción mediada por células T de células tumorales ROR1 positivas (MDA-MB-231; Figura 70A), células tumorales ROR1 negativas (T-47D; Figura 70B) y una mezcla de células tumorales ROR1 positivas y células tumorales ROR1 negativas (Figura 70C y Figura 70D). Para este último, la destrucción del tumor ROR1 positivo se muestra en la Figura 70C. La destrucción del tumor ROR1 negativo se denomina “destrucción de células espectadoras”,

cuya comparación con un TCE sin desacoplamiento se muestra en la Figura 70D. La Figura 70E ilustra la producción de IFN©por las mismas células T usadas para evaluar la "destrucción de células espectadoras" en función de la concentración de TCE ilustrativa.

La Figura 71A-71B ilustra (a) el porcentaje de destrucción de células tumorales ROR1 positivas (MDA-MB-231) en función del número de células T (Figura 71A) en el contexto de los TCE ilustrativos y (b) la "destrucción en serie" mediada por TCE calculada como el número promedio de células tumorales ROR1-positivas inducidas por TCE eliminadas por la célula T en un período de 24 horas (Figura 71B).

La Figura 72 representa la afinidad de unión aparente (unión a EC50) del VHH-Fc específico de ROR1 que incorpora o bien el clon VHH no humanizado 5A1 (FUSE179; círculo negro), el clon humanizado 5A1-FA9-HK1 (FUSE559; cuadrado negro) o el clon humanizado 5A1-HK1 (FUSE524; triángulo negro) se calculó.

Las Figuras 73A-73B ilustran la afinidad (KD) del VHH-Fc específico de ROR1 que incorpora o bien el clon VHH no humanizado 5A1 (FUSE179; Figura 73A) o el clon humanizado 5A1-FA9-HK1 (FUSE559; Figura 73B) se calculó. Las Figuras C-74A-74B ilustran la aparente afinidad de unión (unión a EC50) de los dos anticuerpos biespecíficos (bsAb).

Las Figuras 75A-75B ilustran la capacidad de varios bsAb específicos de ROR1 x CD3 para inducir (1; Figura 75A) la destrucción mediada por células T de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231 y (2; Figura 75B) la liberación mediada por células T de IFNγ cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231.

Las Figuras 76A-76I ilustran la capacidad de varios bsAb específicos de ROR1 x CD3 para inducir (1; Figuras 76A-76D) la destrucción mediada por PBMC de cuatro líneas celulares tumorales diferentes y (2); Figuras 76E-76H), liberación mediada por PBMC de IFNγ cuando se mezcla conjuntamente con las células tumorales antes mencionadas.

Las Figuras 77A-77F ilustran la capacidad de varios bsAb específicos de ROR1 x CD3 para inducir (1; Figura 77A) la destrucción mediada por PBMC de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231 y (2; Figura 77B), la liberación mediada por PBMC de IFNγ cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, (3. Figura 77C) la regulación positiva de la expresión de CD69 en la superficie celular en células T dentro de PBMC cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, (4. Figura 77D) la regulación positiva de la expresión de PD-1 en la superficie celular en células T dentro de PBMC cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, y (5. Figura 77E) la regulación positiva de la expresión de TIGIT en la superficie celular en células T dentro de PBMC cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231.

Las Figuras 78A-78C ilustran la capacidad de FUSE399 (triángulo inverso negro) y FUSE608 (círculo negro) para inducir la destrucción mediada por células T CD8+ de un número constante (5000 células) de células ROR1+ MDA-MB-231 en un rango de números de células T CD8+ de 313 a 40.000.

Las Figuras 79A-22D ilustran si FUSE608 indujo la destrucción de células espectadoras de tumores negativos para ROR1 mezclados conjuntamente con tumores positivos para ROR1.

Las Figuras 80A-80B ilustran la capacidad de FUSE608 y el bsAb de referencia sin desacoplamiento anti-ROR1 × CD3, FUSE399, para mediar la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) en un modelo de xenoinjerto tumoral de ratón.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad, como si estuviesen completamente establecidas. A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que les otorga comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Singleton *et al*., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed.*, *Revised*, J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); y Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012), proporciona al experto en la técnica una guía general sobre muchos de los términos usados en la presente solicitud. Para obtener referencias sobre cómo preparar anticuerpos, consulte D. Lane, *Anticuerpos: A Laboratory Manual 2nd ed.* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 2013); Kohler y Milstein, (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511; Queen et al. patente de los EE. UU. núm. 5.585.089; y Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988); las patentes de los EE. UU. núm. 4.946.778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Ward *et al.*, Nature 334:544-54 (1989); Tomlinson I. y Holliger P. (2000) Methods Enzymol, 326, 461-479; Holliger P. (2005) Nat. Biotechnol. Sep;23(9):1126-36).

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Como se usa en la presente, el término ‘‘aproximadamente’’ cuando se usa en conexión con una indicación numérica referenciada significa la indicación numérica

referenciada más o menos hasta el 5 % de esa indicación numérica referenciada, a menos que se proporcione específicamente de cualquier otra manera en la presente. Por ejemplo, el lenguaje "aproximadamente 50 %" cubre el rango de 45 % a 55 %. En diversas modalidades, el término "aproximadamente" cuando se usa en conexión con una indicación numérica referenciada puede significar la indicación numérica referenciada más o menos hasta 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,25 % de esa indicación numérica referenciada, *si* se proporciona específicamente en las reivindicaciones.

El porcentaje (%) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia es 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, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras conocidas, por ejemplo, usando un software informático disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Pueden determinarse los parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen los algoritmos necesarios para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Como se usa en la presente, el término "región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina" se usa indistintamente con el término "región Fc" y se entiende que significa la porción carboxilo-terminal de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, o un análogo o porción de esta capaz de unirse a un receptor de Fc. Cada región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende cuatro o cinco dominios. Los dominios se nombran secuencialmente de la siguiente manera: CH1-bisagra-CH2-CH3(-

CH4). CH4 está presente en IgM, que no tiene región bisagra. La región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina adecuada para la invención comprende preferentemente una región bisagra de inmunoglobulina, y preferentemente también incluye un dominio CH3. La región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende con la máxima preferencia una región bisagra de inmunoglobulina, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Como se usa en la presente, el término "región bisagra" de inmunoglobulina se entiende que significa una región bisagra de inmunoglobulina completa o al menos una porción de la región bisagra de inmunoglobulina suficiente para formar uno o más enlaces disulfuro con una segunda región bisagra de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente, el término "vector" se entiende que significa cualquier ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos competente para ser incorporado en una célula huésped y para ser recombinada e integrada en el genoma de la célula huésped, o para replicarse de manera autónoma como un episoma. Tales vectores incluyen ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagómidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores virales y lo similar. Los ejemplos no limitantes de un vector viral incluyen un retrovirus, un adenovirus y un virus adenoasociado.

Como se usa en la presente, el término "expresión génica" o "expresión" de una proteína o polipéptido se entiende que significa la transcripción de una secuencia de ADN, la traducción de la transcripción de ARNm y la secreción de un producto de proteína o polipéptido. En algunas modalidades, el proceso de expresión también incluye o va seguido de purificación; por ejemplo, se puede usar cromatografía de afinidad de proteína A u otros medios tales como cromatografía de exclusión por tamaño para la purificación.

El término "enlazador" con respecto al enlazador de aminoácidos en un polipéptido puede ser un péptido corto, tal como un dímero de dos aminoácidos, un trímero de

tres aminoácidos, un 4-mero de cuatro aminoácidos, un 5-mero de cinco aminoácidos o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), y (GGGGX_λ (sec. con núm. de ident.: 236))n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud. Ejemplos adicionales incluyen (X_λGGGG (sec. con núm. de ident.: 317))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λGGG (sec. con núm. de ident.: 318))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λGG (sec. con núm. de ident.: 319))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX_λG (sec. con núm. de ident.: 320))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X_λGGG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λGG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX_λ)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X_λGG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λ)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades. Ejemplos aun adicionales incluyen (X_λG)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λ)n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Como ejemplos adicionales, el polipéptido corto tiene 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o enlazadores flexibles o cadena de aminoácidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos es un propéptido IL-18 o una variante de propéptido IL-18. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos es un fragmento de un propéptido de IL-18 o una variante de propéptido de IL-18; por ejemplo, aproximadamente 30-36 aminoácidos de longitud, aproximadamente 5-10, 11-20, 21-30, o 31-40 aminoácidos de longitud.

Como se usa en la presente, el término ‘‘cis’’ en el contexto de interacciones se refiere a la interacción entre dos moléculas en la misma célula, tales como proteínas expresadas en la misma célula. Un ejemplo no limitante es la interacción entre B7-1 y PD-L1. La interacción ‘‘Cis’’ como se usa en la presente también incluye proteínas multiespecíficas que se unen a dos proteínas en la misma célula simultáneamente.

Como se usa en la presente, el término ‘‘trans’’ en el contexto de interacciones se refiere a la interacción entre dos moléculas en diferentes células, tales como proteínas en diferentes células. Un ejemplo no limitante es la interacción entre la interacción prototípica del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) y su ligando, un complejo MHC-I/péptido. La interacción ‘‘trans’’ como se usa en la presente también incluye proteínas multiespecíficas que se unen a una proteína en una célula y una segunda proteína en una célula separada; por lo tanto, se consideraría que un ‘‘puente’’ ocurre en trans. También se incluye como interacción ‘‘trans’’ una interacción entre una proteína soluble y una proteína de superficie celular, aunque no formando un puente celular.

Como se usa en la presente, ‘‘proteína de fusión IL-18’’ se refiere a una proteína de fusión que incluye variantes de IL-18 silvestre o IL-18, a menos que se indique específicamente que solo incluye la IL-18 silvestre, o que solo incluye la variante de IL-18. Por lo tanto, en modalidades particulares, la ‘‘proteína de fusión IL-18’’ solo incluye una cualquiera de las variantes de IL-18 como se describe en la presente.

“Anticuerpo” se refiere a todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD, e IgY) que incluyen varias formas monoméricas, poliméricas y quiméricas a menos que se especifique de cualquier otra manera. El término “anticuerpo” comprende específicamente los anticuerpos VHH o los anticuerpos nanocuerpo que consisten en fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos de cadena pesada únicamente fusionados a un Fc, donde los VHH se derivan preferiblemente de camélidos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) y polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.

“Fragmentos de unión al antígeno” o “fragmentos de unión al antígeno biespecíficos” son cualquier estructura proteica que puede exhibir afinidad de unión por un antígeno particular. Los fragmentos de unión al antígeno incluyen los proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tales como técnicas de clivaje, de síntesis de péptidos, y recombinantes. Algunos fragmentos de unión al antígeno se componen de porciones de anticuerpos intactos que retienen la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo parental. Por ejemplo, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender al menos una región variable (ya sea una región variable de cadena pesada o cadena ligera) o una o más CDR de un anticuerpo conocido para unirse a un antígeno particular. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno adecuados incluyen, sin limitación, diacuerpos, moléculas Fab, F(ab’)2, Fc, Fabc y Fv, anticuerpos de cadena simple (Sc, por sus siglas en inglés), cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos o CDR y otras proteínas, andamiajes de proteínas, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente,

fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V_H y C_{H1}; un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios V_L y V_H de un brazo único de un anticuerpo, un fragmento dAb (p. ej., Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio $_H$ y se denomina, además, anticuerpos de dominios (p. ej., Holt et al; Trends Biotechnol. noviembre de 2003; 21(11):484-90); VHH de camélidos o nanocuerpos (p. ej., Revets et al; Expert Opin Biol Ther. Enero de 2005; 5(1):111-24); una región determinante complementaria aislada (CDR, por sus siglas en inglés), y lo similar. Todos los isotipos de los anticuerpos pueden usarse para producir fragmentos de unión al antígeno. Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden incluir marcos proteicos que no son anticuerpos que pueden incorporar con éxito segmentos de polipéptidos en una orientación que confiere afinidad por un antígeno de interés determinado, tales como los supercóntigos de proteínas (p. ej., un par receptor-ligando; por ejemplo, una fusión PD1-Fc se dirigiría a PDL1 y PDL2). Los fragmentos de unión al antígeno pueden producirse de manera recombinante o producirse mediante clivaje enzimático o químico de anticuerpos intactos. La frase ‘‘un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este’’ podría usarse para indicar que un fragmento de unión al antígeno dado incorpora uno o más segmentos de aminoácidos del anticuerpo al que se hace referencia en la frase.

‘‘VHH’’ se refiere al dominio variable único en una cadena pesada. También se le puede denominar como nanocuerpo. El VHH (o nanocuerpo) incluye tres dominios CDR que constituyen la mayor parte del parátopo o fragmento de unión al antígeno de solo los anticuerpos de cadena pesada (HcAb, por sus siglas en inglés). Generalmente, el HcAb es producido naturalmente por camélidos y tiburones.

“Fragmento variable de cadena sencilla” o “scFv” se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de las inmunoglobulinas, conectada con un péptido enlazador flexible corto (generalmente de diez a 25 aminoácidos de longitud).

En el estudio de farmacocinética, la vida media (t1/2) generalmente se refiere al tiempo que necesita la concentración del fármaco para disminuir en un 50 %. “T1/2 alfa” se refiere a la vida media de la fase de distribución, mientras que “T1/2 beta” se refiere a la vida media de las fases de eliminación. Por algunas descripciones, la vida media alfa es la tasa de disminución de las concentraciones plasmáticas debido al proceso de redistribución del fármaco desde el compartimento central al periférico, y la vida media beta es la tasa de disminución debido al proceso de eliminación del fármaco debido al metabolismo. Durante la fase de distribución, los cambios en la concentración del fármaco en plasma reflejan principalmente el movimiento del fármaco desde la circulación hacia los compartimentos internos, en lugar de la pérdida del cuerpo. Sin embargo, una vez que el fármaco en el plasma y los tejidos ha alcanzado el equilibrio, la disminución de la concentración plasmática es impulsada por la eliminación del fármaco del organismo, denominada fase de eliminación (fase tardía).

“ROR1” (receptor huérfano 1 similar al receptor de tirosina quinasa) se refiere al miembro 106-kDa de la familia del receptor de tirosina quinasa que tiene un número de acceso UniProt Q01973 (humano) y Q9Z139 (ratón).

El término “CD3” se refiere al complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 humana. El complejo de múltiples subunidades de la proteína CD3 se compone de 6 cadenas polipeptídicas distintivas. Estas incluyen una cadena CD3γ (p. ej., SwissProt P09693), una cadena CD3δ (p. ej., SwissProt P04234), dos cadenas CD3ε (SwissProt P07766), y un homodímero de la cadena de CD3ζ (p. ej., SwissProt 20963), y

que se asocia con la cadena α y β del receptor de células T. CD3 se agrupó además con el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) o complejo TCR/CD3, que representa el receptor de activación clave expresado en las células T. Por lo tanto, la reticulación de CD3 o el TCR da como resultado vías de señalización similares y activación de las células T. El término "CD3" incluye cualquier variante, isoforma y especie homóloga de CD3 que se expresa de forma natural por las células (que incluyen las células T) o puede expresarse en células transfectadas con los genes o ADNc que codifican los polipéptidos, a menos que se indique.

"Inmunoespecíficamente", cuando se usa en el contexto de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, representa la unión a través de dominios codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina a uno o más epítopos de una proteína de interés, sin unirse preferentemente a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas. Las frases, tales como "anticuerpo anti-[antígeno]" (p. ej., anticuerpo anti-ROR1) o "anticuerpo específico de [antígeno]" (p. ej., anticuerpo específico de ROR1" tienen como objetivo transmitir que el anticuerpo mencionado se une específicamente al antígeno mencionado.

"Aislado" significa que un componente biológico (tal como un anticuerpo) se ha separado, producido separado de, o purificado lejos de, sustancialmente, otros componentes biológicos del organismo en el que el componente es de origen natural, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, y proteínas. Por lo tanto, los anticuerpos que se han "aislado" incluyen anticuerpos purificados mediante métodos de purificación estándar. Los "anticuerpos aislados" pueden ser parte de una composición y aún aislarse si dicha composición no es parte del entorno nativo del anticuerpo. El término

comprende, además, anticuerpos preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como anticuerpos químicamente sintetizados.

Proteínas de fusión

Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión que comprende un polipéptido de supercóntigo y al menos dos de: (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más de un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1). En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión que comprende un polipéptido de supercóntigo y al menos dos de: (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la variante de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18. Los polipéptidos capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un TAA incluyen los descritos en la presente, y los conocidos en la técnica.

Diversas modalidades proporcionan una proteína de fusión que comprende un polipéptido de supercóntigo y al menos dos de: (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18 o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más fragmentos dirigidos al punto de control inmunológico. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, el uno o más polipéptidos capaces de unirse al TAA comprenden un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1). En diversas modalidades, el TAA comprende EGFR, HER2 o DLL. Los polipéptidos capaces de unirse al TAA incluyen los descritos en la presente y los conocidos en la técnica.

En diversas modalidades, el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, o el receptor coestimulador comprende el grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp46, NKG2D, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L, o CD40. En consecuencia, los polipéptidos capaces de unirse a estos receptores de activación o receptores coestimuladores incluyen los descritos en la presente y los conocidos en la técnica.

En diversas modalidades, los puntos de control inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3. En diversas modalidades, uno o más fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios comprenden fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios de anticuerpos conocidos. Los ejemplos de fragmentos anti-PD1 incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, spartalizumab, cemiplimab, penpulimab (AK105), prolgolimab (BCD-100), ezabenlimab (BI 754091), toripalimab (JS001), lipustobart (LZM009), retifanlimab (MGA012), Sym021, dostarlimab (TSR-042), tebotelimab (MGD013), cadonilimab (AK104), vudalimab (XmAb20717), tislelizumab, o PF-06801591. Los ejemplos adicionales de fragmentos anti-PD1 también incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de vopratelimab, camrelizumab, sintilimab, AMP-224, AMP-514 y acrixolimab. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, garivulimab (BGB-A333), cosibelimab (CK-301), FAZ053, envafolimab (KN035), MDX-1105, betifisolimab (MSB2311), adebrelimab (SHR-1316), atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559, CK-301 y M7824. Por lo tanto, por ejemplo, la proteína de fusión

comprende un fragmento anti-PD1 de un anticuerpo anti-PD1 (p. ej., Fab, Fv), una variante de IL-18, y una variante de IL-15 y, opcionalmente, un enlazador.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y (a) uno o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) uno o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y los tres de (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más de un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1). En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y los tres de (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y los tres de (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la una o más de la variante de IL-15 es 2, 3, 4, 5 o 6, o hasta 8 variantes de IL-15. En diversas modalidades, el uno o más de las una o más de la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 es 2, 3, 4, 5 o 6, o hasta 8. En diversas modalidades, el uno o más del VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1) es 2, 3, 4, 5 o 6, o hasta 8.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, NKp46 o NKG2D, y en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L y CD40.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el polipéptido de supercóntigo y (a) la una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o (c) uno o más de un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1).

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el polipéptido de supercóntigo y (a) la una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el polipéptido de supercóntigo y (a) uno o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, y (c) uno o más fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), se fusionan cada uno independientemente al extremo C del polipéptido de supercóntigo.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), se fusionan cada uno independientemente al extremo N del polipéptido de supercóntigo.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la IL-18, el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, y los polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o el uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA) se fusionan cada uno independientemente al extremo C del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la IL-18, el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, y los polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o el uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a

tumores (TAA) se fusionan cada uno independientemente al extremo N del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la IL-18, el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, y el fragmento dirigido a puntos de control inmunitarios se fusionan cada uno independientemente al extremo C del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-15, la IL-18, el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, y el fragmento dirigido a punto de control inmunitario se fusionan cada uno independientemente al extremo N del polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, (b) es una o más variantes de IL-18.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, y la variante de IL-15, la IL-18, el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18 o el fragmento de la variante de IL-18, y los polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o el uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA), se fusionan cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de una cadena pesada o una cadena ligera, o fusionada a uno cualquiera de un dominio C_H2, o región bisagra del anticuerpo.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, y la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18 o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), se fusionan cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de una cadena pesada o una cadena ligera, o se fusionan a uno cualquiera de un dominio C_H2 o región bisagra del anticuerpo.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, y la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el fragmento dirigido a puntos de control inmunitarios, se fusionan cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de una cadena pesada o una cadena ligera, o fusionado a uno cualquiera de un dominio C_H2, o región bisagra del anticuerpo.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc, y la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o los polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o el uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA), cada uno está fusionado independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de la región Fc.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc, y la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), se fusionan cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de la región Fc.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc, y la variante de IL-15, la interleucina 18 (IL-18), el fragmento de la IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18, o el fragmento dirigido a puntos de control inmunitarios, se fusionan cada uno independientemente a uno cualquiera de uno de un extremo C o un extremo N de la región Fc.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo o un fragmento de este. En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgM, IgG, o IgE. Los ejemplos adicionales de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos y de cadena sencilla (ScFv). Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (que incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados). Preferentemente, los anticuerpos son humanos o anticuerpos humanizados.

En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, espartalizumab, cemiplimab, penpulimab (AK105), prolgolimab (BCD-100), ezabenlimab (BI 754091), toripalimab (JS001), lipustobart (LZM009), retifanlimab (MGA012), Sym021, dostarlimab (TSR-042), tebotelimab (MGD013), cadonilimab (AK104), vudalimab (XmAb20717), tislelizumab, PF-06801591 y anticuerpo anti-PD1 que expresa linfocitos T asesinos pluripotentes (PIK-PD-1). Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, garivulimab (BGB-A333), cosibelimab (CK-301), FAZ053, envafolimab (KN035), MDX-1105, betifisolimab (MSB2311), adebrelimab (SHR-1316), atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559, CK-301 y M7824.

En diversas modalidades, dos brazos (o cadenas) de regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden heterodimerizarse creando mutaciones de "botón en ojal" (KiH) en el dominio CH3. Esta característica estructural en los brazos polipeptídicos permite la unión de dos semianticuerpos (p. ej., heterodímero Fc; y dominios VH–CH y VL–CL). Por ejemplo, un heteromultímero (que incluye un heterodímero) puede comprender dos polipéptidos, cada uno de los cuales comprende un dominio CH3, en

donde los polipéptidos se encuentran en una interfaz diseñada genéticamente dentro del dominio CH3, y un polipéptido contiene una protuberancia diseñada genéticamente (“botón”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo original, y otro polipéptido contiene una cavidad diseñada genéticamente (“orificio”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo original. En algunas modalidades, la interfaz diseñada genéticamente de un heteromultímero incluye al menos dos pares mutantes de protuberancia dentro de la cavidad. Los volúmenes y áreas superficiales accesibles de cada aminoácido se describen en *A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol*. 24: 107-123, 1972 y C. Chothia, *J. Mol. Biol*. 105: 1-14, 1975. Por ejemplo, los residuos de importación para la formación de una protuberancia pueden ser arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W); y preferentemente el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un pequeño volumen de cadena lateral, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Como otro ejemplo, los residuos de importación para la formación de una cavidad pueden ser alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V); y preferentemente el residuo original para la formación de la cavidad tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Por ejemplo, una mutación T366W en el dominio CH3 para la cadena de “botón” /protuberancia, y una mutación T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 para la cadena “ojal” /cavidad. Adicionalmente, la configuración KiH puede combinarse con mutaciones adicionales para permitir el enlace disulfuro S-S entre las dos cadenas. En diversos aspectos en donde la proteína/polipéptido es un heterodímero de una configuración KiH, la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está ligada a una, y solo una, de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas (es decir, botón u ojal).

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región de fragmento cristalizable (Fc) o un fragmento de esta. En diversas modalidades, la región de fragmento cristalizable (Fc) es una región Fc de una IgG4, Fc de botón en ojal (KiH) o IgG1. En diversas modalidades, la región de fragmento cristalizable (Fc) es un Fc de botón en ojal (KiH).

En diversas modalidades, la región Fc es una región Fc de una IgG4, Fc de botón en ojal (KiH) o IgG1. En diversas modalidades, la región Fc puede ser una IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

En algunas modalidades, los dos o más brazos (o cadenas) de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden contener otro diseño de complementariedad estérica simétrica a asimétrica (p. ej., HA-TF, ZW1), una interacción de intercambio de carga a carga (DD-KK), un intercambio de complementariedad carga-estérico más una interacción electrostática adicional de largo alcance (p. ej., EW-RVT), o un diseño de intercambio de cadena de isotipo (p. ej., dominio diseñado para intercambio de cadenas (SEED, por sus siglas en inglés)), o Xmab, 7.8.60, dirección electrostática, A107 o Duobody, para formar heterodímeros/heteromultímeros. Se observa una descripción adicional de estas configuraciones y mutaciones/residuos ilustrativos en *Front Immunol.* 2016; 7: 394.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo se selecciona de la región de fragmento cristalizable (Fc), albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de unión al antígeno de fragmentos (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena única (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio de unión de esta y un fragmento de esta.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un polipéptido o proteína capaz de translocarse en un retículo endoplásmico (ER), o un fragmento de este.

En la presente se describen detalles y modalidades adicionales del polipéptido de supercóntigo y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En diversas modalidades, la variante de IL-15 comprende la secuencia de la Fórmula I:

X_1WVX$_4$VISDLKKIEDLIQSMHIX$_{22}$ATLYTESX$_{30}$VHPSCKVTAMX$_{41}$CFLX$_{45}$ELQX$_{49}$ISLX$_{53}$SGDASIHDTVX$_{64}$NLX$_{67}$X$_{68}$LANNSLSSNGX$_{79}$VTESGCKECEELEX$_{93}$KNIKEFLQSX$_{103}$VHIVX$_{108}$MFIX$_{112}$TS, en donde

X_1 es cualquier aminoácido,

X_4 es cualquier aminoácido,

X_{22} es cualquier aminoácido,

X_{30} es cualquier aminoácido,

X_{41} es cualquier aminoácido,

X_{45} es cualquier aminoácido,

X_{49} es cualquier aminoácido excepto V,

X_{53} es cualquier aminoácido excepto E,

X_{64} es cualquier aminoácido,

X_{67} es cualquier aminoácido,

X_{68} es cualquier aminoácido,

X_{79} es cualquier aminoácido,

X_{93} es cualquier aminoácido,

X_{103} es cualquier aminoácido,

X_{108} es cualquier aminoácido, y

X_{112} es cualquier aminoácido; (sec. con núm. de ident.: 533).

Detalles y modalidades adicionales del componente variante de IL-15 de la proteína de fusión se describen en la presente y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones de aminoácidos 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPP DNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMF TVQNED (sec. con núm. de ident.: 250) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de la sec. con núm. de ident.: 250. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una sustitución de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son dos sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son tres sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cuatro sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cinco sustituciones de aminoácidos. En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende no más de cinco sustituciones de aminoácidos, con la excepción de sustituir las cisteínas. En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones de aminoácidos 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM

FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de la sec. con núm. de ident.: 251.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en posiciones de aminoácidos 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones C74, C104, C112, y C164, y de una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149.

En diversas modalidades, las sustituciones de aminoácidos en una o más de C74, C104, C112, y C164 se sustituyen cada una independientemente con valina, alanina o serina. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una o más de: E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; o M149V o M149I. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; y M149V o M149I.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende una variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B. En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B, comprende además un propéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna propéptido en la Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18. En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B y el propéptido seleccionado de la Tabla 6B, comprende además un péptido de escisión seleccionado de la

Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18 y el propéptido. Como ejemplo particular, se puede usar IEQD (sec. con núm. de ident.: 88).

En diversas modalidades, la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 pueden comprender además su propéptido (PP) o una variante de PP. En diversas modalidades, el PP o la variante de PP pueden estar en el extremo N-terminal en relación con la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además uno o más sitios de escisión y la proteína de fusión se escinde en el uno o más sitios de escisión por una o más proteasas.

En diversas modalidades, el uno o más sitios de escisión están entre la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18 y el polipéptido de supercóntigo, o dentro del PP, entre PP o la variante de PP y la IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o dentro del PP, entre el PP o la variante de PP y el polipéptido de supercóntigo, o dentro de IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, o dentro del PP, o una combinación de estos.

Detalles y modalidades adicionales de la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento del componente variante de IL-18 de la proteína de fusión se describen en la presente y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En diversas modalidades, el VHH contra ROR1 comprende: un polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 (región determinante de complementariedad (CDR) 1 de 2A11), un polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326 (CDR2 de 2A11), un polipéptido

que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 (CDR3 de 2A11), o una combinación de estos; **O** una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 (CDR1 de 2A11), una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326 (CDR2 de 2A11), una variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 (CDR3 de 2A11), o una combinación de estas, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 comprende una o más deleciones, adiciones o una sustitución de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326 comprende una o más deleciones, adiciones o una sustitución de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 326, en donde la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 comprende una o más deleciones, adiciones o una sustitución de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327, y en donde: la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **no** reemplazan los residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327, o la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y la variante del polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **reemplaza** uno o ambos residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 325 y/o uno o ambos residuos de cisteína en el polipéptido que tiene la sec. con núm. de ident.: 327 **con** un aminoácido que contiene un grupo funcional para reticulación.

Detalles y modalidades adicionales del componente VHH contra ROR1 de la proteína de fusión se describen en la presente y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En modalidades en donde la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) una o más de

una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18 o un fragmento de la variante de IL-18, la (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18 pueden ser como se describe en la presente y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En modalidades en donde la proteína de fusión comprende el polipéptido de supercóntigo y (a) uno o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) una o más de una variante de IL-18, la (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15) y (b) una o más de una variante de IL-18 pueden ser como se describe en la presente y se pretende que se incluyan como modalidades para estas proteínas de fusión de múltiples citocinas.

En diversas modalidades, la proteína de fusión, que comprende el polipéptido de supercóntigo y (a) uno o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) uno o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, se selecciona de la Tabla 3A. Por ejemplo, la proteína de fusión es FUSE-697, FUSE-916, FUSE-923, FUSE-943, FUSE-944, FUSE-1145, FUSE-1146, FUSE-1124 o FUSE 1136.

En diversas modalidades, la proteína de fusión, que comprende el polipéptido de supercóntigo y (a) una o más de una variante de interleucina 15 (IL-15), y (b) una o más de una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, está codificada por un polinucleótido seleccionado de la Tabla 3B. Por ejemplo, la proteína de fusión es FUSE-697, FUSE-916, FUSE-923, FUSE-943, FUSE-944, FUSE-1145, FUSE-1146, FUSE-1124 o FUSE 1136.

Polinucleótidos, vectores de expresión, células y métodos de producción de proteínas de fusión.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una cualquiera de las proteínas de fusión de la presente invención como se describe en la presente.

Diversas modalidades proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos de la presente invención como se describe en la presente.

Diversas modalidades proporcionan una célula transfectada con uno cualquiera de los vectores de expresión de la presente invención como se describe en la presente. En diversas modalidades, la célula es una célula de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0 (una línea celular de mieloma de ratón), células PER.C6® y células de riñón embrionario humano (células HEK). En diversas modalidades, la célula es una célula bacteriana o célula de levadura.

Diversas modalidades proporcionan un método para producir una cualquiera de las proteínas de fusión de la presente invención descritas en la presente, que comprende: cultivar una cualquiera de las células de la presente invención descritas en la presente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la proteína de fusión, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular. En diversas modalidades, el método comprende además aislar la proteína de fusión. En diversas modalidades, el método comprende además purificar la proteína de fusión.

En algunas modalidades, usando un sistema de expresión de ovario de hámster chino (CHO), la proteína de fusión se produce a través de un proceso que incluye las etapas de: (1) recuperación celular, que puede ser para recuperar las células CHO congeladas a través de un baño de agua a 37 °C; (2) subcultivo celular, que puede ser subcultivar las células y ajustar la densidad celular a 6×10^6/ml para la transfección; (3) transfección y expresión, usando una solución 1 (en la que se diluye un plásmido con un agente diluyente), una solución 2 (en la que se diluye un reactivo de transección con un/el

agente diluyente), y después mezclar la solución 1, la solución 2 y las células CHO, seguido por la incubación de la mezcla en un agitador para su expresión durante 12-14 días a 32 °C para recolectar el sobrenadante del cultivo después del centrifugado.

En algunas modalidades, se realiza un proceso de purificación después de la expresión de la proteína de fusión. En algunas modalidades, un proceso de purificación incluye las etapas de: (1) lavar una columna con un regulador de unión (10 veces el volumen) a un caudal de 1 ml/min; (2) cargar una muestra que contiene proteína de fusión en la columna a un caudal de 1 ml/min; (3) lavar la columna con 10x volúmenes de regulador PBS con un caudal de 1 ml/min; (4) eluir la proteína de la columna con citrato de sodio a 40 mM (pH3,4); opcionalmente, la muestra de elución puede recolectarse en tubos (1 ml/min) y medirse para la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) usando NanoDrop a 280 nm; y (5) realizar diálisis, p. ej., contra el regulador PBS en una bolsa de diálisis durante la noche.

Métodos de uso

Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar una cualquiera de la proteína de fusión de la presente invención descrita en la presente, a un sujeto que la necesita. La expansión de las células T, células B o células destructoras naturales (NK), no requiere la unión al antígeno asociado al tumor, tal como ROR1. En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cualquiera de la proteína de fusión de la presente invención descrita en la presente, a un sujeto que la necesita. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer.

Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar al menos dos de lo siguiente a un sujeto que lo necesita: (a) variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15, (b) interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18, y (c) un constructo de anticuerpo multiespecífico que comprende un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse al receptor un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, NKp46 o NKG2D, y en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende el grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L y CD40. En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer. La expansión de las células T, células B o células destructoras naturales (NK), no requiere la unión al antígeno asociado al tumor, tal como ROR1.

Diversas modalidades proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar al menos dos de lo siguiente a un sujeto que lo necesita: (a) variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15, (b) interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18, (c) un constructo de anticuerpo multiespecífico que comprende un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, NKp46 o NKG2D, y en

donde opcionalmente, el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L y CD40, y (d) uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer. La expansión de las células T, células B o células destructoras naturales (NK), no requiere la unión al antígeno asociado al tumor, tal como ROR1.

Un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, administrando al menos dos de los siguientes a un sujeto que lo necesita: (a) variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15, (b) interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18, y (c) un constructo de anticuerpo multiespecífico que comprende un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y un polipéptido de unión al receptor capaz de unirse al receptor un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, NKp46 o NKG2D, y en donde opcionalmente el receptor coestimulador comprende el grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L y CD40. En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer.

Un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, administrando al menos dos de los siguientes a un sujeto que lo necesita: (a) variante de interleucina 15 (IL-15) o proteína de fusión IL-15, (b) interleucina 18 (IL-18), un fragmento de la IL-18, variante de IL-18, un fragmento de la variante de IL-18, o una proteína de fusión IL-18, (c) un constructo de anticuerpo multiespecífico que comprende un VHH del receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), y un polipéptido de unión al

receptor capaz de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, en donde opcionalmente el receptor de activación comprende un grupo de diferenciación (CD) 3, CD16, NKp46 o NKG2D, y en donde opcionalmente, el receptor coestimulador comprende un grupo de diferenciación (CD) 137, CD28, DNAM-1, NKp30, CD2, ICOS, OX40, CD40L y CD40, y (d) uno o más polipéptidos de unión al receptor capaces de unirse a un receptor de activación y/o un receptor coestimulador expresado en una célula inmunitaria, o uno o más polipéptidos capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA). En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer.

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer que expresa ROR1, tal como cáncer de pulmón, cáncer hematológico, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, melanoma, cáncer de tiroides, leucemia mieloide, linfoma de células del manto, o mieloma múltiple. El cáncer que expresa ROR1 puede ser un cáncer de pulmón, tal como el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). El cáncer que expresa ROR1 puede ser un cáncer hematológico, tal como leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS, de bajo o alto riesgo), leucemia linfocítica aguda (ALL, que incluye todos los subtipos), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), leucemia mieloide crónica (CML) o neoplasia blástica de células dendríticas plasmacitoides (DPDCN). El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer de mama. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer de próstata. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer pancreático. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer de colon. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer ovárico. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer renal. El cáncer que expresa ROR1 puede ser cáncer de útero. El ROR1 que expresa el cáncer puede ser melanoma.

Detalles y modalidades de la variante de IL-15

En la presente se describen variantes de IL-15 que pueden usarse en las proteínas de fusión de múltiples citocinas de la invención. Diversas modalidades proporcionan una variante de interleucina 15 (IL-15) que comprende la secuencia de la Fórmula I:

X_1WVX$_4$VISDLKKIEDLIQSMHIX$_{22}$ATLYTESX$_{30}$VHPSCKVTAMX$_{41}$CFLX$_{45}$ELQX$_{49}$ISLX$_{53}$S GDASIHDTVX$_{64}$NLX$_{67}$X$_{68}$LANNSLSSNGX$_{79}$VTESGCKECEELEX$_{93}$KNIKEFLQSX$_{103}$VHIVX $_{108}$MFIX$_{112}$TS, en donde

X_1 es cualquier aminoácido,

X_4 es cualquier aminoácido,

X_{22} es cualquier aminoácido,

X_{30} es cualquier aminoácido,

X_{41} es cualquier aminoácido,

X_{45} es cualquier aminoácido,

X_{49} es cualquier aminoácido excepto V,

X_{53} es cualquier aminoácido excepto E,

X_{64} es cualquier aminoácido,

X_{67} es cualquier aminoácido,

X_{68} es cualquier aminoácido,

X_{79} es cualquier aminoácido,

X_{93} es cualquier aminoácido,

X_{103} es cualquier aminoácido,

X_{108} es cualquier aminoácido, y

X_{112} es cualquier aminoácido; (sec. con núm. de ident.: 533).

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N (sec. con núm. de ident.: 534), X_4 es N (sec. con núm. de ident.: 535), X_{22} es D (sec. con núm. de ident.: 536), X_{30} es D (sec. con núm. de ident.: 537), X_{41} es K (sec. con núm. de ident.: 538), X_{45} es L (sec. con núm. de ident.: 539), X_{64} es E (sec. con núm. de ident.: 540), X_{67} es I (sec. con núm. de ident.: 541), X_{68} es I (sec. con núm. de ident.: 542), X_{79} es N (sec. con núm. de ident.: 543), X_{93} es E (sec. con núm. de ident.: 544), X_{103} es F (sec. con núm. de ident.: 545), X_{108} es Q (sec. con núm. de ident.: 546), o X_{112} es N (sec. con núm. de ident.: 547), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N (sec. con núm. de ident.: 534), X_4 es N (sec. con núm. de ident.: 535), X_{22} es D (sec. con núm. de ident.: 536), X_{30} es D (sec. con núm. de ident.: 537), X_{41} es K (sec. con núm. de ident.: 538), X_{45} es L (sec. con núm. de ident.: 539), X_{49} es R o K (sec. con núm. de ident.: 548), X_{53} es G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549), X_{64} es E (sec. con núm. de ident.: 540), X_{67} es I (sec. con núm. de ident.: 541), X_{68} es I (sec. con núm. de ident.: 542), X_{79} es N (sec. con núm. de ident.: 543), X_{93} es E (sec. con núm. de ident.: 544), X_{103} es F (sec. con núm. de ident.: 545), X_{108} es Q (sec. con núm. de ident.: 546), o X_{112} es N (sec. con núm. de ident.: 547), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N o G (sec. con núm. de ident.: 550), X_4 es N, K o L (sec. con núm. de ident.: 551), X_{22} es D o A (sec. con núm. de ident.: 552), X_{30} es D o N (sec. con núm. de ident.: 553), X_{41} es K o Q (sec. con núm. de

ident.: 554), X_{45} es L o S (sec. con núm. de ident.: 555), X_{49} es R o K (sec. con núm. de ident.: 548), X_{53} es G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549), X_{64} es E o Q (sec. con núm. de ident.: 556), X_{67} es I o T (sec. con núm. de ident.: 557), X_{68} es I o S (sec. con núm. de ident.: 558), X_{79} es N o Y (sec. con núm. de ident.: 559), X_{93} es E o A (sec. con núm. de ident.: 560), X_{103} es F o L (sec. con núm. de ident.: 561), X_{108} es Q o T (sec. con núm. de ident.: 562), o X_{112} es N o R (sec. con núm. de ident.: 563), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{49} es R o K, y X_{53} es G, K, I o A; (sec. con núm. de ident.: 564). En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{30} es N (sec. con núm. de ident.: 565). En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{64} es Q (sec. con núm. de ident.: 566). En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es G (sec. con núm. de ident.: 567).

En diversas modalidades, la variante de IL-15 es una variante seleccionada de la Tabla 1A. En diversas modalidades, la IL-15 es una variante seleccionada de la Tabla 3A.

En diversas modalidades, las variantes de IL-15 no son variantes de IL-15 descritas en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm. US 2019/0263877, que se incorpora en la presente como referencia.

También se describen en la presente proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 y un polipéptido de supercóntigo que se puede usar en diversos métodos relacionados con la administración de proteínas de fusión separadas descritas en la presente. Diversas modalidades de la invención proporcionan una proteína de fusión, que comprende una variante de IL-15 como se describe en la presente; y un polipéptido de

supercóntigo. Estas proteínas de fusión IL-15 pueden usarse de acuerdo con los métodos de la presente invención como se describe en la presente.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende dos o más variantes de IL-15 como se describe en la presente; y un polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, las dos o más variantes de IL-15 pueden ser 3, 4, 5 o 6 variantes de IL-15. En diversas modalidades, las dos o más variantes de IL-15 pueden ser hasta 8 variantes de IL-15.

En algunas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al extremo C del polipéptido de supercóntigo. En algunas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al extremo N del polipéptido de supercóntigo.

En otra modalidad más, en donde el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, la variante de IL-15 se fusiona con uno cualquiera del extremo C o extremo N de la cadena pesada o cadena ligera, o se fusiona con uno cualquiera del dominio C_H2, o región bisagra (p. ej., entre los dominios C_H2 y C_H1).

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo o un fragmento de este. En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgM, IgG, o IgE.

En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, espartalizumab, cemiplimab, penpulimab (AK105), prolgolimab (BCD-100), ezabenlimab (BI 754091), toripalimab (JS001), lipustobart (LZM009), retifanlimab (MGA012), Sym021, dostarlimab (TSR-042), tebotelimab (MGD013), cadonilimab (AK104), vudalimab (XmAb20717), tislelizumab, PF-06801591 y anticuerpo anti-PD1 que expresa linfocitos T asesinos pluripotentes (PIK-PD-1). Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, garivulimab (BGB-A333), cosibelimab

(CK-301), FAZ053, envafolimab (KN035), MDX-1105, betifisolimab (MSB2311), adebrelimab (SHR-1316), atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559, CK-301 y M7824.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc o un fragmento de esta. En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc o un fragmento de esta y el polipéptido de supercóntigo no comprende un Fab.

En diversas modalidades, dos brazos (o cadenas) de regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden heterodimerizarse creando mutaciones de "botón en ojal" (KiH) en el dominio CH3. Esta característica estructural en los brazos polipeptídicos permite la unión de dos semianticuerpos (p. ej., heterodímero Fc; y dominios VH–CH y VL–CL). Por ejemplo, un heteromultímero (que incluye un heterodímero) puede comprender dos polipéptidos, cada uno de los cuales comprende un dominio CH3, en donde los polipéptidos se encuentran en una interfaz diseñada genéticamente dentro del dominio CH3, y un polipéptido contiene una protuberancia diseñada genéticamente ("botón") en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo original, y otro polipéptido contiene una cavidad diseñada genéticamente ("orificio") en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo original. En algunas modalidades, la interfaz diseñada genéticamente de un heteromultímero incluye al menos dos pares mutantes de protuberancia dentro de la cavidad. Los volúmenes y áreas superficiales accesibles de cada aminoácido se describen en *A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol*. 24: 107-123, 1972 y C. Chothia, *J. Mol. Biol*. 105: 1-14, 1975. Por ejemplo, los residuos de importación para la formación de una protuberancia pueden ser arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W); y

preferentemente el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un pequeño volumen de cadena lateral, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Como otro ejemplo, los residuos de importación para la formación de una cavidad pueden ser alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V); y preferentemente el residuo original para la formación de la cavidad tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Por ejemplo, una mutación T366W en el dominio CH3 para la cadena de "botón" /protuberancia, y una mutación T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 para la cadena "ojal" /cavidad. Adicionalmente, la configuración KiH puede combinarse con mutaciones adicionales para permitir el enlace disulfuro S-S entre las dos cadenas. En diversos aspectos en donde la proteína/polipéptido es un heterodímero de una configuración KiH, la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está ligada a una, y solo una, de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas (es decir, botón u ojal).

Como tal, en algunas modalidades, la región Fc es una Fc de botón en ojal (KiH).

En diversas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al botón del Fc de KiH. En diversas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al orificio del Fc de KiH.

En diversas modalidades, la región Fc es una región Fc de una IgG4, Fc de botón en ojal (KiH) o IgG1. En diversas modalidades, la región Fc puede ser una IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

En algunas modalidades, los dos o más brazos (o cadenas) de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden contener otro diseño de complementariedad estérica simétrica a asimétrica (p. ej., HA-TF, ZW1), una interacción de intercambio de carga a carga (DD-KK), un intercambio de complementariedad carga-estérico más una interacción electrostática adicional de largo alcance (p. ej., EW-RVT), o

un diseño de intercambio de cadena de isotipo (p. ej., dominio diseñado para intercambio de cadenas (SEED, por sus siglas en inglés)), o Xmab, 7.8.60, dirección electrostática, A107 o Duobody, para formar heterodímeros/heteromultímeros. Se observa una descripción adicional de estas configuraciones y mutaciones/residuos ilustrativos en *Front Immunol.* 2016; 7: 394.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo de la proteína de fusión comprende una proteína globular, albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de unión al antígeno de fragmentos (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena única (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio de unión de esta, o un fragmento de esta.

En diversas modalidades, pueden insertarse uno o más polipéptidos entre la variante de IL-15 y el anticuerpo de las proteínas de fusión IL-15. En diversas modalidades, el polipéptido puede insertarse o conjugarse en el extremo N, en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C del anticuerpo. En diversas modalidades, el polipéptido comprende un enlazador polipeptídico que conjuga la variante de IL-15 y el anticuerpo.

En diversas modalidades, uno o más polipéptidos pueden insertarse entre la variante de IL-15 y la región Fc de las proteínas de fusión IL-15. En diversas modalidades, el polipéptido puede insertarse o conjugarse en el extremo N, en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C de la región Fc. En diversas modalidades, el polipéptido comprende un enlazador polipeptídico que conjuga la variante de IL-5 y la región Fc. En estas modalidades, la proteína de fusión no incluye la región Fab de un anticuerpo.

Los anticuerpos que pueden fusionarse con IL-15 pueden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos y cadena sencilla (ScFv). Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen

(que incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados). Preferentemente, los anticuerpos son humanos o anticuerpos humanizados.

En diversas modalidades, las proteínas de fusión IL-15 son proteínas de fusión IL-15 enumeradas en la Tabla 1A. Es decir, una proteína de fusión IL-15 que comprende el polipéptido 1, el polipéptido 2 y el polipéptido 3.

En diversas modalidades, la proteína de fusión IL-15 comprende el polipéptido 1, el polipéptido 2 y el polipéptido 3 enumerados en la Tabla 1A, excepto que el enlazador en el polipéptido 2 es un enlazador peptídico diferente. Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador flexible que tiene generalmente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud. Ejemplos adicionales de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), (GGGGX_λ (sec. con núm. de ident.: 236))n, y (X_λGGGG (sec. con núm. de ident.: 317))n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud.

En diversas modalidades, la proteína de fusión IL-15 comprende una variante de IL-15 seleccionada de la Tabla 1A o Tabla 3B.

Tabla 1A — Secuencias de polipéptidos (modalidades de IL-15)

Nota: el polipéptido 1 es la cadena pesada del "orificio"; el polipéptido 2 es la cadena pesada del "botón", un enlazador (subrayado) y una variante de IL-15; El polipéptido 3 es la cadena ligera. La variante de IL-15 también se enumera por separado, pero se incluye en el polipéptido 2.

	Polipéptido 1	**Polipéptido 2**	**Polipéptido 3**	**Variante de IL-15**
FUSE-696	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 574)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 577)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 596)
FUSE-764	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESnVHPSCKVTAMKCFLLELQrISLkSGDASIHDTVqNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 578)	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESnVHPSCKVTAMKCFLLELQrISLkSGDASIHDTVqNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 597)
FUSE-7	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLI

65		EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 579)		SGDASIHDT VQNLIILAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 598)
FUSE-766	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQKISLASGDASIHD TVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 580)	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQKISL ASGDASIH DTVQNLIILA NNSLSSNG NVTESGCK ECEELEEK NIKEFLQSF VHIVQMFIN TS (sec. con núm. de ident.: 599)
FUSE-767	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQKISL KSGDASIH DTVQNLIILA NNSLSSNG NVTESGCK ECEELEEK NIKEFLQSF VHIVQMFIN TS (sec. con

		SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQKISLKSGDASIHD TVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 581)		núm. de ident.: 600)
FUSE-768	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSGWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQKISLISGDASIHDT VQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 582)	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQKISLI SGDASIHDT VQNLIILAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 601)
FUSE-772	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHD TVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISL GSGDASIH DTVQNLIILA NNSLSSNG NVTESGCK ECEELEEK NIKEFLQSF VHIVQMFIN TS (sec. con núm. de ident.: 602)

		CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 583)		
FUSE-773	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSNWVKVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHD TVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 584)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVKVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISL GSGDASIH DTVQNLIILA NNSLSSNG NVTESGCK ECEELEEK NIKEFLQSF VHIVQMFIN TS (sec. con núm. de ident.: 603)
FUSE-774	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHD TVQNLISLANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS (sec. con núm. de ident.: 75)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISL GSGDASIH DTVQNLISL ANNSLSSN GNVTESGC KECEELEE KNIKEFLQS FVHIVQMFI NTS (sec. con núm. de ident.: 604)
FUSE-8	QVQLVESGGGVVQPGRSLKL DCKASGITFSNSGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSKRYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLFLQ MSSLRAEDTAVYYCATNDDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVF	QVQLVESGGGVVQPGRSLKLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISD LKKIEDLIQS MHIAATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISL

02	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 576)	EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGGWVNVISDLKKIEDLIQSMHIAATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEAKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 586)		GSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEAKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 605)
FUSE-803	(sec. con núm. de ident.: 576)	QVQLVESGGGVVQPGRSLKLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGGWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSLVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 587)	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQRISLGSGDASIHDTVQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSLVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 606)
FUSE-804	(sec. con núm. de ident.: 576)	QVQLVESGGGVVQPGRSLKLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP	(sec. con núm. de ident.: 75)	GWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMQCFLSELQRISLGSGDASIHDTVQNLTILANNSLSSNGYVTESGCKECEELEAKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec.

		SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS GGGGSGGGGSGGGGGWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMQCFLSELQRISLGSGDASIH DTVQNLTILANNSLSSNGYVTESGC KECEELEAKNIKEFLQSFVHIVQMFI NTS (sec. con núm. de ident.: 588)		con núm. de ident.: 607)
FUSE-846	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLISLANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 589)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLISLAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 608)
FUSE-847	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSNWVKVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLISLANNSLSSNGNVTESGCKE	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVKVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLISLAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 609)

		CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 590)		
FUSE-848	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLISLANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVTMFINTS (sec. con núm. de ident.: 591)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLISLAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVTMFINT S (sec. con núm. de ident.: 610)
FUSE-849	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLISLANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIRT S (sec. con núm. de ident.: 592)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLISLAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFIRT S (sec. con núm. de ident.: 611)
FUSE-8	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI

50		EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>G GGGSGGGGSGGGGS</u>NWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLISLANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVTMFIRTS (sec. con núm. de ident.: 593)		SGDASIHDT VQNLISLAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVTMFIRT S (sec. con núm. de ident.: 612)
FUSE-853	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>G GGGSGGGGSGGGGS</u>NWVKVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 594)	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVKVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLIILAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 613)
FUSE-854	(sec. con núm. de ident.: 575)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYP	(sec. con núm. de ident.: 75)	NWVLVISDL KKIEDLIQS MHIDATLYT ESNVHPSC KVTAMKCF LLELQRISLI SGDASIHDT VQNLIILAN NSLSSNGN VTESGCKE CEELEEKNI KEFLQSFV HIVQMFINT S (sec. con

		SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGGSGGGGSGGGGSNWVLVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLELQRISLISGDASIHDT VQNLIILANNSLSSNGNVTESGCKE CEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S (sec. con núm. de ident.: 595)		núm. de ident.: 614)

Tabla 1B - Secuencias de polipéptidos (modalidades de IL-15)

Nota: El polipéptido 1 es la cadena pesada y el polipéptido 2 mientras que el blanco dejado es idéntico al polipéptido 1. El polipéptido 3 es la cadena ligera.

	Polipéptido 1	**Polipéptido 2**	**Polipéptido 3**
FUSE-691	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRA EDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 16)		(sec. con núm. de ident.: 75)

Tabla 3A — Secuencias de polipéptidos relacionadas con proteínas de fusión IL15/IL18

Nota: el polipéptido 1 es la cadena pesada del “orificio”; El polipéptido 2 es la cadena pesada del “botón”; El polipéptido 3 es la cadena ligera. La variante de IL18 madura y la variante de IL-15 también se enumeran por separado, pero se incluyen en el polipéptido 1, 2 o 3.

	Polipéptido 1	Polipéptido 2	Polipéptido 3	Propéptido	Escisión	Variantes de IL18 maduras	Variantes IL15
FUSE-320	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGRTFSSYAMG WFRQAPGKERE FVVAINWSSGST YYADSVKGRFTI SRDNAKNTMYLQ MNSLKPEDTAVY YCAAGYQINSGN	EVQVQQSGPEL VKPGTSVKISCK TSGYTFTEYTMH WVKQSHGESLE WIGGIVPNNGAT NYNQKFRGKATL TVDKSSSTAYME LRSLTSEDSAVY YCARRGLLWHF	DILMTQSPSAMS VSLGDTVSITCHA SQGISSYIGWLQ QKPGKSFKGLIY HGTNLEDGVPSR FSGSGSGADYSL TISSLESEDFADY YCIQYAQFPFTF GSGTKLEIKRAD				

	YNFKDYEYDYW GQGTQVTVSSEP KSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSP GK (sec. con núm. de ident.: 615)	AYWGQGTLVTV SAAKTTPPSVYP LAPGSAAQTNS MVTLGCLVKGYF PEPVTVTWNSG SLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSV TVPSSTWPSETV TCNVAHPASSTK VDKKIVPRDCDK THTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG K (sec. con núm. de ident.: 639)	AAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCF LNNFYPKDINVK WKIDGSERQNG VLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTL TKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIV KSFNRNEC (sec. con núm. de ident.: 647)				
FUSE-696	(sec. con núm. de ident.: 574)	(sec. con núm. de ident.: 577)	(sec. con núm. de ident.: 75)				(sec. con núm. de ident.: 596)
FUSE-697	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLDCKA SGITFSNSGMHW VRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRD NSKNTLFLQMNS LRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT	(sec. con núm. de ident.: 577)	(sec. con núm. de ident.: 75)	(sec. con núm. de ident.: 76)	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	(sec. con núm. de ident.: 97)	(sec. con núm. de ident.: 596)

	CPPCPAPEaaGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSP GGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSG GGGSGGGGSAA EPVEDNsINFVAM KFIDNTLYFIAEDD ENIEQDYFGKLES KLSVIRNLNDQVL FIDQGNRPLFED MTDSDsRDNAPR TIFIISKYGDSQPR GLAVTISVKsEKIS TLSsENKIISFKEM NPPDNIKDTKSDII FFQRSVPGHDNK VQFESSSYEGYF LAsEKERDLFKLIL KKEDELGDRSIMF TVQNED (sec. con núm. de ident.: 17)						
FUSE-765	(sec. con núm. de ident.: 575)	(sec. con núm. de ident.: 579)	(sec. con núm. de ident.: 75)				(sec. con núm. de ident.: 598)
FUSE-773	(sec. con núm. de ident.: 575)	(sec. con núm. de ident.: 584)	(sec. con núm. de ident.: 75)				(sec. con núm. de ident.: 603)
FUS	(sec. con núm. de ident.: 575)	(sec. con núm. de ident.: 585)	(sec. con núm. de ident.: 75)				(sec. con núm. de

E-774							ident.: 604)
FUSE-916	AAEPVEDNVINFV AMKFIDNTLYFIAE DDENIEQDYFGKL ESKLSVIRNLNDQ VLFIDQGNRPLFE DMTDSDVRDNAP RTIFIISKYGDSQP RGLAVTISVKVEKI STLSVENKIISFKE MNPPDNIKDTKS DIIFFQRSVPGHD NKVQFESSSYEG YFLAVEKERDLFK LILKKEDELGDRSI MFTVQNEDGGG GSGGGGSDKTHT CPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSP GGGGGSGGGGS GGGGSNWVkVIS DLKKIEDLIQSMHI DATLYTESnVHPS CKVTAMKCFLLEL QrISLiSGDASIHDT VqNLIILANNSLSS NGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 616)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA SGFSISGYAMGW VRQAPGKGLEFV AGIDVAGISPDYG AAVKGRSTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAK TVVIEGLFSTPYID AWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 640)	SYELMQPPSVSV SPGQTARITCSG GGYDGSYYYGW YQQKPGQAPVTV IYDNTNRPSGIPE RFSGSNSGNTITL TISGVQAEDEADY YCGGYDRSGGIF GGGTKLTVLRTV AAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSF NRGECGGGGSG GGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGG GSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSC TASGYTNRLKCM GWFRQAPGKER EEIASISTGTGNT YYADSVKGRFTIS RDKSRNTLYLQM sTLRAEDTAVYYC AADVRPHGTTCH YNSRGQGTQVTV SS (sec. con núm. de ident.: 648)	AAEPVED NVINFVA MKFIDNT LYFIAEDD EN (sec. con núm. de ident.: 78)	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	YFGKLE SKLSVIR NLNDQV LFIDQG NRPLFE DMTDSD VRDNAP RTIFIISK YGDSQP RGLAVTI SVKVEKI STLSVE NKIISFK EMNPPD NIKDTKS DIIFFQR SVPGHD NKVQFE SSSYEG YFLAVE KERDLF KLILKKE DELGDR SIMFTV QNED (sec. con núm. de ident.: 99)	(sec. con núm. de ident.: 613)
FUSE-9	AAEPVEDNVINFV AMKFIDNTLYFIAE DDENIEQDYFGKL ESKLSVIRNLNDQ VLFIDQGNRPLFE DMTDSDVRDNAP	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGRPFSNYGMG WFRQAPGKKREF VAGISWSGGSTD YADSVKGRFTISR		AAEPVED NVINFVA MKFIDNT LYFIAEDD EN (sec. con núm.	IEQD (sec. con núm. de	(sec. con núm. de ident.: 99)	(sec. con núm. de ident.: 613)

23	RTIFIISKYGDSQP RGLAVTISVKVEKI STLSVENKIISFKE MNPPDNIKDTKS DIIFFQRSVPGHD NKVQFESSSYEG YFLAVEKERDLFK LILKKEDELGDRSI MFTVQNEDGGG GSGGGGSDKTHT CPPCPAPEaaGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSP GGGGGSGGGGS GGGGSNWVkVIS DLKKIEDLIQSMHI DATLYTESnVHPS CKVTAMKCFLLEL QrISLiSGDASIHDT VqNLIILANNSLSS NGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 617)	DNAKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCA AVFSGAETAYYP SDDYDYWGQGT QVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGG GGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLS CTASGYTNRLKC MGWFRQAPGKE REEIASISTGTGN TYYADSVKGRFTI SRDKSRNTLYLQ MNTLRAEDTAVY YCAADVRPHGTT CHYNSRGQGTQV TVSSEPKSSDKT HTCPPCPAPEaa GGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMT KNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GK (sec. con núm. de ident.: 641)		de ident.: 78)	ident.: 88)		
FUSE-926	EPKSSDKTHTCP PCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREP QVYTLPPSREEM TKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQ	(sec. con núm. de ident.: 640)	(sec. con núm. de ident.: 648)				

	QGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 1)						
FUSE-943	AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSNWVkVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESnVHPSCKVTAMKCFLLELQrISLgSGDASIHDTVqNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 618)	(sec. con núm. de ident.: 639)	(sec. con núm. de ident.: 647)	AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm. de ident.: 78)	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	(sec. con núm. de ident.: 99)	(sec. con núm. de ident.: 603)
FUSE-9	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS	AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSQP		AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm.	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	(sec. con núm. de ident.: 99)	(sec. con núm. de ident.: 603)

44	TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 19)	RGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEaaGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSNWVkVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESnVHPSCKVTAMKCFLLELQrISLgSGDASIHDTVqNLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 642)		de ident.: 78)			
FUSE-966	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 641)					
FUSE-967	AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKS	(sec. con núm. de ident.: 641)		AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm. de ident.: 78)	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	(sec. con núm. de ident.: 99)	

	DIIFFQRSVPGHD NKVQFESSSYEG YFLAVEKERDLFK LILKKEDELGDRSI MFTVQNEDGGG GSGGGGSDKTHT CPPCPAPEaaGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSP GK (sec. con núm. de ident.: 619)						
FUSE-968	EPKSsDKTHTCP PCPAPEaaGGPS VFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNR FTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGG GGSNWVkVISDL KKIEDLIQSMHIDA TLYTESnVHPSCK VTAMKCFLLELQrl SLiSGDASIHDTVq NLIILANNSLSSN GNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 620)	(sec. con núm. de ident.: 641)					(sec. con núm. de ident.: 613)

FUSE-1145	AAEPVEDNVINF VAMKFIDNTLYFI AENDENGGGSY FGKLKSKLSVIRN LNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDV RDNAPRTIFIISHY GDSQPRGMAVTI SVKVEKISTLSVE NKIISFKEMNPPD NIKDTKSDIIFFQR SVPGHDNKMQF ESSSYEGYFLAV EKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFT VQNEDEPKSSDK THTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGGG GGSGGGGSGGG GSNWVNVISDLK KIEDLIQSMHIDA TLYTESNVHPSC KVTAMKCFLLEL QRISLISGDASIH DTVQNLISLANNS LSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFI NTS (sec. con núm. de ident.: 621)	AVTLDESGGGLQ TPGGALSLVCKA SGFDFSSHEMQ WVRQAPGKGLEF VAGIGNMGSFTV YGAAVKGRATISR DNGQSTVRLQLN NLRAEDTGTYYC ARDFYNSYGCSA SFIDAWGHGTEVI VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GK (sec. con núm. de ident.: 643)	QSALTQPSSVSA NPGETVKITCSGG SYNYGWFQQKSP GSAPVTVIYSNNQ RPSDIPSRFSGST SGSTSTLTITGVQ ADDEAIYYCGSW DDSSYVGIFGAGT TLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPS KQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGST VEKTVAPTECSG GGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGS LRLSCTASGYTN RLKCMGWFRQA PGKEREEIASIST GTGNTYYADSVK GRFTISRDKSRNT LYLQMSTLRAEDT AVYYCAADVRPH GTTCHYNSRGQG TQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 649)	AAEPVED NVINFVA MKFIDNT LYFIAEnD EN (sec. con núm. de ident.: 80)		YFGKLk SKLSVIR NLNDQV LFIDQG NRPLFE DMTDS DVRDNA PRTIFIIS hYgDSQ PRGMA VTISVKV EKISTLS VENKIIS FKEMNP PDNIKD TKSDIIF FQRSVP GHDNK MQFESS SYEGYF LAVEKE RDLFKLI LKKEDE LGDRSI MFTVQN ED (sec. con núm. de ident.: 110)	(sec. con núm. de ident.: 608)
FUSE-1146	(sec. con núm. de ident.: 621)	AVTLDESGGGLQ TPGGALSLVCKA SGFDFSSHEMQ WVRQAPGKGLEF VAGIGNMGSFTV YGAAVKGRATISR DNGQSTVRLQLN NLRAEDTGTYYC ARDFYNSYGCSA	(sec. con núm. de ident.: 649)	(sec. con núm. de ident.: 80)		(sec. con núm. de ident.: 110)	(sec. con núm. de ident.: 608)

		SFIDAWGHGTEVI VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP GKGGGGSGGGG SGGGGSGGGGS QVQLQESGGGSV QAGGSLRLSCAA SGYIYNNNYMGW FRQAPGKEREGV ATIYVGGGSTYYA DSVKGRFTISRDN TKNTLYLQMNSLK PEDTAMYYCAAG LVSRPDWVLLAR AYTNWGQGTLVT VSS (sec. con núm. de ident.: 644)					
FUSE-1147	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 643)	(sec. con núm. de ident.: 649)				
FUSE-	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 644)	(sec. con núm. de ident.: 649)				

11148							
FUSE-10544	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFDFSSHEMQWVRQAPGKGLEFVAGIGNMGSFTVYGAAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCARDFYNSYGCSASFIDAWGHGTEVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 622)		QSALTQPSSVSANPGETVKITCSGGSYNYGWFQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPSDIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQADDEAIYYCGSWDDSSYVGIFGAGTTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS ((sec. con núm. de ident.: 650)				
FUSE-11124	(sec. con núm. de ident.: 621)	EVQVQQSGPELVKPGTSVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGESLEWIGGIVPNNGATNYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRGLLWHFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV	DILMTQSPSAMSVSLGDTVSITCHASQGISSYIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCIQYAQFPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD	(sec. con núm. de ident.: 80)		(sec. con núm. de ident.: 110)	(sec. con núm. de ident.: 608)

		HTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 645)	STYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGG SGGGGSGGGGS GGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSL RLSCTASGYTNR LKCMGWFRQAP GKEREEIASISTG TGNTYYADSVKG RFTISRDKSRNTL YLQMNTLRAEDT AVYYCAADVRPH GTTCHYNSRGQ GTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 652)				
FUSE-11125	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 645)	(sec. con núm. de ident.: 652)				
FUSE-11126	AAEPVEDNVINF VAMKFIDNTLYFI AENDENGGGSY FGKLKSKLSVIRN LNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDV RDNAPRTIFIISHY GDSQPRGMAVTI SVKVEKISTLSVE NKIISFKEMNPPD NIKDTKSDIIFFQR SVPGHDNKMQF ESSSYEGYFLAV EKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFT VQNEDEPKSSDK THTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVL	(sec. con núm. de ident.: 645)	(sec. con núm. de ident.: 652)	(sec. con núm. de ident.: 80)		(sec. con núm. de ident.: 110)	

	TVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLS CAVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 263)						
FUSE-1127	EPKSSDKTHTCP PCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQV SLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDS DGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGGG GGSGGGGSGGG GSNWVNVISDLK KIEDLIQSMHIDAT LYTESNVHPSCK VTAMKCFLLELQR ISLISGDASIHDTV QNLISLANNSLSS NGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS (sec. con núm. de ident.: 634)	(sec. con núm. de ident.: 645)	(sec. con núm. de ident.: 652)				(sec. con núm. de ident.: 608)
FUSE-1136	(sec. con núm. de ident.: 621)	EVQLVESGGGLV QAGGSLRLSCAA SGRPFSNYAMG WFRQAPGKERE FVAAISWSGGST SYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQM SSPKPEDTAIYYC AAQFSGADYGFG RLGIRGYEYDYW GQGTQVTVSSG GGGSGGGGSGG		(sec. con núm. de ident.: 80)		(sec. con núm. de ident.: 110)	(sec. con núm. de ident.: 608)

		GGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPG GSLRLSCTASGY TNRLKCMGWFR QAPGKEREEIASI STGTGNTYYADS VKGRFTISRDKSR NTLYLQMSTLRA EDTAVYYCAADV RPHGTTCHYNSR GQGTQVTVSSEP KSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 646)					
FUSE-11137	(sec. con núm. de ident.: 634)	(sec. con núm. de ident.: 646)					(sec. con núm. de ident.: 608)
FUSE-11138	(sec. con núm. de ident.: 263)	(sec. con núm. de ident.: 646)		(sec. con núm. de ident.: 80)		(sec. con núm. de ident.: 110)	
FUSE-1	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 646)					

139							

Tabla 3A.1 Secuencias de polipéptidos relacionadas con modalidades que involucran proteínas de fusión IL15/IL18

Nota: el polipéptido 1 es la cadena pesada del "orificio"; el polipéptido 2 es la cadena pesada de "botón"; El polipéptido 3 es la cadena ligera.

	Polipéptido 1	Polipéptido 2	Polipéptido 3
FUSE-1062	DVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCAASGVTYSHYWLGWFRQAPGKEREG VATIYANDGTTYYADSVKGRFTVSLDNAKNTLYLQMNRLTPEDTAMYYCA LRVNDGSWFSPLQHYHYNYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 623)		
FUSE-1063	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGNPYSHYWLGWFRQTPGKEREG VAVIYTGDGDGTTYYTDSVKGRFTVSQDNGKNTLYLQMNNLKPEDTAMY YCALRGNDGSWFSPLQPGHYTYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 624)		
FUSE-1064	DVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVTDSNGCMGWFRQAPGKERER VASIDSDGQTLYADSVKGRFTISQDNTENTLYLQMNTLKPEDTATYYCAA GATSQPGFSCRILGPGWYTYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 625)		
FUSE-1065	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSGYPYSRYWLGWFRQAPGKEREG VATIYTDDGATYYADSVKGRFTVSQDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYVC ALRGNDGTWFSVLQPGHYTVWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 626)		
FUSE-1072	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTYSHYWLAWFRQAPGKEREG VATIYTNDGTTYYGDSVKGRFTISLDNPKNTLYLQMNSLTPEDTAMYYCA LRGNDGSWFSPLQPYHYNYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP		

	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 627)		
FUSE -1073	DVQLQESGGGPVQSGGSQRLSCVYSGVTDSNGCMGWFRQAPGKERE RVASIDSYGQTLYADSVKGRFTISQDNTENTLYLQMNTLKPEDTATYYCA AGATSQPGFSCRVLGPGWYTYWGQGTQVTVSIEPKSADKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 628)		
FUSE -1074	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTYSHYWLGWFRQAPGKEREG VATIYANDGTTYYADSVKGRFTVSLDNAKNTLYLQMNRLTPEDTAMYYCA LRVNDGSWFSPLQHYHYNYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 629)		
FUSE -1075	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYSYSHYWLGWFRQAPGKEREG IAVIYTNDGTTYYGDSVKGRFTVSQDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCA LRANDGSWFSPLQPGYYTYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 630)		
FUSE -1076	DVQLQESGGGPVQSGGSLRLSCEASGVTVTNGCMAWFRQAPGKERER VASIDEDGQTLYADSVKGRFTISQDNTENTLYLQMNTLKPEDMATYYCAA GARSQPGFSCRILGPGWYTYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 631)		
FUSE -1077	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAVSAYTYGRGCMGWFRQAPGKEREG VAGVDIVGTPTYADSIKGRFTISRDNTKNILYLEMNSLKPEDTAMYYCGAA LRPYGGSCLRLGHFDSWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 632)		
FUSE -1078	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWVKQRTGQGLEWI GQIYPGDGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA PNYGDYTIDFWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (sec. con núm. de ident.: 633)		(sec. con núm. de ident.: 651)

FUSE-1184	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCRASGWATNCMGWFRQAPGKQRERV ALIDNDGRTIYAESVKGRFTISQENARKALYLQMNSLKPEDTAMYYCAAD LDICWVVKDRSFTYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 638)		
FUSE-1128	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTSRTYLMAWFRQAPGKEREG VATTNKWGATTYADSVKGRFTISLDNAKNALYLQMNSLKPEDTAMYYCA AGRDYYANLDPDPRLYAYWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 635)		
FUSE-1129	DVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCAASGYTYSFYCMGWFRQAPGTRKER EGVAVIDADGRTTYADSAKGRFTVSQDEAKEHLYLQMNNLKPEDTAMYY CAAYDCYSGSKWGDSDSFGAWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 636)		
FUSE-1130	DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASRATAYMGWFRQAPGKEREGVACI DSFGSTSFADSVKGRFTISQDRTKNTVVLQMNSLKPEDTAMYYCAARISG ENGYIGYCASGAVGPSDYVRWGQGTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 637)		

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR

ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYRYHTFGTGTKLELKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS

TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 651)

Secuencias para proteínas de fusión en la Figura 12A y 12BB

FUSE-739	QVQLQESGGGSVQAGGSLTLSCVISGDTTSTVYMGWFRQAPGEEREGIASIYGADDSPYYADSV KGRFTIFQDNAKRTVVLQMNSLKPEDTGTYYCAATTIHFVVGGPWLLAAPNYKYWGQGTLVTVSS EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 653)
FUSE-740	QVQLQESGGGSVTTGGSLRLSCVASRDPYYMAWFRQAPGKEREGVAAIHSGRTYYAESVKSRF TISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAMYYCAADLRYDGSWSATKDYHYWGQGTLVTVSSEPKSADK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 654)
FUSE-741	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSCMGWFRQAPGKEREAVATINTESGTTYYLDSVK GRFTISKDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAALDGYCGTAAYVRPVSYRYWGQGTQVTVSSEP KSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 655)
FUSE-742	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASRDTYYRGWFRQAPGKEREGVAAIYLGDTYYADSVKGRF TISQDSAKNTVFLEMNSLKVEDTAMYYCAADKKYGSKWYTNDYHYWGQGTQVTVSSEPKSADKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 656)
FUSE-743	QVQLQESGGESVQAGGSLRLSCAASGYINGGNYMGWFRQAPGKEREGVAAIYIHGRSTYYADSV KGRFTISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTAMYYCATGLVSRPDWVLLARGYNAWGQGTLVTVSSEP KSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 657)
FUSE-744	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIRGKMCVGWFRQTPGKEREVVGTVYTGSGAISYGDS VEGRFTISQDNARNTLYLQMNSLSPEDTAMYYCAATRSVVLNSAGVCVTVPGWYNYWGQGTLVT VSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ((sec. con núm. de ident.: 658)
FUSE-745	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGTIYSYYCMGWFRQSPGKEREGVAGIDSYGNIRYSDSAK GRFTISKDNTNNILYLQMNSLEPEDTAMYYCAAEPRRCAYLNVDDRILPALFYDSWGQGTQVTVS SEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ((sec. con núm. de ident.: 659)
FUSE-746	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTNSINYMAWFRQAPGKEREGVARIYTRDGSAEYLAD SVVGRFTISQVNVKNTVFLEMTSLKPEDTAMYYCAAAAGASAYGVLNKDHYNYWGQGTQVTVSS EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ((sec. con núm. de ident.: 660)
FUSE-747	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAGSGYTYSSYSMGWFRQDPGKEREGVAAMNARGDNPYYA DSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAAARAEPSTVVVSAKGYNYWGQGTQVTVS SEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 661)
FUSE-748	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIYNNNYMGWFRQAPGKEREGVATIYVGGGSTYYADS VKGRFTISRDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAAGLVSRPDWVLLARAYTNWGQGTLVTVSSE PKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 662)
FUSE-749	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCATSGYPYIGPCMTWFRQAPGKEREWVAFIYKDDGATYYSDS VNGRFTISTDNANNALYLQMNSLKPEDTAVYYCAASPPSPRTTCYTGASYYNYWGQGTQVTVSS EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 663)
FUSE-750	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIGGKMCVGWFRQTPGKEREVVGTVYTGSGAISYGDS VEGRFTISQDNARNTLYLQMNSLSPEDTAMYYCAATRSVVLNSAGVCVTVPGWYNYWGQGTLVT VSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 664)
FUSE-751	QVQLQESGGGSVQAGGSLNLSCTASGYTIGSFSMAWFRQAPGKEREGVAYINTGGVPYYLDSVK GRATISRDNAADTLYLHMNSLKPEDTALYYCAARPGLGESAWYIDARAYNYWGQGTLVTVSSEPK SADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 665)
FUSE-752	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCATSERTYTQNWMGWFRQSPGKEREGVAVINTGSGLTAYVDS VKGRFTISKDNTKSTVYLQMNSLKPDDTAMYYCAAEVQGGVLIATGYRYWGQGTLVTVSSEPKSA DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 666)
FUSE-753	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTTSRFKINDGSVGWFRQAPGKEREGVASIYADGGGISYADSV KGRFTISQDNSANTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAALALRRYGPLDPREFRFWGQGTQVTVSSEPK SADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 667)
4D6	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSGDTYNLNRMAWFRQAPGKE REGVAGTGINDITAYADSVKGRFTVSNDHAKKSLYLQMNNLKPEDTAMYYCAARSVYLTAPSLRP ESYNYWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 668)
4C9	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIYGNNYMGWFRQAPGKE REGLATIYINGASTYYADSVKGRFTISRDNTKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAAGLVSRPDWVLLA RAYNNWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 669)
3H8	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYINSNNYMGWFRQAPGKE REGVAVKYIHGPSTYYADSVKGRFIISQDNAKNMVYLQMNTLKPEDTAMYYCAAGLVSRPDWVLL ARGYNNWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 670)
3F8	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQDGGSLRLSCVVSGNTYNLNRMAWFRQAPGKE REGVAGTGINDITGYADSVKGRFTVSVDSAEKTLYLQMNLLKPEDTAMYYCAARSVRLTAPSLRP ESYTYWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 671)
5E10	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSGNTYNLNRMAWFRQAPGKE REGVAGTGINDITAYADSVKGRFTVSSDHATKTLHLQMNSLKPEDTGMYYCAARSVYLTAPSLRP ESYNYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 672)
5E7	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSGYTYNLNRMAWFRQAPGKE REGVASTGINDITEYADSVKGRFTVSTDAVKNTLYLQMNSLKPDDTAMYYCAARSVRQTVPSLRP ESYTYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 673)

5B9	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSGNTYNLNRMAWFRQAPGKE REGVAGTGINDITGYADSVKGRFTVSVDSAEKKLYLQMNSLKPEDTAMYYCAARSVRLTAPSLRP ESYTYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 674)
2C8	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTTSRFKINDGSVGWFRQAPGKER EGVASVYADGGGISYADSVKGRFTISQDNSANTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAALALRRYGPLDPR EFRFWGQGILVTVS (sec. con núm. de ident.: 675)
3A6	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYIGGKMCVGWFRQTPGKE REVVGTVYTGSGAISYGDSVEGRFTISQDNARNTLYLQMNSLSPEDTAMYYCAATRSVVLNSAGV CVTVPGWYNYWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 676)
1B8	MGSTAILGLLLAVLQGGRAQVQLQESGGGSVQPGGSLTLSCRASEYSMSFIGWFRQAPGKEREK VATIYTRSGRTYYADSVRGRFTISQDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAMYYCAAGSYGGPWSALDSR HFNYWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 677)

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una variante de IL-15 de la presente invención descrita en la presente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar en una dirección 5' a 3', la variante de IL-15 o la proteína de fusión IL-15.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención descrita en la presente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar en una dirección 5' a 3', la variante de IL-15.

Como tal, el polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención comprende polinucleótido 1, polinucleótido 2 y polinucleótido 3 enumerados en la Tabla 2A. En otras modalidades, el polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención comprende el polinucleótido 1, el polinucleótido 2 y el polinucleótido 3 enumerados en la Tabla 2A, excepto que los nucleótidos que codifican el enlazador codifican un enlazador diferente.

Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador flexible que tiene generalmente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud. Ejemplos adicionales de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S,

GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), (GGGGX$_\lambda$ (sec. con núm. de ident.: 236))n, y (X$_\lambda$GGGG (sec. con núm. de ident.: 317))n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud. Como tal, los nucleótidos que codifican el enlazador en el polinucleótido 2 codificarán uno de estos enlazadores antes mencionados en su lugar.

Los polinucleótidos ilustrativos se encuentran en la Tabla 2A.

Tabla 2A Polinucleótidos (modalidades de IL-15)

Nota: El polinucleótido 1 codifica la cadena pesada del “orificio”; el polinucleótido 2 codifica la cadena pesada del “botón”, un enlazador, y una variante de IL-15, el polinucleótido 3 codifica la cadena ligera.

	Polinucleótido 1	**Polinucleótido 2**	**Polinucleótido 3**
FUSE-696	CAGGTTCAGCTCGTCGAAAGCG	CAGGTTCAGCTCGTCGAAAGC	GAAATCGTGCTGACCCAGTCC
	GAGGAGGAGTCGTTCAGCCAG	GGAGGAGGAGTCGTTCAGCCA	CCCGCTACCTTGAGTCTGTCC
	GAAGATCCCTCAGGCTCGACTG	GGAAGATCCCTCAGGCTCGAC	CCTGGAGAGAGAGCCACCCT
	TAAGGCCTCCGGAATCACCTTC	TGTAAGGCCTCCGGAATCACCT	GTCTTGTAGGGCTAGTCAGTC
	TCCAACTCCGGAATGCACTGGG	TCTCCAACTCCGGAATGCACTG	CGTGAGCAGCTATCTGGCCTG
	TCAGGCAGGCTCCTGGAAAAG	GGTCAGGCAGGCTCCTGGAAA	GTATCAGCAGAAGCCCGGCCA
	GACTGGAGTGGGTGGCTGTGA	AGGACTGGAGTGGGTGGCTGT	GGCTCCTAGGTTGTTGATTTAC
	TTTGGTACGACGGCTCCAAGAG	GATTTGGTACGACGGCTCCAAG	GATGCCTCCAACAGAGCCACC
	ATACTACGCCGACTCTGTGAAG	AGATACTACGCCGACTCTGTGA	GGAATCCCTGCACGGTTCTCC
	GGCCGGTTCACTATCTCCAGGG	AGGGCCGGTTCACTATCTCCAG	GGTTCCGGTTCTGGTACAGAC
	ACAACTCCAAGAACACACTGTT	GGACAACTCCAAGAACACACT	TTCACCCTGACTATCAGCAGT
	CCTGCAGATGAACTCCCTGCGG	GTTCCTGCAGATGAACTCCCTG	CTGGAGCCCGAGGATTTCGCC
	GCTGAGGATACTGCCGTTTATTA	CGGGCTGAGGATACTGCCGTT	GTTTACTACTGCCAGCAGTCC
	CTGCGCCACCAACGATGACTAC	TATTACTGCGCCACCAACGATG	TCCAACTGGCCCAGGACATTC
	TGGGGACAGGGAACCTTGGTG	ACTACTGGGGACAGGGAACCT	GGTCAGGGCACCAAGGTGGA
	ACCGTGAGTAGCGCTAGCACCA	TGGTGACCGTGAGTAGCGCTA	GATCAAGCGTACGGTGGCTGC
	AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT	GCACCAAGGGCCCATCGGTCT	ACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
	GGCACCCTCCTCCAAGAGCAC	TCCCCCTGGCACCCTCCTCCA	CCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
	CTCTGGGGGCACAGCGGCCCT	AGAGCACCTCTGGGGGCACAG	CTGGAACTGCCTCTGTTGTGT
	GGGCTGCCTGGTCAAGGACTA	CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA	GCCTGCTGAATAACTTCTATCC
	CTTCCCCGAACCGGTGACGGT	AGGACTACTTCCCCGAACCGG	CAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
	GTCGTGGAACTCAGGCGCCCT	TGACGGTGTCGTGGAACTCAG	GAAGGTGGATAACGCCCTCCA
	GACCAGCGGCGTGCACACCTT	GCGCCCTGACCAGCGGCGTGC	ATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
	CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA	ACACCTTCCCGGCTGTCCTACA	TGTCACAGAGCAGGACAGCAA
	GGACTCTACTCCCTCAGCAGCG	GTCCTCAGGACTCTACTCCCTC	GGACAGCACCTACAGCCTCAG

	TGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCCGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GAGCTGCGCCGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACAGGTTCA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 678)	AGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCCGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCCGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTGGTGGTGGCGGATCAGG TGGGGGAGGCTCTGGTGGAGG CGGTAGTGGATGGGTTAACGTG ATCAGCGACTTGAAGAAGATCG AGGATTTGATCCAGAGCATGCA CATCGACGCTACTTTGTATACTG AGAGTAACGTGCACCCCTCCT GCAAGGTTACTGCTATGAAGTG TTTCCTGCTCGAACTGCAGAGA ATCTCCCTGGGCTCCGGAGAT GCAAGCATCCATGACACCGTG CAGAACTTGATTATCCTGGCTA ACAACTCCCTGTCCTCCAACGG CAACGTGACCGAATCCGGATG CAAAGAGTGCGAGGAGCTCGA AGAGAAAAACATCAAGGAGTTC CTGCAGTCCTTCGTGCACATCG TGCAGATGTTCATCAACACCTC C (sec. con núm. de ident.: 681)	CAGCACCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGTTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGT (sec. con núm. de ident.: 188)

FUSE-764	CAGGTTCAGCTCGTCGAAAGC	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG	(sec. con núm. de ident.: 188)
	GGAGGAGGAGTCGTTCAGCC	GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG	
	AGGAAGATCCCTCAGGCTCGA	GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT	
	CTGTAAGGCCTCCGGAATCAC	GCAAGGCATCAGGCATCACATT	
	CTTCTCCAACTCCGGAATGCA	CTCCAACTCCGGCATGCACTGG	
	CTGGGTCAGGCAGGCTCCTG	GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA	
	GAAAAGGACTGGAGTGGGTG	GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG	
	GCTGTGATTTGGTACGACGGC	ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA	
	TCCAAGAGATACTACGCCGAC	GATACTACGCCGACAGCGTCAA	
	TCTGTGAAGGGCCGGTTCACT	GGGCAGGTTCACCATCAGCAG	
	ATCTCCAGGGACAACTCCAAG	GGACAATAGCAAGAACACCCTG	
	AACACACTGTTCCTGCAGATG	TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA	
	AGCAGTTTGAGGGCCGAGGA	GGGCCGAGGACACCGCCGTTT	
	CACCGCTGTTTACTACTGCGC	ATTACTGCGCCACCAACGACGA	
	AACCAACGATGACTACTGGGG	CTACTGGGGCCAGGGAACCTT	
	GCAGGGAACCCTGGTTACAGT	GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC	
	GAGTAGCGCTAGCACCAAGGG	ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC	
	CCCATCGGTCTTCCCCCTGGC	CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG	
	ACCCTCCTCCAAGAGCACCTC	CACCTCTGGGGGCACAGCGGC	
	TGGGGGCACAGCGGCCCTGG	CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA	
	GCTGCCTGGTCAAGGACTACT	CTACTTCCCCGAACCGGTGACG	
	TCCCCGAACCGGTGACGGTG	GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC	
	TCGTGGAACTCAGGCGCCCT	CTGACCAGCGGCGTGCACACC	
	GACCAGCGGCGTGCACACCT	TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT	
	TCCCGGCTGTCCTACAGTCCT	CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG	
	CAGGACTCTACTCCCTCAGCA	CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG	
	GCGTGGTGACCGTGCCCTCC	CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC	
	AGCAGCTTGGGCACCCAGAC	ATCTGCAACGTGAATCACAAGC	
	CTACATCTGCAACGTGAATCAC	CCAGCAACACCAAGGTGGACAA	
	AAGCCCAGCAACACCAAGGTG	GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT	
	GACAAGAAAGTTGAGCCCAAA	GACAAAACTCACACATGCCCAC	
	TCTTGTGACAAAACTCACACAT	CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG	
	GCCCACCGTGCCCAGCACCT	CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT	
	GAAGCCGCAGGGGGACCGTC	CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC	
	AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA	ACCCTCATGATCTCCCGGACCC	
	ACCCAAGGACACCCTCATGAT	CCGAGGTCACATGCGTGGTGG	
	CTCCCGGACCCCCGAGGTCA	TGGACGTGAGCCACGAAGACC	
	CATGCGTGGTGGTGGACGTG	CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA	
	AGCCACGAAGACCCTGAGGT	CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA	
	CAAGTTCAACTGGTACGTGGA	TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG	
	CGGCGTGGAGGTGCATAATGC	GAGGAGCAGTACAACAGCACGT	
	CAAGACAAAGCCGCGGGAGG	ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC	
	AGCAGTACAACAGCACGTACC	CGTCCTGCACCAGGACTGGCT	
	GTGTGGTCAGCGTCCTCACCG	GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC	
	TCCTGCACCAGGACTGGCTGA	AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC	
	ATGGCAAGGAGTACAAGTGCA	CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT	
	AGGTCTCCAACAAAGCCCTCC	CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC	
	CAGCCCCCATCGAGAAAACCA	CCGAGAACCACAGGTGTACACC	
	TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC	CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG	
	CCCGAGAACCACAGGTGTACA	ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC	
	CCCTGCCCCCATCCCGGGAG	TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT	
	GAGATGACCAAGAACCAGGTC	CTATCCCAGCGACATCGCCGTG	
	AGCCTGAGCTGCGCCGTCAAA	GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG	
	GGCTTCTATCCCAGCGACATC	CCGGAGAACAACTACAAGACCA	
	GCCGTGGAGTGGGAGAGCAA	CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG	
	TGGGCAGCCGGAGAACAACTA	ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG	
	CAAGACCACGCCTCCCGTGCT	CAAGCTCACCGTGGACAAGAG	

	GGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACAGGTTCACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA (sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTGGATGGGTTAAC GTGATTTCTGACCTGAAGAAGA TCGAGGATCTGATTCAGAGTAT GCACATTGATGCTACACTGTATA CAGAGAGCAACGTGCACCCCA GCTGTAAGGTGACAGCAATGAA GTGCTTCCTGCTCGAACTGCAG AGAATCTCCCTGAAGTCCGGCG ACGCCTCCATCCATGACACAGT CCAGAACCTGATCATCCTGGCA AACAACTCCCTGAGCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGTT GCAAAGAATGCGAGGAGCTGG AGGAGAAAAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 682)	
FUSE-765	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTGGATGGGTTAAC GTGATTTCTGACCTGAAGAAGA TCGAGGATCTGATTCAGAGTAT GCACATTGATGCTACACTGTATA CAGAGAGCAACGTGCACCCCA GCTGTAAGGTGACAGCAATGAA GTGCTTCCTGCTCGAACTGCAG AGAATCTCCCTGAAGTCCGGCG ACGCCTCCATCCATGACACAGT CCAGAACCTGATCATCCTGGCA AACAACTCCCTGAGCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGTT GCAAAGAATGCGAGGAGCTGG AGGAGAAAAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 683)	
FUSE-766	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTGGATGGGTTAAC GTGATTTCTGACCTGAAGAAGA TCGAGGATCTGATTCAGAGTAT GCACATTGATGCTACACTGTATA CAGAGAGCAACGTGCACCCCA GCTGTAAGGTGACAGCAATGAA	

		GTGCTTCCTGCTCGAACTGCAG AGAATCTCCCTGAAGTCCGGCG ACGCCTCCATCCATGACACAGT CCAGAACCTGATCATCCTGGCA AACAACTCCCTGAGCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGTT GCAAAGAATGCGAGGAGCTGG AGGAGAAAAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 684)	
FUSE-767	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT	(sec. con núm. de ident.: 188)

		CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTGGATGGGTTAAC GTGATTTCTGACCTGAAGAAGA TCGAGGATCTGATTCAGAGTAT GCACATTGATGCTACACTGTATA CAGAGAGCAACGTGCACCCCA GCTGTAAGGTGACAGCAATGAA GTGCTTCCTGCTCGAACTGCAG AAGATCAGCCTGAAGTCCGGCG ACGCCTCCATCCATGACACAGT CCAGAACCTGATCATCCTGGCA AACAACTCCCTGAGCAGCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGTT GCAAAGAATGCGAGGAACTGGA AGAGAAGAACATCAAGGAGTTC CTCCAGAGTTTCGTGCACATCG TGCAGATGTTCATCAACACCAG C (sec. con núm. de ident.: 685)	
FUSE-768	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTGGATGGGTTAAC GTGATTTCTGACCTGAAGAAGA TCGAGGATCTGATTCAGAGTAT GCACATTGATGCTACACTGTATA CAGAGAGCAACGTGCACCCCA GCTGTAAGGTGACAGCAATGAA GTGCTTCCTGCTCGAACTGCAG AGAATCTCCCTGAAGTCCGGCG ACGCCTCCATCCATGACACAGT CCAGAACCTGATCATCCTGGCA AACAACTCCCTGAGCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGTT GCAAAGAATGCGAGGAGCTGG AGGAGAAAAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 686)	

FUSE-772	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGGGCTCCGGC GACGCCTCCATCCACGACACCG TGCAGAACCTGATCATCCTGGC CAACAACTCCCTGTCCTCCAAC GGCAACGTGACCGAGTCCGGC TGCAAGGAGTGCGAGGAGCTG GAGGAGAAGAACATCAAGGAGT TCCTGCAGTCCTTCGTGCACAT CGTGCAGATGTTCATCAACACC TCC (sec. con núm. de ident.: 687)	
FUSE-773	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAA GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGGGCTCCGGC GACGCCTCCATCCACGACACCG TGCAGAACCTGATCATCCTGGC CAACAACTCCCTGTCCTCCAAC GGCAACGTGACCGAGTCCGGC TGCAAGGAGTGCGAGGAGCTG GAGGAGAAGAACATCAAGGAGT TCCTGCAGTCCTTCGTGCACAT CGTGCAGATGTTCATCAACACC TCC (sec. con núm. de ident.: 688)	
FUSE-774	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA	

		GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGGGCTCCGGC GACGCCTCCATCCACGACACCG TGCAGAACCTGATCTCCCTGGC CAACAACTCCCTGTCCTCCAAC GGCAACGTGACCGAGTCCGGC TGCAAGGAGTGCGAGGAGCTG GAGGAGAAGAACATCAAGGAGT TCCTGCAGTCCTTCGTGCACAT CGTGCAGATGTTCATCAACACC TCC (sec. con núm. de ident.: 689)	
FUSE-802	CAGGTTCAACTCGTCGAGTCA GGCGGAGGAGTCGTTCAACCA GGAAGAAGCCTCAAACTCGAC TGCAAAGCAAGCGGCATCACC TTCAGCAACAGCGGAATGCAC TGGGTGAGACAAGCACCCGGA AAGGGACTGGAGTGGGTTGCT GTTATTTGGTACGATGGCAGCA AAAGATACTACGCCGACAGTGT GAAAGGCAGATTTACAATCTCA AGGGACAACAGCAAGAACACA CTGTTCCTGCAGATGAGCAGC CTGAGAGCCGAGGATACCGCA GTTTACTACTGCGCCACCAAC GACGACTACTGGGGACAAGGA ACCCTGGTGACCGTGAGTAGC GCTAGCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCC CGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAG	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAAACTCGACTG CAAAGCATCAGGCATCACATTCT CCAACTCCGGCATGCACTGGGT CAGGCAGGCACCTGGAAAAGG ACTGGAGTGGGTGGCCGTGAT CTGGTACGACGGATCAAAGAGG TACTACGCCGACAGTGTCAAAG GCAGGTTTACTATCTCTAGGGA CAACAGCAAGAACACACTGTTC CTGCAGATGAGCTCCCTGAGG GCCGAGGATACCGCTGTTTACT ACTGCGCAACCAACGACGACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGT TACTGTGAGCTCCGCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCCGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATC	(sec. con núm. de ident.: 188)

	CCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGAGCTGCGCC GTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACAGGTTCACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAA (sec. con núm. de ident.: 680)	TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTTCTGGTGGAGGAGGTT CTGGAGGTGGTGGATCAGGAG GAGGAGGAGGATGGGTTAACG TGATTTCTGACCTGAAGAAGATC GAGGATCTGATTCAGAGTATGC ACATTGCTGCTACACTGTATACA GAGAGCAACGTGCACCCCAGC TGTAAGGTGACAGCAATGAAGT GCTTCCTGTTGGAGCTGCAGAG GATCTCCCTGGGCTCCGGTGAT GCAAGCATCCACGACACTGTGC AGAACCTCATTATCCTGGCTAAC AACTCCCTGAGCAGCAACGGCA ACGTGACCGAGTCCGGTTGCAA AGAGTGCGAGGAGCTCGAAGC CAAGAATATTAAGGAGTTCCTGC AGAGTTTCGTGCACATCGTGCA GATGTTCATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 690)	
FUSE-803	(sec. con núm. de ident.: 680)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAAACTCGACTG CAAAGCATCAGGCATCACATTCT CCAACTCCGGCATGCACTGGGT CAGGCAGGCACCTGGAAAAGG ACTGGAGTGGGTGGCCGTGAT CTGGTACGACGGATCAAAGAGG TACTACGCCGACAGTGTCAAAG GCAGGTTTACTATCTCTAGGGA CAACAGCAAGAACACACTGTTC CTGCAGATGAGCTCCCTGAGG GCCGAGGATACCGCTGTTTACT ACTGCGCAACCAACGACGACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGT TACTGTGAGCTCCGCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTT	(sec. con núm. de ident.: 188)

		CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCCGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTTCTGGTGGAGGAGGTT CTGGAGGTGGTGGATCAGGAG GAGGAGGAGGATGGGTTAACG TGATTTCTGACCTGAAGAAGATC GAGGATCTGATTCAGAGTATGC ACATTGATGCTACACTGTATACA GAGAGCAACGTGCACCCCAGC TGTAAGGTGACAGCAATGAAGT GCTTCCTGCTCGAACTGCAGAG AATCTCCCTGGGTAGCGGCGAC GCTTCCATCCATGACACCGTCC AGAACCTGATCATCCTGGCAAA CAACTCCCTGAGCAGCAACGG CAACGTGACCGAGTCCGGTTG CAAAGAGTGCGAGGAGCTGGA GGAGAAGAACATCAAGGAGTTC CTGCAGTCCCTCGTGCACATCG TGCAGATGTTCATCAACACCTC C (sec. con núm. de ident.: 691)	

FUSE-804	(sec. con núm. de ident.: 680)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAAACTCGACTG CAAAGCATCAGGCATCACATTCT CCAACTCCGGCATGCACTGGGT CAGGCAGGCACCTGGAAAAGG ACTGGAGTGGGTGGCCGTGAT CTGGTACGACGGATCAAAGAGG TACTACGCCGACAGTGTCAAAG GCAGGTTTACTATCTCTAGGGA CAACAGCAAGAACACACTGTTC CTGCAGATGAGCTCCCTGAGG GCCGAGGATACCGCTGTTTACT ACTGCGCAACCAACGACGACTA CTGGGGCCAGGGAACCCTGGT TACTGTGAGCTCCGCTAGCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCCGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCA	(sec. con núm. de ident.: 188)

		GGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTTCTGGTGGAGGAGGTT CTGGAGGTGGTGGATCAGGAG GAGGAGGAGGATGGGTTAACG TGATTTCTGACCTGAAGAAGATC GAGGATCTGATTCAGAGTATGC ACATTGATGCTACACTGTATACA GAGAGCAACGTGCACCCCAGC TGTAAGGTGACAGCAATGCAGT GCTTCCTGTCCGAGTTGCAGAG AATCTCCCTGGGCTCCGGCGAC GCTAGTATCCATGACACCGTGC AGAACCTCACCATCCTGGCCAA CAACTCCCTGTCCTCCAACGGC TACGTCACCGAGTCCGGTTGCA AGGAGTGCGAGGAGCTGGAAG CCAAGAACATCAAGGAGTTCCT GCAGAGTTTCGTGCACATCGTG CAGATGTTCATCAACACCAGT (sec. con núm. de ident.: 692)	
FUSE-846	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCTCCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 693)	
FUSE-847	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAA GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA	

		GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCTCCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 694)	
FUSE-848	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT	(sec. con núm. de ident.: 188)

		CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCTCCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGACCATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 695)	
FUSE-849	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCTCCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAGGACCT CC (sec. con núm. de ident.: 696)	

FUSE-850	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAC GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCTCCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGACCATGTTCATCAGGACCT CC (sec. con núm. de ident.: 697)	
FUSE-853	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGAAA GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCATCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 698)	
FUSE-854	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAG GCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACT GCAAGGCATCAGGCATCACATT CTCCAACTCCGGCATGCACTGG GTGAGGCAGGCACCTGGAAAA GGATTGGAGTGGGTGGCAGTG ATCTGGTACGATGGAAGCAAAA GATACTACGCCGACAGCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAATAGCAAGAACACCCTG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TTCTTGCAGATGAGTAGCTTGA GGGCCGAGGACACCGCCGTTT ATTACTGCGCCACCAACGACGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTT GGTGACCGTGAGTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTGG AGGCGGTAGTAACTGGGTGCTG GTGATCTCCGACCTGAAAAAGA TCGAGGACCTGATCCAGTCCAT GCACATCGACGCCACCCTGTAC ACCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGAA	

		GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCAG AGGATCTCCCTGATCTCCGGCG ACGCCTCCATCCACGACACCGT GCAGAACCTGATCATCCTGGCC AACAACTCCCTGTCCTCCAACG GCAACGTGACCGAGTCCGGCT GCAAGGAGTGCGAGGAGCTGG AGGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 699)	

Tabla 2B Polinucleótidos

Nota: El polinucleótido 1 codifica la cadena pesada; el polinucleótido 2, aunque se deja en blanco, es idéntico al polinucleótido 1; el polinucleótido 3 codifica la cadena ligera.

	Polinucleótido 1	Polinucleótido 2	Polinucleótido 3
FUSE-691	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCAGGCGGAGGAGTCGTTCAGCCAG GAAGGAGTCTCAGGCTGGACTGCAAGGCATCAGGCATCACATTC TCCAACTCCGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGAAAAGG ATTGGAGTGGGTGGCAGTGATCTGGTACGATGGAAGCAAAAGATA CTACGCCGACAGCGTCAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACA ATAGCAAGAACACCCTGTTCTTGCAGATGAATAGCTTGAGGGCCG AGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCTACCAACGACGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTTACCGTGAGTAGCGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 129)		(sec. con núm. de ident.: 188)

Tabla 3B — Secuencias de polinucleótido — IL18/IL15

Nota: El polinucleótido 1 codifica la cadena pesada del “orificio”; el polinucleótido 2 codifica la cadena pesada “pomo”; bien el polinucleótido 1 o bien el polinucleótido 2 codifica un enlazador, una variante de IL-18 y una variante de IL-15; el polinucleótido 3 codifica la cadena ligera.

	Polinucleótido 1	Polinucleótido 2	Polinucleótido 3
FUSE-320	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAG CGGGGGGGGACTGGTGCAGG CTGGAGGAAGCCTGAGACTGA GCTGTGCCGCCAGCGGGAGA ACATTTAGCAGCTACGCCATG GGATGGTTTAGACAGGCCCCC GGAAAAGAGAGAGAGTTCGTG GTGGCCATCAACTGGAGCAGC GGAAGCACATACTACGCCGAC AGTGTGAAGGGAAGATTCACC ATCAGCAGAGACAACGCCAAG AACACCATGTACCTGCAGATG AACAGCCTGAAGCCTGAAGAC ACCGCCGTGTACTATTGCGCC GCCGGCTACCAGATCAATAGC GGAAACTACAACTTCAAAGACT ACGAGTATGACTACTGGGGGC AGGGCACCCAGGTGACCGTGA GCAGCGAGCCCAAATCTAGCG ACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCCGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGAGCTG CGCCGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCGTGAGCA	GAGGTGCAGGTGCAGCAGAGC GGACCAGAGCTGGTGAAGCCA GGAACAAGCGTGAAGATTAGCT GTAAGACAAGCGGATATACATT CACAGAGTATACAATGCACTGG GTGAAGCAGAGCCATGGCGAG AGTCTGGAATGGATCGGAGGA ATTGTGCCCAACAACGGAGCCA CCAACTACAACCAGAAATTCAG GGGCAAAGCCACCCTGACCGT GGACAAGTCCAGCAGCACCGC ATACATGGAGCTGAGGAGCCT GACCAGCGAAGACTCCGCCGT GTACTACTGCGCCAGAAGGGG CCTGCTGTGGCACTTCGCCTAT TGGGGCCAGGGAACCCTGGTG ACCGTGTCCGCCGCTAAGACC ACCCCCCCCTCCGTGTATCCCC TGGCCCCTGGAAGTGCCGCCC AGACAAACTCCATGGTGACCCT GGGCTGTCTGGTGAAAGGATA CTTCCCCGAACCCGTGACCGT GACCTGGAACTCCGGCTCCCT GAGCTCCGGCGTGCACACCTTT CCCGCCGTGCTGCAGTCCGAC CTGTATACCCTGTCTTCCTCCG TGACCGTGCCCTCCTCCACCTG GCCCTCCGAGACTGTGACCTG CAATGTGGCCCACCCCGCTTCC TCCACCAAGGTGGACAAGAAAA TCGTGCCCCGCGACTGCGACA AAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCCGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCCG AGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC	GACATTCTGATGACCCAGTCC CCCTCCGCCATGTCCGTGAGC CTGGGCGACACCGTGAGCATC ACCTGCCACGCCTCCCAGGGC ATCTCCTCCTATATCGGCTGG CTGCAGCAGAAACCCGGCAAG TCCTTCAAGGGCCTGATCTAC CACGGCACCAATCTGGAGGAC GGCGTGCCCTCCCGGTTCTCC GGATCTGGCTCTGGCGCCGAC TACTCCCTGACTATCTCCTCCC TGGAATCCGAAGACTTCGCCG ACTACTACTGCATCCAGTACG CCCAGTTTCCCTTCACCTTCG GCTCCGGCACCAAGCTGGAGA TCAAGAGAGCAGATGCTGCAC CAACTGTATCCATCTTCCCACC ATCCAGTGAGCAGTTAACATCT GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGC TTCTTGAACAACTTCTACCCCA AAGACATCAATGTCAAGTGGA AGATTGATGGCAGTGAACGAC AAAATGGCGTCCTGAACAGTT GGACTGATCAGGACAGCAAAG ACAGCACCTACAGCATGAGCA GCACCCTCACGTTGACCAAGG ACGAGTATGAACGACATAACA GCTATACCTGTGAGGCCACTC ACAAGACATCAACTTCACCCAT TGTCAAGAGCTTCAACAGGAA TGAGTGT (sec. con núm. de ident.: 732)

	AGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCGGTTCA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 700)	AGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 724)	
FUSE-696	(sec. con núm. de ident.: 678)	(sec. con núm. de ident.: 681)	(sec. con núm. de ident.: 188)
FUSE-697	CAGGTTCAGCTCGTCGAAAGC GGAGGAGGAGTCGTTCAGCCA GGAAGATCCCTCAGGCTCGAC TGTAAGGCCTCCGGAATCACCT TCTCCAACTCCGGAATGCACTG GGTCAGGCAGGCTCCTGGAAA AGGACTGGAGTGGGTGGCTGT GATTTGGTACGACGGCTCCAA GAGATACTACGCCGACTCTGT GAAGGGCCGGTTCACTATCTC CAGGGACAACTCCAAGAACAC ACTGTTCCTGCAGATGAACTCC CTGCGGGCTGAGGATACTGCC GTTTATTACTGCGCCACCAACG ATGACTACTGGGGACAGGGAA CCTTGGTGACCGTGAGTAGCG CTAGCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCA	(sec. con núm. de ident.: 681)	(sec. con núm. de ident.: 188)

	CACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCCGCAGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCCGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGAGCTGCGCCGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTG AGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACAGGTT CACACAGAAGAGCTTGAGCTT GAGCCCCGGCGGAGGCGGGG GATCTGGGGGAGGAGGTAGTG GAGGCGGAGGATCCGGCGGT GGAGGTTCTGGTGGTGGGGGC AGTGGGGGTGGCGGATCAGCT GCTGAACCTGTGGAAGATAATT CTATTAACTTCGTGGCCATGAA GTTCATCGATAATACTCTGTAC TTCATCGCCGAAGATGATGAAA ATATCGAGCAGGATTACTTCGG CAAACTGGAAAGCAAACTGAG CGTGATCAGGAACCTCAACGA CCAGGTGCTGTTCATCGATCAG GGCAACAGGCCCCTCTTTGAG GACATGACCGACAGCGATAGC AGGGACAACGCACCTAGGACA ATCTTCATCATCTCCAAGTACG GCGACTCCCAGCCCAGAGGAT TGGCTGTGACAATTTCCGTGAA ATCCGAGAAGATCTCCACCCTG TCCAGCGAGAACAAGATCATCT CCTTCAAGGAGATGAACCCCC CCGACAACATCAAGGACACAA AGTCCGACATCATCTTCTTCCA GCGCTCCGTGCCCGGTCATGA TAACAAGGTCCAGTTCGAGTCC AGCTCCTACGAGGGATACTTTC		

	TGGCCTCAGAGAAGGAAAGGG ACCTGTTCAAACTCATCCTGAA GAAGGAGGACGAGCTGGGGG ACAGAAGCATCATGTTCACCGT CCAGAATGAGGAC (sec. con núm. de ident.: 130)		
FUSE-765	(sec. con núm. de ident.: 679)	(sec. con núm. de ident.: 683)	(sec. con núm. de ident.: 188)
FUSE-773	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCA GGCGGAGGAGTCGTTCAGCCA GGAAGGAGTCTCAGGCTGGAC TGCAAGGCATCAGGCATCACA TTCTCCAACTCCGGCATGCAC TGGGTGAGGCAGGCACCTGG AAAAGGATTGGAGTGGGTGGC AGTGATCTGGTACGATGGAAG CAAAAGATACTACGCCGACAG CGTCAAGGGCAGGTTCACCAT CAGCAGGGACAATAGCAAGAA CACCCTGTTCTTGCAGATGAG TAGCTTGAGGGCCGAGGACAC CGCCGTTTATTACTGCGCCAC CAACGACGACTACTGGGGCCA GGGAACCTTGGTGACCGTGAG TTCCGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCCGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCCGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCG	(sec. con núm. de ident.: 188)

		TCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGTGGTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTG GAGGCGGTAGTAACTGGGTGA AAGTGATCTCCGACCTGAAAA AGATCGAGGACCTGATCCAGT CCATGCACATCGACGCCACCC TGTACACCGAGTCCAACGTGC ACCCCTCCTGCAAGGTGACCG CCATGAAGTGCTTCCTGCTGG AGCTGCAGAGGATCTCCCTGG GCTCCGGCGACGCCTCCATCC ACGACACCGTGCAGAACCTGA TCATCCTGGCCAACAACTCCC TGTCCTCCAACGGCAACGTGA CCGAGTCCGGCTGCAAGGAGT GCGAGGAGCTGGAGGAGAAG AACATCAAGGAGTTCCTGCAG TCCTTCGTGCACATCGTGCAG ATGTTCATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 688)	
FUSE-774	(sec. con núm. de ident.: 679)	CAGGTTCAGCTCGTCGAGTCA GGCGGAGGAGTCGTTCAGCCA GGAAGGAGTCTCAGGCTGGAC TGCAAGGCATCAGGCATCACA TTCTCCAACTCCGGCATGCAC TGGGTGAGGCAGGCACCTGG AAAAGGATTGGAGTGGGTGGC AGTGATCTGGTACGATGGAAG CAAAAGATACTACGCCGACAG CGTCAAGGGCAGGTTCACCAT CAGCAGGGACAATAGCAAGAA CACCCTGTTCTTGCAGATGAG TAGCTTGAGGGCCGAGGACAC CGCCGTTTATTACTGCGCCAC CAACGACGACTACTGGGGCCA GGGAACCTTGGTGACCGTGAG TTCCGCTAGCACCAAGGGCCC	(sec. con núm. de ident.: 188)

		ATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCCGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCCGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGTGGTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTGGTGGTGGCGGATC AGGTGGGGGAGGCTCTGGTG GAGGCGGTAGTAACTGGGTGA ACGTGATCTCCGACCTGAAAA AGATCGAGGACCTGATCCAGT CCATGCACATCGACGCCACCC TGTACACCGAGTCCAACGTGC ACCCCTCCTGCAAGGTGACCG CCATGAAGTGCTTCCTGCTGG AGCTGCAGAGGATCTCCCTGG GCTCCGGCGACGCCTCCATCC ACGACACCGTGCAGAACCTGA	

		TCTCCCTGGCCAACAACTCCC TGTCCTCCAACGGCAACGTGA CCGAGTCCGGCTGCAAGGAGT GCGAGGAGCTGGAGGAGAAG AACATCAAGGAGTTCCTGCAG TCCTTCGTGCACATCGTGCAG ATGTTCATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 689)	
FUSE-916	GCTGCTGAACCTGTGGAAGAT AATGTGATCAATTTCGTGGCCA TGAAATTCATCGATAACACCCT GTACTTCATCGCTGAAGATGAT GAGAACATTGAACAGGACTATT TCGGAAAACTGGAAAGCAAAC TGAGCGTGATCAGGAACCTCA ACGATCAGGTGCTGTTCATCG ACCAGGGCAACAGGCCACTCT TTGAGGACATGACAGACAGCG ACGTCAGGGACAACGCTCCTA GAACCATTTTCATCATCTCCAA ATACGGCGACTCCCAGCCAAG GGGACTCGCTGTTACAATTTC CGTGAAAGTCGAGAAGATTTC CACCCTGTCAGTGGAGAACAA GATCATCTCCTTCAAAGAAATG AACCCCCCCGACAACATCAAG GACACCAAGTCCGACATCATC TTCTTCCAGCGCTCTGTGCCC GGGCATGATAACAAAGTCCAG TTCGAAAGCTCCTCCTACGAG GGCTACTTCCTGGCAGTCGAA AAGGAAAGGGACCTGTTCAAG CTGATCCTGAAGAAGGAGGAC GAGCTGGGGGACAGAAGCATC ATGTTCACCGTGCAGAACGAA GACGGTGGAGGAGGTTCTGGA GGTGGTGGATCAGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCCGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGT	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCC GGAGGAGGATTGGTGCAGCCT GGAGGATCTCTGAGGCTGAGT TGTGCCGCTTCCGGATTCTCC ATCTCCGGATACGCTATGGGT TGGGTGAGGCAGGCTCCTGGA AAGGGATTGGAGTTTGTGGCT GGGATTGACGTCGCCGGAATC TCTCCAGACTACGGTGCTGCT GTGAAGGGCAGATCCACCATT TCTAGGGACAATTCCAAGAAC ACCCTGTACTTGCAGATGAAC AGCCTGAGGGCCGAAGATACT GCTGTGTACTACTGCGCCAAG ACCGTGGTTATTGAGGGACTG TTCTCTACCCCCTACATCGACG CCTGGGGGACAGGGAACACTG GTTACAGTCTCCTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGG CGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCCGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCAT	TCTTACGAGCTGATGCAGCCC CCATCTGTTTCCGTCTCCCCTG GACAGACCGCTAGAATCACCT GCTCCGGTGGTGGTTACGACG GTTCTTACTACTACGGCTGGTA CCAGCAGAAGCCCGGACAGG CTCCTGTTACTGTCATCTATGA CAACACCAACAGGCCCTCCGG CATCCCTGAAAGATTCTCCGG TTCCAACAGCGGGAACACAAT CACCCTGACCATCTCCGGCGT GCAGGCTGAAGATGAAGCCGA TTATTACTGCGGCGGCTACGA CAGATCCGGCGGAATCTTTGG AGGCGGTACCAAGCTGACAGT GCTGCGTACGGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAG CACCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGTTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTGGAGGCGGGGGAT CTGGGGGAGGAGGTAGTGGA GGCGGAGGATCCGGCGGTGG AGGTTCTGGTGGTGGGGGCA GTGGGGGTGGCGGATCAGAA GTGCAGCTGCTGGAATCCGGA GGAGGATTGGTGCAGCCTGGA GGATCTCTGAGGCTGAGTTGT ACCGCCTCCGGATACACCAAC AGGCTGAAGTGCATGGGATGG TTTAGGCAGGCCCCCGGAAAA GAGAGGGAGGAAATCGCTTCC ATCTCCACCGGAACAGGCAAC ACATACTACGCCGACTCCGTC AAGGGCAGGTTCACAATCTCC AGGGACAAGAGCAGGAACACC CTGTACCTGCAGATGAGCACC CTGAGGGCTGAGGATACCGCA GTTTACTATTGCGCCGCCGAC

	CAGCCTGAGCTGCGCCGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGC TGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCGTGAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACAGATTCACCCAGAAGA GCCTGTCCCTGTCCCCTGGAG GTGGTGGCGGATCAGGTGGG GGAGGCTCTGGTGGAGGCGG TAGTAACTGGGTGAAAGTGAT CTCCGACCTGAAAAAGATCGA GGACCTGATCCAGTCCATGCA CATCGACGCCACCCTGTACAC CGAGTCCAACGTGCACCCCTC CTGCAAGGTGACCGCCATGAA GTGCTTCCTGCTGGAGCTGCA GAGGATCTCCCTGATCTCCGG CGACGCCTCCATCCACGACAC CGTGCAGAACCTGATCATCCT GGCCAACAACTCCCTGTCCTC CAACGGCAACGTGACCGAGTC CGGCTGCAAGGAGTGCGAGG AGCTGGAGGAGAAGAACATCA AGGAGTTCCTGCAGTCCTTCG TGCACATCGTGCAGATGTTCAT CAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 701)	CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGTGGTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 725)	GTGCGACCTCATGGAACAACA TGCCACTACAACAGCAGGGGC CAGGGAACACAGGTGACAGTT AGCAGC (sec. con núm. de ident.: 733)
FUSE-923	GCTGCTGAACCTGTGGAAGAT AATGTGATCAATTTCGTGGCC ATGAAATTCATCGATAACACC CTGTACTTCATCGCTGAAGAT GATGAGAACATTGAACAGGAC TATTTCGGAAAACTGGAAAGC AAACTGAGCGTGATCAGGAAC CTCAACGATCAGGTGCTGTTC ATCGACCAGGGCAACAGGCC ACTCTTTGAGGACATGACAGA CAGCGACGTCAGGGACAACG CTCCTAGAACCATTTTCATCAT CTCCAAATACGGCGACTCCCA GCCAAGGGGACTCGCTGTTAC AATTTCCGTGAAAGTCGAGAA GATTTCCACCCTGTCAGTGGA GAACAAGATCATCTCCTTCAA AGAAATGAACCCCCCCGACAA CATCAAGGACACCAAGTCCGA CATCATCTTCTTCCAGCGCTC TGTGCCCGGGCATGATAACAA AGTCCAGTTCGAAAGCTCCTC CTACGAGGGCTACTTCCTGGC AGTCGAAAAGGAAAGGGACCT GTTCAAGCTGATCCTGAAGAA	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGC GGAGGAGGATTGGTGCAGGCA GGAGGAAGTCTGAGGCTGAGT TGTGCCGCTAGTGGAAGGCCA TTTAGCAACTACGGGATGGGAT GGTTTAGGCAGGCACCCGGAA AAAAGAGGGAGTTCGTGGCCG GCATCTCCTGGTCCGGCGGCT CCACCGACTACGCCGACTCCG TGAAGGGCAGGTTCACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAACAC CGTGTACCTGCAGATGAACTCC CTGAAGCCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCGCCGCCGTGT TCTCCGGCGCCGAGACAGCCT ACTACCCCTCCGACGACTACGA CTACTGGGGCCAGGGCACCCA GGTGACCGTGTCCTCCGGTGG CGGAGGGTCTGGTGGTGGAGG ATCCGGGGGAGGAGGTTCAGG AGGCGGGGGAAGTGAAGTGCA GCTGCTGGAATCCGGAGGAGG ATTGGTGCAGCCTGGAGGATCT CTGAGGCTGAGTTGTACCGCCT CCGGATACACCAACAGGCTGAA	

	GGAGGACGAGCTGGGGGACA GAAGCATCATGTTCACCGTGC AGAACGAAGACGGTGGAGGA GGTTCTGGAGGTGGTGGATCA GACAAGACACACACCTGCCCC CCCTGCCCCGCACCTGAGGC TGCTGGAGGACCTAGTGTGTT CCTGTTCCCCCCCAAACCCAA GGACACCCTGATGATTAGCAG AACCCCCGAGGTGACCTGCG TGGTCGTGGACGTCTCCCACG AAGACCCCGAAGTGAAATTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTC GAGGTGCACAACGCAAAGAC CAAGCCCAGAGAAGAGCAATA TAATAGCACCTATAGAGTGGT GAGCGTGCTCACCGTGCTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGG AAGGAGTATAAGTGCAAGGTG AGCAACAAGGCACTGCCTGCC CCCATAGAAAAAACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCCAG AGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCCAGCAGAGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGAGCC TGAGCTGCGCCGTGAAGGGC TTCTACCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAA GACCACCCCCCCCGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGGTGAGCAAGCTGACCGTG GACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACAGATTCACCCAGAAG AGCCTGTCCCTGTCCCCTGGA GGTGGTGGCGGATCAGGTGG GGGAGGCTCTGGTGGAGGCG GTAGTAACTGGGTGAAAGTGA TCTCCGACCTGAAAAAGATCG AGGACCTGATCCAGTCCATGC ACATCGACGCCACCCTGTACA CCGAGTCCAACGTGCACCCCT CCTGCAAGGTGACCGCCATGA AGTGCTTCCTGCTGGAGCTGC AGAGGATCTCCCTGATCTCCG GCGACGCCTCCATCCACGACA CCGTGCAGAACCTGATCATCC TGGCCAACAACTCCCTGTCCT CCAACGGCAACGTGACCGAG TCCGGCTGCAAGGAGTGCGA GGAGCTGGAGGAGAAGAACA TCAAGGAGTTCCTGCAGTCCT TCGTGCACATCGTGCAGATGT TCATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 702)	GTGCATGGGATGGTTTAGGCA GGCCCCCGGAAAAGAGAGGGA GGAAATCGCTTCCATCTCCACC GGAACAGGCAACACATACTACG CCGACTCCGTCAAGGGCAGGT TCACAATCTCCAGGGACAAGAG CAGGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACACACTGAGGGCCGAG GACACAGCAGTGTACTACTGCG CAGCCGACGTTAGGCCTCATG GAACAACATGCCACTACAACAG CAGGGGCCAGGGAACACAGGT GACAGTTTCCAGCGAACCTAAG AGCTCCGACAAGACCCACACCT GCCCCCCTTGCCCCGCTCCTG AAGCTGCTGGAGGCCCTTCAGT GTTTCTGTTTCCTCCCAAGCCC AAGGACACACTGATGATTTCCA GAACCCCCGAGGTGACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGATCCCGAGGTGAAGTTTAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACCAAA CCCCGCGAGGAGCAGTATAATA GCACCTACAGAGTGGTGAGCG TGCTGACCGTGCTGCATCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATA CAAATGCAAGGTGAGCAACAAG GCCCTGCCTGCCCCTATCGAG AAGACCATCAGCAAAGCCAAGG GACAGCCAAGAGAACCCCAGG TGTACACCCTGCCCCCCAGCA GAGAAGAAATGACCAAGAACCA GGTGAGCCTGTGGTGCCTGGT GAAAGGCTTCTACCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AACGGCCAGCCAGAGAACAAC TACAAGACAACACCCCCCGTGC TGGACAGCGACGGCTCTTTCTT CCTGTACAGTAAACTGACCGTG GACAAATCAAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCTCC GTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCACTATACCCAGAAGAGCC TGTCCCTGAGCCCCGGCAAG (sec. con núm. de ident.: 726)	

FUSE-926	GAGCCCAAATCTTCTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCCGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGAGCTGCGCCGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC GTGAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAAC CGGTTCACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 725)	(sec. con núm. de ident.: 733)
FUSE-943	GCTGCTGAACCTGTGGAAGATA ATGTGATCAATTTTGTGGCCAT GAAATTTATTGACAACACCCTGT ATTTCATCGCCGAAGATGATGA AAACATTGAACAGGACTATTTC GGAAAGCTGGAATCCAAATTGA GCGTGATCAGGAATCTGAACGA TCAGGTGCTGTTCATCGACCAG GGCAACAGGCCTCTCTTCGAG GACATGACAGACTCCGACGTCA GGGACAACGCACCCAGAACCA TCTTCATCATCTCCAAGTACGG CGACTCCCAGCCAAGGGGACT CGCTGTTACAATCTCCGTGAAA GTGGAGAAAATCTCCACACTGT CCGTGGAGAACAAGATCATTTC CTTCAAGGAGATGAACCCCCCC GACAACATCAAGGACACCAAGT CCGACATCATCTTCTTCCAGCG CTCTGTGCCCGGTCACGACAAC AAAGTGCAGTTCGAGTCCTCCT CCTACGAGGGCTACTTCCTGGC CGTCGAAAAGGAAAGGGACCT	(sec. con núm. de ident.: 724)	(sec. con núm. de ident.: 732)

	GTTCAAACTGATCCTGAAGAAG GAGGACGAGCTGGGGGACAGG AGCATCATGTTCACCGTGCAGA ACGAGGACGGTGGAGGAGGTT CTGGAGGTGGTGGATCAGACA AGACACACACCTGCCCCCCCT GCCCCGCACCTGAGGCTGCTG GAGGACCTAGTGTGTTCCTGTT CCCCCCCAAACCCAAGGACAC CCTGATGATTAGCAGAACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTCGTG GACGTCTCCCACGAAGACCCC GAAGTGAAATTTAACTGGTACG TGGACGGCGTCGAGGTGCACA ACGCAAAGACCAAGCCCAGAG AAGAGCAATATAATAGCACCTA TAGAGTGGTGAGCGTGCTCAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAGGTGAGCAACAAGGCACT GCCTGCCCCCATAGAAAAAACC ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCCAGAGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCAGCAGAGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTG AGCCTGAGCTGCGCCGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACAACTACAA GACCACCCCCCCCGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG GTGAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCAGATGGCAGCAGGGC AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACA GATTCACCCAGAAGAGCCTGTC CCTGTCCCCCGGAGGTGGTGG CGGATCAGGTGGGGGAGGCTC TGGTGGAGGCGGTAGTAACTG GGTGAAAGTGATCTCCGACCTG AAAAAGATCGAGGACCTGATCC AGTCCATGCACATCGACGCCAC CCTGTACACCGAGTCCAACGTG CACCCCTCCTGCAAGGTGACC GCCATGAAGTGCTTCCTGCTGG AGCTGCAGAGGATCTCCCTGG GCTCCGGCGACGCCTCCATCC ACGACACCGTGCAGAACCTGAT CATCCTGGCCAACAACTCCCTG TCCTCCAACGGCAACGTGACC GAGTCCGGCTGCAAGGAGTGC GAGGAGCTGGAGGAGAAGAAC ATCAAGGAGTTCCTGCAGTCCT TCGTGCACATCGTGCAGATGTT CATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 703)		

FUSE-944	GAGCCCAAATCTAGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCCGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCCGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGA GCTGCGCCGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCGGTTCAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 132)	GCTGCTGAACCTGTGGAAGATA ATGTGATCAATTTTGTGGCCAT GAAATTTATTGACAACACCCTGT ATTTCATCGCCGAAGATGATGA AAACATTGAACAGGACTATTTC GGAAAGCTGGAATCCAAATTGA GCGTGATCAGGAATCTGAACGA TCAGGTGCTGTTCATCGACCAG GGCAACAGGCCTCTCTTCGAG GACATGACAGACTCCGACGTCA GGGACAACGCACCCAGAACCA TCTTCATCATCTCCAAGTACGG CGACTCCCAGCCAAGGGGACT CGCTGTTACAATCTCCGTGAAA GTGGAGAAAATCTCCACACTGT CCGTGGAGAACAAGATCATTTC CTTCAAGGAGATGAACCCCCCC GACAACATCAAGGACACCAAGT CCGACATCATCTTCTTCCAGCG CTCTGTGCCCGGTCACGACAAC AAAGTGCAGTTCGAGTCCTCCT CCTACGAGGGCTACTTCCTGGC CGTCGAAAAGGAAAGGGACCT GTTCAAACTGATCCTGAAGAAG GAGGACGAGCTGGGGGACAGG AGCATCATGTTCACCGTGCAGA ACGAGGACGGTGGAGGAGGTT CTGGAGGTGGTGGATCAGACA AGACCCACACCTGCCCCCCTTG CCCCGCTCCTGAAGCTGCTGG AGGCCCTTCAGTGTTTCTGTTT CCTCCCAAGCCCAAGGACACA CTGATGATTTCCAGAACCCCCG AGGTGACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGATCCCG AGGTGAAGTTTAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCACAA CGCCAAGACCAAACCCCGCGA GGAGCAGTATAATAGCACCTAC AGAGTGGTGAGCGTGCTGACC GTGCTGCATCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAATACAAATGCA AGGTGAGCAACAAGGCCCTGC CTGCCCCTATCGAGAAGACCAT CAGCAAAGCCAAGGGACAGCC AAGAGAACCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCAGCAGAGAAGAA ATGACCAAGAACCAGGTGAGC CTGTGGTGCCTGGTGAAAGGC TTCTACCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCAGAGAACAACTACAAGAC AACACCCCCCGTGCTGGACAG CGACGGCTCTTTCTTCCTGTAC AGTAAACTGACCGTGGACAAAT CAAGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGCTCCGTGATGCA	

		CGAGGCCCTGCACAACCACTAT ACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGA GCCCCGGCGGTGGTGGCGGAT CAGGTGGGGGAGGCTCTGGTG GAGGCGGTAGTAACTGGGTGA AAGTGATCTCCGACCTGAAAAA GATCGAGGACCTGATCCAGTCC ATGCACATCGACGCCACCCTGT ACACCGAGTCCAACGTGCACC CCTCCTGCAAGGTGACCGCCAT GAAGTGCTTCCTGCTGGAGCTG CAGAGGATCTCCCTGGGCTCC GGCGACGCCTCCATCCACGAC ACCGTGCAGAACCTGATCATCC TGGCCAACAACTCCCTGTCCTC CAACGGCAACGTGACCGAGTC CGGCTGCAAGGAGTGCGAGGA GCTGGAGGAGAAGAACATCAA GGAGTTCCTGCAGTCCTTCGTG CACATCGTGCAGATGTTCATCA ACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 727)	
FUSE-966	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 726)	
FUSE-967	GCTGCTGAACCTGTGGAAGATA ATGTGATCAATTTTGTGGCCAT GAAATTTATTGACAACACCCTGT ATTTCATCGCCGAAGATGATGA AAACATTGAACAGGACTATTTC GGAAAGCTGGAATCCAAATTGA GCGTGATCAGGAATCTGAACGA TCAGGTGCTGTTCATCGACCAG GGCAACAGGCCTCTCTTCGAG GACATGACAGACTCCGACGTCA GGGACAACGCACCCAGAACCA TCTTCATCATCTCCAAGTACGG CGACTCCCAGCCAAGGGGACT CGCTGTTACAATCTCCGTGAAA GTGGAGAAAATCTCCACACTGT CCGTGGAGAACAAGATCATTTC CTTCAAGGAGATGAACCCCCCC GACAACATCAAGGACACCAAGT CCGACATCATCTTCTTCCAGCG CTCTGTGCCCGGTCACGACAAC AAAGTGCAGTTCGAGTCCTCCT CCTACGAGGGCTACTTCCTGGC CGTCGAAAAGGAAAGGGACCT GTTCAAACTGATCCTGAAGAAG GAGGACGAGCTGGGGGACAGG AGCATCATGTTCACCGTGCAGA ACGAGGACGGTGGAGGAGGTT	(sec. con núm. de ident.: 726)	

	CTGGAGGTGGTGGATCAGACA AGACACACACCTGCCCCCCCT GCCCCGCACCTGAGGCTGCTG GAGGACCTAGTGTGTTCCTGTT CCCCCCCAAACCCAAGGACAC CCTGATGATTAGCAGAACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTCGTG GACGTCTCCCACGAAGACCCC GAAGTGAAATTTAACTGGTACG TGGACGGCGTCGAGGTGCACA ACGCAAAGACCAAGCCCAGAG AAGAGCAATATAATAGCACCTA TAGAGTGGTGAGCGTGCTCAC CGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAGGTGAGCAACAAGGCACT GCCTGCCCCCATAGAAAAAACC ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCCAGAGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCAGCAGAGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTG AGCCTGAGCTGCGCCGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACAACTACAA GACCACCCCCCCCGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG GTGAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCAGATGGCAGCAGGGC AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACA GATTCACCCAGAAGAGCCTGAG CCTGAGCCCCGGCAAG (sec. con núm. de ident.: 704)		
FUSE-968	GAACCTAAATCCTCCGACAAGA CACACACCTGCCCCCCCTGCC CCGCACCTGAGGCTGCTGGAG GACCTAGTGTGTTCCTGTTCCC CCCCAAACCCAAGGACACCCT GATGATTAGCAGAACCCCCGAG GTGACCTGCGTGGTCGTGGAC GTCTCCCACGAAGACCCCGAA GTGAAATTTAACTGGTACGTGG ACGGCGTCGAGGTGCACAACG CAAAGACCAAGCCCAGAGAAG AGCAATATAATAGCACCTATAG AGTGGTGAGCGTGCTCACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGGAAGGAGTATAAGTGCAA GGTGAGCAACAAGGCACTGCC TGCCCCCATAGAAAAAACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCC AGAGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCAGCAGAGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGAGC CTGAGCTGCGCCGTGAAGGGC TTCTACCCCAGCGACATCGCCG	(sec. con núm. de ident.: 726)	

	TGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACTACAAGAC CACCCCCCCCGTGCTGGACAG CGACGGCAGCTTCTTCCTGGTG AGCAAGCTGACCGTGGACAAG AGCAGATGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACAGATT CACCCAGAAGAGCCTGTCCCT GTCCCCCGGAGGTGGTGGCGG ATCAGGTGGGGGAGGCTCTGG TGGAGGCGGTAGTAACTGGGT GAAAGTGATCTCCGACCTGAAA AAGATCGAGGACCTGATCCAGT CCATGCACATCGACGCCACCCT GTACACCGAGTCCAACGTGCAC CCCTCCTGCAAGGTGACCGCC ATGAAGTGCTTCCTGCTGGAGC TGCAGAGGATCTCCCTGATCTC CGGCGACGCCTCCATCCACGA CACCGTGCAGAACCTGATCATC CTGGCCAACAACTCCCTGTCCT CCAACGGCAACGTGACCGAGT CCGGCTGCAAGGAGTGCGAGG AGCTGGAGGAGAAGAACATCAA GGAGTTCCTGCAGTCCTTCGTG CACATCGTGCAGATGTTCATCA ACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 705)		
FUSE-1145	GCTGCTGAACCTGTGGAAGAT AATGTGATCAATTTCGTGGCCA TGAAGTTCATTGACAACACCCT GTACTTCATCGCTGAAAACGAT GAGAACGGCGGAGGATCTTAC TTCGGAAAACTGAAATCCAAG CTGAGCGTGATCAGGAACCTG AACGATCAGGTGCTGTTCATC GACCAGGGCAATAGGCCCCTG TTCGAGGATATGACAGACTCC GACGTGAGGGACAACGCTCCA AGAACCATCTTCATCATCTCTC ACTACGGCGACTCCCAGCCAA GGGGAATGGCTGTGACAATCT CCGTGAAGGTGGAGAAGATTT CCACCCTGTCCGTTGAGAACA AGATCATCTCCTTCAAAGAGAT GAACCCCCCCCGACAACATCAA AGACACCAAATCCGACATCAT CTTCTTCCAGCGCAGCGTGCC TGGGCATGATAACAAAATGCA GTTCGAAAGCTCCTCCTACGA GGGATACTTCCTCGCCGTCGA AAAGGAAAGGGACCTGTTCAA GCTGATCCTGAAGAAGGAGGA TGAATTGGGGGATAGGAGCAT CATGTTCACCGTCCAGAACGA AGACGAGCCTAAATCCTCCGA	GCTGTTACCCTGGATGAGTCC GGAGGAGGATTGCAGACCCCC GGAGGAGCTTTGTCCCTGGTT TGTAAGGCCTCTGGATTTGATT TTTCCTCTCATGAAATGCAGTG GGTGAGGCAGGCCCCCGGAA AAGGATTGGAGTTCGTGGCCG GGATTGGCAACATGGGGTCTT TTACCGTGTACGGGGCAGCAG TGAAGGGTAGGGCTACCATCT CCAGGGACAACGGCCAGAGC ACCGTGAGACTGCAGCTGAAC AACCTGAGGGCCGAGGACACC GGAACCTATTACTGTGCAAGG GACTTTTACAACTCCTACGGAT GCAGTGCCTCCTTCATCGACG CATGGGGCCACGGAACCGAG GTTATCGTGTCCTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGG CGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGC	CAGTCTGCACTCACCCAGCCAT CCTCCGTCTCCGCTAACCCAGG AGAAACCGTCAAAATCACCTGC TCCGGCGGCTCCTACAACTACG GATGGTTCCAGCAGAAATCCCC CGGCTCCGCACCTGTTACCGTG ATTTACTCCAATAATCAGAGGC CTTCCGACATCCCCTCCAGATT CTCCGGCTCCACCTCCGGTTCC ACCTCTACACTGACCATCACCG GCGTCCAGGCTGACGATGAGG CTATCTATTACTGCGGCTCCTG GGACGACTCCTCCTACGTTGGA ATCTTCGGCGCTGGTACCACCC TCACCGTCTTGGGTCAGCCCAA GGCTGCCCCCTCGGTCACTCT GTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACAC TGGTGTGTCTCATAAGTGACTT CTACCCGGGAGCCGTGACAGT GGCCTGGAAGGCAGATAGCAG CCCCGTCAAGGCGGGAGTGGA GACCACCACACCCTCCAAACAA AGCAACAACAAGTACGCGGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACG CCTGAGCAGTGGAAGTCCCAC AGGAGCTACAGTTGCCAGGTCA CGCATGAAGGGAGCACCGTGG

	CAAGACACACACCTGCCCCCC CTGCCCCGCACCTGAGGCTGC TGGAGGACCTAGTGTGTTCCT GTTCCCCCCCAAACCCAAGGA CACCCTGATGATTAGCAGAAC CCCCGAGGTGACCTGCGTGGT CGTGGACGTCTCCCACGAAGA CCCCGAAGTGAAATTTAACTG GTACGTGGACGGCGTCGAGGT GCACAACGCAAAGACCAAGCC CAGAGAAGAGCAATATAATAG CACCTATAGAGTGGTGAGCGT GCTCACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGGAAGGAGTA TAAGTGCAAGGTGAGCAACAA GGCACTGCCTGCCCCCATAGA AAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCAGAGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCCA GCAGAGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTGAGCCTGAGCTGCG CCGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCC CCCCGTGCTGGACAGCGACG GCAGCTTCTTCCTGGTGAGCA AGCTGACCGTGGACAAGAGCA GATGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACAGGTTCA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGA GCCCCGGCGGTGGTGGCGGA TCAGGTGGGGGAGGCTCTGGT GGAGGCGGTAGTAACTGGGTG AACGTGATCTCCGACCTGAAA AAGATCGAGGACCTGATCCAG TCCATGCACATCGACGCCACC CTGTACACCGAGTCCAACGTG CACCCCTCCTGCAAGGTGACC GCCATGAAGTGCTTCCTGCTG GAGCTGCAGAGGATCTCCCTG ATCTCCGGCGACGCCTCCATC CACGACACCGTGCAGAACCTG ATCTCCCTGGCCAACAACTCC CTGTCCTCCAACGGCAACGTG ACCGAGTCCGGCTGCAAGGAG TGCGAGGAGCTGGAGGAGAA GAACATCAAGGAGTTCCTGCA GTCCTTCGTGCACATCGTGCA GATGTTCATCAACACCTCC (sec. con núm. de ident.: 706)	CCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCCGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCCGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A (sec. con núm. de ident.: 728)	AGAAGACAGTGGCCCCTACAG AATGTTCAGGAGGCGGGGGAT CTGGGGGAGGAGGTAGTGGAG GCGGAGGATCCGGCGGTGGAG GTTCTGGTGGTGGGGGCAGTG GGGGTGGCGGATCAGAAGTGC AGCTGCTGGAGTCCGGAGGAG GATTGGTGCAGCCTGGAGGAA GCCTGAGGCTGTCTTGTACCGC CTCCGGATACACCAACAGGCTG AAGTGCATGGGATGGTTTAGGC AGGCCCCTGGCAAGGAGAGGG AGGAAATCGCTAGCATTAGCAC CGGAACAGGAAACACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAAGGCAGA TTCACAATCTCCAGGGACAAGA GTAGGAACACACTGTATCTGCA GATGAGCACACTGAGGGCCGA GGACACCGCAGTTTACTATTGC GCCGCCGACGTTAGGCCCCAT GGAACAACATGCCACTACAACT CCAGGGGACAGGGAACCCAGG TGACCGTTTCAAGC (sec. con núm. de ident.: 734)
FUSE-	(sec. con núm. de ident.: 706)	GCTGTTACCCTGGATGAGTCC GGGGGAGGATTGCAGACCCCT GGAGGAGCTCTGTCTTTGGTG TGTAAGGCCTCTGGATTTGATT TTTCCTCTCATGAAATGCAGTG	(sec. con núm. de ident.: 734)

1146		GGTGAGGCAGGCCCCCGGAA AAGGATTGGAGTTTGTGGCTG GGATCGGAAACATGGGATCTT TCACCGTGTATGGGGCAGCAG TGAAGGGCAGGGCTACAATCT CTAGGGACAACGGCCAGAGCA CCGTGAGGTTGCAGCTGAACA ACTTGAGGGCCGAGGACACCG GAACCTATTACTGCGCAAGGG ACTTTTACAACTCCTACGGGTG CTCCGCCTCCTTCATCGACGC TTGGGGACACGGAACCGAGGT GATCGTGAGCTCCGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAAGCCGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCCGAGGTCACA TGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACC	

		ACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAAGGTG GCGGAGGGTCTGGTGGTGGA GGATCCGGGGGAGGAGGTTC AGGAGGCGGGGGATCCCAGG TTCAGCTCCAGGAGTCAGGCG GAGGATCAGTCCAGGCAGGAG GAAGTCTCAGGCTCTCCTGCG CAGCTTCAGGCTACATCTACAA CAACAACTACATGGGCTGGTT CAGGCAGGCCCCCGGAAAAG AAAGAGAGGGAGTGGCAACCA TCTACGTGGGGGGAGGATCTA CCTATTACGCTGATTCCGTCAA GGGCAGGTTCACCATCAGCAG GGACAACACCAAGAACACACT GTACCTGCAGATGAACAGTTT GAAACCCGAGGACACCGCTAT GTATTACTGCGCCGCCGGCCT GGTGAGCAGACCTGATTGGGT TCTGTTGGCCAGGGCATACAC CAACTGGGGCCAGGGAACCCT GGTGACAGTGTCTAGC(sec. con núm. de ident.: 729)	
FUSE-11147	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 728)	(sec. con núm. de ident.: 734)
FUSE-11148	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 729)	(sec. con núm. de ident.: 734)
FUSE-10054	GCTGTTACCCTGGATGAGTCC GGGGGAGGATTGCAGACCCCT GGAGGAGCTCTGTCTTTGGTG TGTAAGGCCTCTGGATTTGATT TTTCCTCTCATGAAATGCAGTG GGTGAGGCAGGCCCCCGGAA AAGGATTGGAGTTTGTGGCTG GGATCGGAAACATGGGATCTT TCACCGTGTATGGGGCAGCAG TGAAGGGCAGGGCTACAATCT CTAGGGACAACGGCCAGAGCA CCGTGAGGTTGCAGCTGAACA ACTTGAGGGCCGAGGACACCG GAACCTATTACTGCGCAAGGG		CAGTCTGCACTCACCCAGCCAT CCTCCGTCTCCGCTAACCCAG GAGAAACCGTCAAAATCACCTG CTCCGGCGGCTCCTACAACTA CGGATGGTTCCAGCAGAAATC CCCCGGCTCCGCACCTGTTAC CGTGATTTACTCCAATAATCAG AGGCCTTCCGACATCCCCTCC AGATTCTCCGGCTCCACCTCC GGTTCCACCTCTACACTGACCA TCACCGGCGTCCAGGCTGACG ATGAGGCTATCTATTACTGCGG CTCCTGGGACGACTCCTCCTA CGTTGGAATCTTCGGCGCTGG

	ACTTTTACAACTCCTACGGGTG CTCCGCCTCCTTCATCGACGC TTGGGGACACGGAACCGAGGT GATCGTGAGCTCCGCTAGCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCCGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 707)		TACCACCCTCACCGTCTTGGGT CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCG GTCACTCTGTTCCCGCCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACA AGGCCACACTGGTGTGTCTCAT AAGTGACTTCTACCCGGGAGC CGTGACAGTGGCCTGGAAGGC AGATAGCAGCCCCGTCAAGGC GGGAGTGGAGACCACCACACC CTCCAAACAAAGCAACAACAAG TACGCGGCCAGCAGCTACCTG AGCCTGACGCCTGAGCAGTGG AAGTCCCACAGGAGCTACAGTT GCCAGGTCACGCATGAAGGGA GCACCGTGGAGAAGACAGTGG CCCCTACAGAATGTTCA (sec. con núm. de ident.: 735)
FUSE-	(sec. con núm. de ident.: 706)	GAGGTTCAGGTGCAGCAGAGC GGACCAGAGTTGGTGAAGCCA GGAACAAGCGTGAAGATTAGTT GCAAGACAAGCGGGTATACATT TACAGAGTACACAATGCACTGG	GACATCCTGATGACCCAGTCC CCCTCCGCTATGTCCGTGTCT CTGGGAGACACCGTGTCCATC ACTTGCCACGCCTCCCAGGGA ATCTCCTCCTACATCGGATGG

1 **1** **2** **4**		GTGAAGCAGAGCCACGGTGAG AGCCTCGAATGGATCGGAGGA ATCGTGCCTAACAACGGAGCCA CCAACTACAACCAGAAATTCAG GGGGAAAGCCACACTGACCGT GGACAAAAGCAGCAGCACCGC CTACATGGAACTGCGCAGCCTG ACCAGCGAGGACTCTGCTGTTT ACTACTGCGCCAGAAGGGGCC TCCTGTGGCATTTTGCCTATTG GGGCCAGGGGACCCTCGTGAC CGTTTCCGCTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCCGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC	CTGCAGCAGAAACCCGGCAAG TCCTTCAAAGGTCTGATTTATC ACGGCACCAACCTCGAAGATG GTGTTCCTTCCCGCTTCTCCG GTTCCGGTTCTGGAGCTGACT ACTCCCTGACTATCTCCTCCCT GGAATCTGAGGACTTCGCCGA TTACTACTGCATCCAGTACGCC CAGTTTCCCTTCACCTTCGGTT CCGGCACCAAGCTGGAAATCA AGCGTACGGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGTTCGCCCGTC ACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGTGGTGGCGGAGGGTC TGGTGGTGGAGGATCCGGGG GAGGAGGTTCAGGAGGCGGG GGAAGTGAGGTTCAGTTGTTG GAGTCCGGGGGCGGATTGGT GCAGCCTGGAGGAAGCCTGA GGTTGAGCTGTACAGCAAGCG GGTACACAAACAGGTTGAAGT GTATGGGGTGGTTCAGGCAGG CACCCGGAAAGGAAAGGGAG GAGATTGCTAGTATCAGCACC GGAACCGGAAATACCTACTAC GCCGACAGTGTGAAGGGCAGA TTCACAATCAGCAGGGACAAG AGCAGGAACACCCTGTATCTG CAGATGAACACACTGAGGGCC GAGGACACCGCAGTGTACTAC TGCGCAGCCGACGTGAGGCC ACATGGAACAACCTGCCACTA CAACTCCAGGGGCCAGGGAAC CCAGGTCACAGTTTCCTCC (sec. con núm. de ident.: 737)

		CGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 730)	
FUSE-11125	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 730)	(sec. con núm. de ident.: 737)
FUSE-11126	GCTGCTGAACCTGTGGAAGATA ATGTGATCAATTTCGTGGCCAT GAAGTTCATTGACAACACCCTG TACTTCATCGCTGAAAACGATG AGAACGGCGGAGGATCTTACTT CGGAAAACTGAAATCCAAGCTG AGCGTGATCAGGAACCTGAAC GATCAGGTGCTGTTCATCGACC AGGGCAATAGGCCCCTGTTCG AGGATATGACAGACTCCGACGT GAGGGACAACGCTCCAAGAAC CATCTTCATCATCTCTCACTACG GCGACTCCCAGCCAAGGGGAA TGGCTGTGACAATCTCCGTGAA GGTGGAGAAGATTTCCACCCTG TCCGTTGAGAACAAGATCATCT CCTTCAAAGAGATGAACCCCCC CGACAACATCAAAGACACCAAA TCCGACATCATCTTCTTCCAGC GCAGCGTGCCTGGGCATGATA ACAAAATGCAGTTCGAAAGCTC CTCCTACGAGGGATACTTCCTC GCCGTCGAAAAGGAAAGGGAC CTGTTCAAGCTGATCCTGAAGA AGGAGGATGAATTGGGGGATA GGAGCATCATGTTCACCGTCCA GAACGAAGACGAGCCTAAATCC TCCGACAAGACACACACCTGCC CCCCCTGCCCCGCACCTGAGG CTGCTGGAGGACCTAGTGTGTT CCTGTTCCCCCCCCAAACCCAAG GACACCCTGATGATTAGCAGAA CCCCCGAGGTGACCTGCGTGG TCGTGGACGTCTCCCACGAAGA CCCCGAAGTGAAATTTAACTGG TACGTGGACGGCGTCGAGGTG CACAACGCAAAGACCAAGCCCA GAGAAGAGCAATATAATAGCAC CTATAGAGTGGTGAGCGTGCTC ACCGTGCTGCACCAGGACTGG CTGAACGGGAAGGAGTATAAGT GCAAGGTGAGCAACAAGGCAC TGCCTGCCCCCATAGAAAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCCAGAGAGCCCCAGGTGTA CACCCTGCCCCCCAGCAGAGA	(sec. con núm. de ident.: 730)	(sec. con núm. de ident.: 737)

	GGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGAGCTGCGCCGTGAA GGGCTTCTACCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC GGCCAGCCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCCGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTC CTGGTGAGCAAGCTGACCGTG GACAAGAGCAGATGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACAGGTTCACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGAGCCCCGGCAAG (sec. con núm. de ident.: 298)		
FUSE-11127	GAGCCTAAATCCTCCGACAAGA CACACACCTGCCCCCCCTGCC CCGCACCTGAGGCTGCTGGAG GACCTAGTGTGTTCCTGTTCCC CCCCAAACCCAAGGACACCCT GATGATTAGCAGAACCCCCGA GGTGACCTGCGTGGTCGTGGA CGTCTCCCACGAAGACCCCGA AGTGAAATTTAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCACAAC GCAAAGACCAAGCCCAGAGAA GAGCAATATAATAGCACCTATA GAGTGGTGAGCGTGCTCACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCA AGGTGAGCAACAAGGCACTGC CTGCCCCCATAGAAAAAACCAT CAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC CAGAGAGCCCCAGGTGTACAC CCTGCCCCCCAGCAGAGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGAG CCTGAGCTGCGCCGTGAAGGG CTTCTACCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAA GACCACCCCCCCCGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCT GGTGAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGAGCAGATGGCAGCAGGG CAACGTGTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAA CAGGTTCACACAGAAGAGCTT GAGCTTGAGCCCCGGCGGTGG TGGCGGATCAGGTGGGGGAG GCTCTGGTGGAGGCGGTAGTA ACTGGGTGAACGTGATCTCCG ACCTGAAAAAGATCGAGGACC TGATCCAGTCCATGCACATCGA CGCCACCCTGTACACCGAGTC CAACGTGCACCCCTCCTGCAA GGTGACCGCCATGAAGTGCTT CCTGCTGGAGCTGCAGAGGAT CTCCCTGATCTCCGGCGACGC	(sec. con núm. de ident.: 730)	(sec. con núm. de ident.: 737)

	CTCCATCCACGACACCGTGCA GAACCTGATCTCCCTGGCCAA CAACTCCCTGTCCTCCAACGG CAACGTGACCGAGTCCGGCTG CAAGGAGTGCGAGGAGCTGGA GGAGAAGAACATCAAGGAGTT CCTGCAGTCCTTCGTGCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCT CC (sec. con núm. de ident.: 719)		
FUSE-1136	(sec. con núm. de ident.: 706)	GAAGTGCAGCTGGTGGAGAGC GGAGGAGGATTGGTGCAGGCA GGAGGAAGCCTGAGGCTGAGT TGTGCCGCTAGTGGAAGGCCA TTTAGTAATTACGCAATGGGGT GGTTTAGGCAGGCTCCTGGCA AGGAGAGGGAGTTCGTGGCTG CTATTTCCTGGAGTGGGGGGA GCACATCCTACGCTGATTCCGT GAAGGGACGGTTTACCATCTC CAGGGACAATGCTAAGAACAC AGTGTACCTGCAGATGAGCAG CCCCAAGCCCGAGGATACCGC TATCTATTATTGCGCCGCCCAG TTTTCCGGCGCCGATTATGGAT TCGGCAGGTTGGGAATCAGGG GATACGAATACGATTACTGGGG CCAGGGAACCCAGGTGACCGT TTCTAGCGGTGGCGGAGGGTC TGGTGGTGGAGGATCCGGGG GAGGAGGTTCAGGAGGCGGG GGAAGTGAAGTGCAGCTGCTG GAGTCCGGTGGAGGATTGGTG CAGCCTGGAGGAAGCCTGAGG CTGTCTTGTACCGCCTCCGGTT ATACAAACAGGCTGAAGTGCAT GGGATGGTTTAGGCAGGCCCC CGGAAAAGAGAGGGAGGAAAT CGCCAGCATTAGTACCGGCAC AGGAAACACCTACTACGCCGA CAGTGTCAAGGGCAGATTCAC AATCTCCCGGGACAAGAGCAG GAACACCCTGTACCTGCAGAT GAGCACACTGAGAGCCGAAGA TACTGCTGTTTACTATTGCGCC GCCGACGTGAGGCCCCACGGT ACAACATGTCACTACAACAGCA GGGGACAGGGCACCCAGGTG ACAGTTTCCAGCGAACCTAAAT CCTCCGACAAGACCCACACCT GCCCCCCTTGCCCCGCTCCTG AAGCTGCTGGAGGCCCTTCAG TGTTTCTGTTTCCTCCCAAGCC CAAGGACACACTGATGATTTCC AGAACCCCCGAGGTGACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGATCCCGAGGTGAAGTTTA ATTGGTACGTGGACGGCGTGG	

		AAGTGCACAACGCCAAGACCA AACCCCGCGAGGAGCAGTATA ATAGCACCTACAGAGTGGTGA GCGTGCTGACCGTGCTGCATC AGGACTGGCTGAACGGCAAGG AATACAAATGCAAGGTGAGCAA CAAGGCCCTGCCTGCCCCTAT CGAGAAGACCATCAGCAAAGC CAAGGGACAGCCAAGAGAACC CCAGGTGTACACCCTGCCCCC CAGCAGAGAAGAAATGACCAA GAACCAGGTGAGCCTGTGGTG CCTGGTGAAAGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCAGA GAACAACTACAAGACAACACCC CCCGTGCTGGACAGCGACGGC TCTTTCTTCCTGTACAGTAAACT GACCGTGGACAAATCAAGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGCTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTATACCCAG AAGAGCCTGTCCCTGAGCCCC GGCAAG (sec. con núm. de ident.: 731)	
FUSE-1137	(sec. con núm. de ident.: 719)	(sec. con núm. de ident.: 731)	
FUSE-1138	(sec. con núm. de ident.: 298)	(sec. con núm. de ident.: 731)	
FUSE-1139	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 731)	

Tabla 3B.1 Secuencias de polinucleótido relacionadas con modalidades que implican proteínas de fusión IL15/IL18

	Polinucleótido 1	Polinucleótido 2	Polinucleótido 3
FUSE-1062	GACGTTCAGCTGCAGGAATCCGGAGGAGGATTGGTGCAGGCAGGA GGATCTTTGACATTGAGCTGCGCCGCCTCCGGAGTTACATATTCCCA CTATTGGTTGGGATGGTTTAGGCAGGCACCCGGAAAAGAGAGGGAG GGAGTTGCAACCATTTACGCCAACGACGGGACCACCTACTACGCTG ATAGTGTGAAGGGAAGGTTCACCGTGTCCTTGGACAATGCCAAGAA CACCTTGTACCTGCAGATGAACAGGCTGACCCCCGAGGATACCGCT ATGTACTACTGCGCCCTCCGGGTTAACGACGGATCTTGGTTTTCCCC CCTGCAGCACTACCACTACAACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTT ACAGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 708)		
FUSE-1063	GACGTTCAGCTGCAGGAATCCGGAGGAGGATCTGTGCAGGCAGGAG GATCTTTGAGGCTGTCCTGCGCTGCATCCGGAAACCCTTACAGCCAC TATTGGTTGGGATGGTTCAGGCAGACACCCGGTAAGGAGAGGGAGG GAGTTGCTGTTATTTACACCGGAGACGGGGATGGAACCACCTACTAT ACCGACAGTGTGAAAGGCAGGTTCACCGTTTCCCAGGATAACGGAAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAATCTGAAGCCCGAGGACACAG CCATGTACTACTGCGCACTCAGGGGCAACGACGGAAGTTGGTTCAGC CCTTTGCAGCCCGGACACTACACATACTGGGGCCAGGGAACACAGG TCACCGTTAGTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 709)		

FUSE-1064	GACGTTCAGCTGCAGGAATCCGGAGGAGGATTGGTGCAGCCAGGAG GATCTTTGAGGCTGTCCTGCGCTGCATCCGGAGTTACAGACTCCAAT GGGTGCATGGGCTGGTTTAGGCAGGCCCCTGGAAAGGAAAGGGAGA GAGTGGCTAGTATTGACAGCGACGGACAGACCCTGTACGCCGACTC CGTGAAAGGAAGGTTCACCATCTCCCAGGACAACACAGAGAACACCC TCTATCTGCAGATGAACACCCTGAAGCCTGAAGACACAGCCACCTAC TATTGCGCCGCCGGAGCTACCTCTCAGCCTGGATTCTCTTGCCGGAT CTTGGGACCCGGATGGTACACATACTGGGGCCAGGGAACCCAGGTG ACAGTTAGTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 710)		
FUSE-1065	GACGTTCAGCTGCAGGAATCCGGAGGAGGATCTGTGCAGGCAGGA GGATCTTTGAGGCTGTCCTGCGCTGTGTCCGGATACCCTTACAGCA GGTACTGGCTGGGATGGTTTAGGCAGGCCCCTGGAAAAGAGAGGG AGGGAGTTGCTACCATTTACACCGACGACGGCGCTACATACTACGC CGATTCTGTCAAGGGCCGGTTCACAGTGTCCCAGGATAACGCTAAG AACACCTTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAAGACACAG CCATGTACGTGTGTGCCCTGAGGGGAAACGACGGAACATGGTTCTC TGTGCTGCAGCCCGGACACTATACCGTGTGGGGACAGGGAACCCA GGTCACCGTGTCCTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 711)		
FUSE-10	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGAAGTGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGAGTTGCGCAGCTAGTGGAGTGACCTACTCCC ACTACTGGTTGGCCTGGTTTAGGCAGGCCCCTGGAAAAGAGAGGGA GGGAGTGGCAACAATTTACACCAATGATGGAACCACATACTACGGG GATTCTGTGAAGGGGAGGTTCACAATTAGCCTGGACAACCCCAAGA ACACACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGACCCCTGAGGACACCGC CATGTACTACTGCGCCCTCAGAGGCAACGACGGCTCATGGTTCTCC CCCTTGCAGCCTTACCACTACAACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGG		

72	TCACAGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC CGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 712)		
FUSE-1073	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGACCTGTTCAGAGCGGA GGAAGCCAGAGGCTGAGCTGTGTGTACTCCGGGGTGACCGACTCCA ACGGATGTATGGGATGGTTCAGGCAGGCCCCTGGAAAAGAGAGGGA GAGGGTGGCTAGTATCGACAGCTACGGACAGACATTGTATGCCGACA GTGTGAAGGGGAGGTTCACAATTAGCCAGGATAACACAGAGAACACA TTGTACCTGCAGATGAACACACTGAAGCCCGAGGACACAGCCACCTA CTACTGCGCTGCCGGAGCTACATCCCAGCCAGGATTCAGCTGCAGG GTGCTCGGACCAGGATGGTACACCTACTGGGGCCAGGGAACCCAGG TGACAGTCAGTATCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCC GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 713)		
FUSE-1074	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGAAGTGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGAGTTGCGCAGCTAGTGGAGTGACCTACTCCC ACTACTGGTTGGGGTGGTTTAGGCAGGCCCCTGGAAAAGAGAGGG AGGGAGTGGCAACAATTTACGCCAATGATGGAACCACATACTACGC CGATTCTGTGAAGGGGCGGTTCACAGTCAGCTTGGATAATGCCAAG AACACACTGTACCTGCAGATGAACAGGCTGACCCCCGAGGACACCG CTATGTACTACTGCGCCCTGAGGGTGAACGACGGGTCTTGGTTCTC CCCCCTGCAGCATTACCACTACAACTACTGGGGCCAGGGCACACAG GTGACCGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT		

	GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 714)		
FUSE-10755	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGAAGTGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGAGTTGCGTGGCTTCCGGTTACTCCTACTCCC ACTACTGGCTGGGATGGTTTAGGCAGGCCCCCGGAAAAGAGAGGG AGGGAATTGCTGTGATTTATACTAACGATGGAACCACATACTACGGG GATTCCGTGAAGGGCAGGTTCACTGTGTCCCAGGACAACGCCAAGA ACACCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGAAGCCCGAGGACACCGC CATGTACTACTGCGCACTCCGCGCTAACGACGGCTCATGGTTCTCC CCTCTGCAGCCAGGATACTACACATACTGGGGCCAGGGCACCCAG GTGACAGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 715)		
FUSE-10766	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGACCTGTTCAGAGCGGA GGAAGCCTGAGGTTGAGCTGCGAGGCTTCCGGTGTGACCGTGACAA ACGGCTGTATGGCCTGGTTCAGGCAGGCCCCTGGAAAAGAGAGGGA GAGGGTGGCTAGTATCGACGAGGACGGCCAGACCCTGTATGCCGAT TCCGTGAAGGGAAGGTTCACCATCTCTCAGGACAACACCGAGAACAC CCTGTATCTCCAGATGAACACACTGAAGCCTGAAGATATGGCTACTTA CTACTGCGCCGCTGGGGCCAGATCCCAGCCTGGATTCTCTTGCCGG ATCTTGGGACCCGGCTGGTACACATATTGGGGCCAGGGAACCCAGG TGACCGTCTCTTCTGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 716)		

FUSE-1077	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGAAGTGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGAGTTGCGCAGTGTCCGCTTACACCTACGGCA GGGGATGTATGGGATGGTTTAGGCAGGCCCCTGGCAAAGAAAGAG AGGGAGTGGCTGGCGTGGACATTGTGGGAACCCCTACCTACGCCG ACTCCATCAAGGGAAGGTTCACCATCAGCAGGGATAACACAAAGAA CATCCTCTACCTGGAGATGAACAGCCTGAAGCCTGAAGATACTGCTA TGTACTACTGCGGCGCCGCCCTGAGGCCTTATGGAGGATCTTGCCT CAGGTTGGGCCACTTCGACAGCTGGGGACAGGGAACACAGGTGAC CGTGAGCTCAGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 717)		
FUSE-1078	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCAGGCGCAGAGCTCGCTAGACCAGGA GCTTCAGTCAAACTCTCCTGCAAGGCCTCCGGCTTCACATTCACCGA CCACTACATCAACTGGGTCAAACAGAGGACCGGCCAGGGCTTGGAG TGGATTGGACAGATTTACCCCGGCGATGGCAACACCTACTACAACG AGAAATTCAAAGGCAAAGCAACCCTGACAGCCGACAAATCCAGCAG CACAGCATACATGCAGTTGAGCTCCCTGACCAGCGAAGATTCTGCT GTGTACTTCTGCGCCCCCAACTACGGCGACTACACCATCGACTTCT GGGGCCAGGGAACCTCCGTGACAGTGTCAAGTGCTAGCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 718)		(sec. con núm. de ident.: 736)
FU	GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGAGGAGGAAGTGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGAGTTGCAGGGCATCCGGATGGGCTACCAAC		

SE-1184	TGTATGGGATGGTTTAGGCAGGCCCCCGGAAAGCAGAGGGAGAGA GTTGCTCTGATTGACAACGACGGGAGGACAATCTACGCAGAGAGCG TGAAGGGGAGGTTTACCATCTCCCAGGAGAACGCAAGGAAGGCACT CTATTTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAAGATACTGCTATGTACT ACTGCGCCGCCGACCTGGATATCTGCTGGGTTGTGAAGGACAGGA GCTTCACATACTGGGGCCAGGGAACCCAGGTCACCGTTTCTTCCGA GCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 723)		
FUSE-1128	GACGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGAGGAGGAAGCGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCGGAGACACCTCCAGG ACCTATCTGATGGCCTGGTTTAGGCAGGCCCCCGGAAAAGAAAGGG AGGGAGTGGCTACAACCAACAAATGGGGCGCCACCACATACGCCG ACTCTGTGAAAGGAAGGTTCACCATCTCCCTGGACAACGCCAAGAA CGCACTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAAGATACTGCT ATGTACTACTGCGCCGCCGGCAGAGATTACTATGCAAACCTGGACC CCGACCCCAGGCTGTACGCTTACTGGGGACAGGGAACCCAGGTGA CAGTGTCTAGCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 720)		
FUSE-1129	GACGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGAGGAGGAAGCGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAAACTGTCCTGCGCTGCTTCCGGATACACCTATTCCTT TTACTGCATGGGATGGTTTAGGCAGGCCCCCGGAACAAGAAAAGAG AGGGAGGGAGTGGCCGTCATTGACGCTGATGGAAGGACCACCTAC GCCGATAGCGCAAAGGGAAGGTTTACCGTGAGCCAGGACGAGGCT AAAGAGCACCTCTACCTGCAGATGAATAACCTGAAGCCTGAAGATAC AGCAATGTACTACTGCGCCGCCTACGATTGTTACAGTGGAAGTAAGT GGGGCGACTCCGACTCCTTTGGAGCTTGGGGACAGGGAACCCAGG TGACCGTGTCCTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC		

	CCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 721)		
FUSE-1130	GACGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGAGGAGGAAGCGTGCAGGCTGGA GGAAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCTTCCAGGGCTACCGCTTATAT GGGATGGTTTAGGCAGGCCCCAGGGAAGGAAAGAGAGGGAGTGGC TTGCATCGACTCCTTTGGATCTACCAGCTTCGCCGACTCCGTGAAGG GAAGATTCACAATCTCACAGGACAGGACAAAAAACACCGTGGTGCTG CAGATGAACTCCCTGAAGCCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGC CGCCAGGATCTCCGGCGAGAACGGCTACATCGGCTACTGCGCCTCC GGCGCCGTGGGCCCCTCCGACTACGTGAGGTGGGGCCAGGGCACC CAGGTGACCGTGTCCTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 722)		

GATATCGTGATGTCCCAGTCCCCCTCCTCCCTGGCTGTTTCTGTTGGAGAGAAAGTGA

CCATGTCCTGCAAGAGCTCCCAGTCCCTGCTGTACAGCTCAAACCAGAAGAACTACC

TGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCCAGTCCCCCAAATTGTTGATTTACTGGGCCA

GTACCCGGGAGAGCGGAGTTCCTGATCGCTTCACCGGCTCCGGATCAGGAACCGAT

TTCACTCTGACTATCTCCTCAGTGAAGGCTGAGGACCTCGCCGTGTACTACTGCCAG

CAGTACTACAGATATCACACATTTGGCACCGGCACCAAACTGGAGCTGAAGCGTACG

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA

CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG

GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG

ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT

ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCG

TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (sec. con núm. de ident.: 736)

Secuencias que codifican las proteínas de fusión en la Figura 12A y la Figura 12B

FUSE-739	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCACACTCTCCTG CGTCATCAGCGGCGACACAACCTCCACAGTCTACATGGGCTGGTTCAGGCAGGCACCCGGAGAAG AAAGGGAGGGAATTGCTTCCATTTACGGAGCTGACGACTCCCCCTACTACGCCGATTCCGTGAAGG GACGATTCACCATCTTTCAGGACAACGCCAAGAGAACAGTTGTCTTGCAGATGAACAGTCTGAAGCC CGAGGACACCGGCACCTACTACTGCGCTGCTACCACCATTCATTTTGTCGTGGGCGGGCCCTGGCT CTTGGCTGCTCCTAACTACAAGTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACCGTTTCTTCCGAGCCCAA ATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 738)
FUSE-740	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCACAACAGGCGGCAGTCTCAGGCTCTCCTG CGTTGCTTCAAGGGACCCATACTACATGGCATGGTTCAGGCAGGCACCCGGCAAAGAGAGAGAAG GCGTGGCTGCTATCCACAGTGGGAGAACATATTATGCCGAATCAGTGAAGTCCAGGTTTACCATCTC CCGCGACAACGCCAAAAACACCGCCTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGGCCCGAGGACACCGCCA TGTACTACTGCGCCGCCGACCTGAGGTACGACGGCTCCTGGTCCGCCACCAAGGACTACCACTACT GGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 739)
FUSE-	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCTACACATACTCCTGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCCCCTGGAAAGGAAAGGG AGGCTGTGGCAACAATTAACACTGAGTCCGGCACCACATACTACTTGGACTCCGTTAAAGGCAGATT CACCATCTCCAAGGACAACACCAAGAACACACTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCCGAGGA CACAGCCATGTACTACTGCGCCGCCCTCGACGGATACTGCGGAACAGCTGCATACGTGAGGCCCG

741	TGAGCTACCGATACTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACCGTGTCATCCGAGCCCAAATCTGCTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 740)
FUSE-742	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAAGGGACACATACTACAGGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCCGGAAAAGAGAGAGAAG GCGTGGCTGCTATCTACCTCGGGGACACATACTATGCCGACAGCGTGAAGGGGAGATTCACCATCA GCCAGGACAGCGCAAAGAACACCGTGTTCTTGGAGATGAACAGCTTGAAGGTGGAGGATACCGCC ATGTACTATTGCGCCGCCGACAAGAAGTACGGCAGCAAGTGGTACACAAACGACTACCACTACTGG GGGCAGGGCACCCAGGTTACAGTGAGTTCCGAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA (sec. con núm. de ident.: 741)
FUSE-743	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGAAAGCGTCCAGGCAGGAGGATCACTCAGGCTCTCCTG CGCAGCATCAGGCTACATCAACGGCGGCAACTACATGGGCTGGTTTAGGCAGGCTCCTGGCAAAG AAAGGGAGGGAGTGGCCGCAATCTACATCCACGGACGCTCTACCTACTACGCCGACAGTGTCAAAG GCAGGTTCACAATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACATGGTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGC CCGAAGATACTGCTATGTACTACTGCGCCACCGGCCTGGTTTCCAGGCCTGATTGGGTCCTCCTGG CCAGAGGATACAACGCCTGGGGACAGGGAACCCTGGTGACTGTTTCCTCCGAGCCCAAATCTGCTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 742)
FUSE-744	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCTACATCAGGGGCAAAATGTGCGTGGGCTGGTTCAGGCAGACACCCGGAAAAG AGAGGGAGGTGGTGGGGACAGTGTACACCGGAAGCGGAGCTATCTCCTACGGTGATAGTGTGGAG GGCAGGTTCACAATCTCCCAGGATAATGCCAGGAACACACTGTACTTGCAGATGAACTCCCTGAGT CCTGAGGATACCGCCATGTACTACTGTGCCGCCACCAGGTCCGTGGTGTTGAACAGTGCCGGCGT GTGCGTTACCGTGCCTGGATGGTACAACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTTTCTTCCGA GCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC

	AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 743)
FUSE-7455	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCACAATCTACTCCTACTACTGCATGGGCTGGTTCAGGCAGTCACCCGGAAAAGA AAGGGAGGGGGTGGCAGGTATCGACTCCTACGGAAACATTCGGTACTCTGACTCCGCAAAGGGAC GCTTCACCATCTCCAAGGACAACACCAACAACATCCTCTACCTCCAGATGAACAGCCTGGAGCCTGA AGATACTGCTATGTACTACTGCGCCGCCGAACCCAGAAGGTGTGCATACCTCAACGTGGACGACAG AATTTTGCCCGCCCTGTTCTACGACTCCTGGGGACAGGGAACCCAGGTCACAGTGTCCTCCGAGCC CAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 744)
FUSE-7466	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCTACACAAACTCCATCAACTACATGGCCTGGTTCAGACAGGCCCCCGGAAAAGA AAGGGAAGGCGTGGCAAGGATTTACACCAGGGACGGGTCTGCAGAATACTTGGCCGATTCCGTTGT CGGCCGGTTCACCATCTCCCAGGTTAATGTGAAAAACACCGTGTTCCTGGAGATGACCTCCCTGAA GCCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCGCCGCCGCCGGCGCCTCCGCCTACGGCGTGCTG AACAAGGACCACTACAACTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTGTCCTCCGAGCCCAAATCT GCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 745)
FUSE-7477	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGGATCAGGCTACACATACTCCTCCTACAGCATGGGTTGGTTCAGGCAGGACCCCGGAAAAGA GAGGGAGGGAGTGGCTGCTATGAACGCCAGGGGAGACAACCCATATTACGCCGACAGTGTCAAAG GCAGGTTCACCATCTCCAGGGACAATGCTAAGAAAACTTTATATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCC CGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCTGCCGCTAGGGCTGAACCAAGCACAGTGGTCGTGAGCG CCAAGGGATACAATTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACCGTTTCTTCTGAGCCCAAATCTGCTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG

	CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 746)
FUSE-748	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCTACATCTACAACAACAACTACATGGGCTGGTTCAGGCAGGCCCCCGGAAAAGA AAGAGAGGGAGTGGCAACCATCTACGTGGGGGGAGGATCTACCTATTACGCTGATTCCGTCAAGGG CAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACACCAAGAACACACTGTACCTGCAGATGAACAGTTTGAAACC CGAGGACACCGCTATGTATTACTGCGCCGCCGGCCTGGTGAGCAGACCTGATTGGGTTCTGTTGGC CAGGGCATACACCAACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACAGTGTCTAGCGAGCCCAAATCTGCTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 747)
FUSE-749	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAACATCCGGCTACCCATACATCGGCCCCTGCATGACCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAAGA GAGGGAGTGGGTGGCTTTCATTTACAAGGACGACGGGGCCACCTACTACAGTGACTCCGTTAACGG CCGCTTCACAATTTCCACCGACAACGCCAACAACGCATTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCC CGAGGACACCGCAGTGTATTATTGTGCCGCCTCCCCCCCCTCCCCTAGAACAACATGTTACACCGG CGCCTCCTACTACAACTACTGGGGGCAGGGCACCCAGGTCACAGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGC TGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 748)
FUSE-750	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAGCTTCAGGCTACATCGGCGGAAAAATGTGCGTGGGCTGGTTCAGGCAGACCCCCGGCAAGG AGAGGGAGGTGGTGGGCACCGTGTACACCGGCTCCGGCGCCATCTCCTACGGCGACTCCGTGGA GGGCAGGTTCACCATCTCCCAGGACAACGCCAGGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGTC CCCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGCCGCCACCAGGTCCGTGGTGCTGAACTCCGCCGGCG TGTGCGTGACCGTGCCCGGCTGGTACAACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC GAGCCCAAATCTGCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 749)
FU	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAACCTCTCCTG CACAGCATCAGGCTACACAATCGGCAGCTTCAGCATGGCTTGGTTCAGGCAGGCCCCCGGAAAAGA

SE-751	GAGGGAGGGAGTTGCTTACATCAACACCGGCGGAGTGCCCTACTACCTCGACTCAGTGAAGGGAA GGGCCACCATCAGCAGGGACAACGCTGCTGACACCCTCTATCTGCACATGAACTCCTTGAAGCCCG AGGACACCGCCCTGTATTACTGCGCTGCCCGACCTGGACTCGGCGAATCTGCTTGGTACATCGACG CCAGGGCCTACAATTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTTTCTTCCGAGCCCAAATCTGCTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 750)
FUSE-752	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CGCAACATCCGAGAGGACATACACACAGAACTGGATGGGCTGGTTCAGGCAGAGCCCCGGAAAAG AGAGGGAGGGTGTGGCTGTGATTAACACCGGAAGCGGGCTGACCGCCTACGTTGATTCCGTGAAG GGAAGGTTTACAATTTCCAAGGACAACACCAAGAGCACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCTTGAAG CCCGACGACACCGCCATGTACTATTGCGCCGCCGAGGTGCAGGGCGGAGTTTTGATTGCCACCGG CTACAGATATTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGTCTAGTGAGCCCAAATCTGCTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 751)
FUSE-753	CAGGTTCAGCTCCAGGAGTCAGGCGGAGGATCAGTCCAGGCAGGAGGAAGTCTCAGGCTCTCCTG CACAACATCCAGGTTCAAAATCAACGACGGCTCCGTCGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGAAAAGA GAGGGAGGGGGTGGCTTCCATCTACGCTGATGGAGGAGGCATCAGCTATGCCGACTCCGTGAAGG GCAGGTTCACCATTTCTCAGGATAACTCCGCCAACACCGTGTACCTGCAGATGAACAGCTTGAAGC CCGAAGATACTGCTATGTATTACTGCGCCGCCCTGGCCTTGCGCAGATATGGACCTCTGGACCCCA GGGAGTTCAGGTTTTGGGGCCAGGGAACCCAGGTGACCGTGTCTAGTGAGCCCAAATCTGCTGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 752)
4D6	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCT CTGGAGACACCTACAATTTGAACCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCGCGAG GGCGTCGCAGGTACTGGAATTAATGATATTACAGCATACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACG GTCTCCAATGACCACGCCAAGAAAAGTCTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACTG CCATGTACTACTGTGCGGCCCGATCCGTGTATCTTACAGCTCCATCTCTCCGGCCGGAGTCTTATAA CTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 753)

4C9	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATACATCTACGGTAACAACTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAG GGGCTCGCAACTATTTATATTAATGGTGCTAGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCCGAGACAACACCAAGAATACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAC TGCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTCTCGTCTCACGCCCAGATTGGGTCCTCTTGGCGCGGGCATA TAACAACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 754)
3H8	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCT CTGGATACATTAACAGTAATAACTACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGG GGGTCGCAGTTAAATATATTCATGGGCCTAGTACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTTAT CATCTCCCAAGACAACGCCAAGAATATGGTGTATCTGCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACACT GCCATGTACTACTGTGCGGCAGGTCTCGTCTCCCGGCCGGATTGGGTGCTCTTGGCGCGGGGATA TAACAACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 755)
3F8	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGATGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCT CTGGAAACACCTACAATTTGAACCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAAGAGCGCGAG GGCGTCGCAGGTACTGGAATTAATGATATTACAGGGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACG GTCTCCGTAGACAGCGCCGAGAAAACGCTGTATCTACAAATGAACTTGCTGAAACCTGAGGACACT GCCATGTACTACTGTGCGGCCCGATCCGTGCGGCTTACAGCTCCATCTCTCCGGCCGGAGTCTTAT ACGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 756)
5E10	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCT CTGGAAACACCTACAATTTGAACCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCGCGAG GGCGTCGCAGGTACTGGAATTAATGATATTACAGCGTACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACG GTCTCCAGTGACCACGCCACGAAAACTCTGCATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACT GGGATGTACTACTGTGCGGCCCGATCCGTGTATCTTACAGCCCCATCTCTCCGGCCGGAGTCTTAT AACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 757)
5E7	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCT CTGGATACACCTACAATTTGAACCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGAGCGCGAG GGCGTCGCAAGTACTGGAATTAATGATATTACAGAATACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACG GTCTCCACAGACGCCGTCAAGAACACTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGACGACACT GCCATGTACTACTGTGCGGCCCGATCCGTGAGGCAGACAGTCCCGTCTCTCCGGCCGGAGTCTTAT ACGTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 758)
5B9	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGTCT CTGGAAACACCTACAATTTGAACCGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGAAAAGAGCGCGAG GGCGTCGCAGGTACTGGAATTAATGATATTACAGGGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACG GTCTCCGTAGACAGCGCCGAGAAAAAGCTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACT GCCATGTACTACTGTGCGGCCCGATCCGTGCGGCTTACAGCTCCATCTCTCCGGCCGGAGTCTTAT ACGTACTGGGGCCAGGGCACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 759)
2C8	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAACCT CTAGATTCAAGATCAATGACGGCTCAGTGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGAGCGCGAG GGGGTCGCATCTGTTTATGCTGATGGTGGTGGTATATCCTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCCAAGACAACTCCGCGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGAC ACTGCCATGTACTACTGTGCGGCGCTAGCTTTGCGCCGGTATGGGCCCTTGGACCCCAGGGAATTT AGGTTCTGGGGCCAGGGGATCCTGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 760)
3A6	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCAA CTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT GGATACATCGGCGGAAAAATGTGCGTGGGTTGGTTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGTT GTCGGAACAGTTTACACTGGTAGTGGTGCAATATCGTATGGCGACTCCGTGGAGGGCCGATTCACCA

	TCTCCCAAGACAACGCCAGGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGCCCTGAGGACACCGC CATGTACTACTGTGCGGCTACCCGGAGCGTGGTTCTGAACAGTGCTGGTGTCTGCGTCACAGTCCCC GGTTGGTATAACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 761)
1B8	ATGGGGTCTACCGCCATCCTTGGCCTCCTGCTCGCTGTCCTGCAGGGAGGGCGCGCCCAGGTCCA ACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGCCTGGAGGGTCTCTGACACTCTCCTGTAGAGCCT CAGAATACAGTATGAGCTTCATAGGGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGAAGGTC GCAACTATTTATACTCGTAGTGGTCGCACATACTATGCCGACTCCGTGCGGGGCCGATTCACCATCT CCCAAGACAACGCCAAGAACACGGCGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCA TGTACTACTGTGCGGCAGGGTCCTACGGAGGTCCCTGGTCCGCTCTAGACTCACGTCACTTCAACT ACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (sec. con núm. de ident.: 762)

Tabla 4. Rendimiento de expresión de las proteínas

	Rendimiento		**Rendimiento**		**Rendimiento**		
FUSE-320	291 mg/l	**FUSE-1145**	232 mg/l	**FUSE-750**	451 mg/l	**FUSE-1109**	76 ml/l
FUSE-691	207 ml/l	**FUSE-1146**	328 mg/l	**FUSE-751**	469 mg/l	**FUSE-1124**	45 mg/l
FUSE-694	67 ml/l	**FUSE-1147**	232 mg/l	**FUSE-752**	351 mg/l	**FUSE-1125**	229 mg/l
FUSE-696	59 mg/l	**FUSE-1148**	286 mg/l	**FUSE-753**	553 mg/l	**FUSE-1126**	83 mg/l
FUSE-697	61 mg/l	**FUSE-599**	108 mg/l	**FUSE-1054**	407 mg/l	**FUSE-1127**	66 mg/l
FUSE-765	197 ml/l	**FUSE-739**	134 mg/l	**FUSE-1062**	67 ml/l	**FUSE-1128**	53 mg/l
FUSE-773	99 ml/l	**FUSE-740**	373 mg/l	**FUSE-1063**	57 ml/l	**FUSE-1129**	379 mg/l
FUSE-774	131 mg/l	**FUSE-741**	438 mg/l	**FUSE-1064**	516 mg/l	**FUSE-1130**	379 mg/l
FUSE-916	206 ml/l	**FUSE-742**	330 mg/l	**FUSE-1065**	37 mg/l	**FUSE-1136**	149 ml/l
FUSE-923	429 mg/l	**FUSE-743**	440 mg/l	**FUSE-1072**	136 ml/l	**FUSE-1137**	171 mg/l
FUSE-926	113 mg/l	**FUSE-744**	231 mg/l	**FUSE-1073**	503 mg/l	**FUSE-1138**	176 mg/l
FUSE-943	185 mg/l	**FUSE-745**	92 mg/L	**FUSE-1074**	155 ml/l	**FUSE-1139**	177 mg/l
FUSE-944	205 ml/l	**FUSE-746**	273 mg/l	**FUSE-1075**	144 ml/l	**FUSE-1177**	133 ml/l
FUSE-966	232 mg/l	**FUSE-747**	329 mg/l	**FUSE-1076**	453 mg/l	**FUSE-1179**	103 ml/l
FUSE-967	196 mg/l	**FUSE-748**	495 mg/l	**FUSE-1077**	612 mg/l	**FUSE-1184**	551 mg/L
FUSE-968	198 ml/l	**FUSE-749**	281 mg/l	**FUSE-1078**	330 mg/l	**FUSE-1229**	205 ml/l

Detalles y modalidades de IL-18

El contenido de la solicitud internacional núm. PCT/US2023/071663, presentada el 4 de agosto de 2023, titulada “Proteínas de fusión IL-18 y métodos de producción de IL-18”, y la solicitud internacional núm. PCT/US2024/027248, presentado el 1 de mayo de 2024, titulado “Métodos de uso de proteínas de fusión IL-18” se incorporan en la presente como referencia en su totalidad, como si estuviesen completamente establecidas

En la presente se describen variantes de IL-18 que pueden usarse en las proteínas de fusión de múltiples citocinas de la invención. En la presente también se describen proteínas de fusión IL-18 que comprenden variantes de IL-18 que pueden usarse en los métodos relacionados con la administración de proteínas de fusión separadas.

Diversas modalidades proporcionan una o más proteínas de fusión, cada una de las cuales comprende (i) una IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18 o un fragmento de la variante de IL-18, y (ii) una primera proteína capaz de translocarse en un retículo endoplasmático (RE) que incluye una proteína citosólica o nuclear diseñada genéticamente para translocarse en un retículo endoplasmático (RE) mediante la adición de un péptido señal/secuencia líder en el extremo N de tal proteína diseñada genéticamente, o un fragmento de dichas proteínas. Preferentemente, la proteína capaz de translocarse en un ER tiene una secuencia de aminoácidos que inicia el transporte de una proteína (p. ej., la IL-18 o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) a través de la membrana del retículo endoplásmico. En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un enlazador de aminoácidos. Por ejemplo, el enlazador de aminoácidos puede estar entre (a) la proteína capaz de translocarse en un retículo endoplásmico (ER) y (b) el propéptido (o variante) o IL-18 (o variante).

En algunas modalidades, la una o más proteínas de fusión no comprenden un propéptido IL-18 o su variante. También puede usarse indistintamente un “propéptido IL-18”, o “propéptido” o “PP” en esta invención, que describe una secuencia de aminoácidos unida a la IL-18 o variante de IL-18 en un precursor de IL-18 o un precursor variante de IL-18, y que después de la eliminación da una IL-18 madura o su fragmento, variante de IL-18 madura o su fragmento de esta. Por ejemplo, un propéptido IL-18 puede tener una secuencia de residuos de aminoácidos 1-36 de Uniprot ID Q14116.

En algunas modalidades, la una o más proteínas de fusión también incluyen un propéptido (PP) o su variante. En la presente se proporcionan ejemplos de variantes de propéptidos, que incluyen los de la Tabla 6B. Esto puede inactivar la IL-18 o variante de IL-18, y así un propéptido se une directa o indirectamente a la IL-18 o variante de IL-18 formando un precursor de IL-18 o un precursor variante de IL-18. Preferentemente, el PP o su variante está en el extremo N-terminal en relación con la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) en la proteína de fusión. En algunas modalidades, la una o más proteínas de fusión también incluyen un sitio de escisión, que se basa preferentemente en un sustrato peptídico sensible a la escisión enzimática/proteasa. El sitio de escisión puede colocarse dentro del PP, entre el PP o su variante (si está presente) y la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante); o puede colocarse entre la proteína capaz de translocarse en un ER y el PP (si está presente); o puede colocarse entre la proteína capaz de translocarse en un ER y la IL-18 o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante, especialmente en ausencia de un PP. En algunas modalidades, cuando PP está presente, el sitio de escisión se coloca dentro del PP. En modalidades adicionales, las una o más proteínas de fusión incluyen (i) una IL-18, un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, (ii), un propéptido (PP) o su variante, que inactiva IL-18, y un sitio de escisión.

Los ejemplos de variantes de propéptido incluyen un polipéptido que tiene AAEPVEDNX_1INFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN, en donde X_1 es cualquier aminoácido excepto cisteína (sec. con núm. de ident.: 238). En diversas modalidades, X_1 es alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano (sec. con núm. de ident.: 239). En diversas modalidades, X_1 es valina (sec. con núm. de ident.: 78). En diversas modalidades, X1 es serina, treonina, asparagina o glutamina (sec. con núm. de ident.: 240). En diversas modalidades, X_1 es serina (sec. con núm. de ident.: 76).

En diversas modalidades, la proteína de fusión no comprende un polipéptido que consiste en la secuencia X_1-X_2-X_3-X_4 entre (i) el propéptido o variante de propéptido, y (ii) la IL-18 madura o variante de IL-18 madura, en donde X_1 es L o está ausente, X_2 es E o está ausente, X_3 es S o está ausente, y X_4 es D o está ausente.

En diversos aspectos de las proteínas de fusión, la IL-18 (o su fragmento, variante, o fragmento de su variante) se une mediante un enlace polipeptídico a la primera proteína capaz de translocarse en el ER. Las proteínas de fusión pueden tener una variedad de configuraciones. Preferentemente, la N-terminal de la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) se une mediante un enlace polipeptídico directa o indirectamente a la C-terminal de la primera proteína capaz de translocarse en el ER.

Aun en otras modalidades, la C-terminal de la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) se une mediante un enlace polipeptídico directa o indirectamente a la N-terminal de la primera proteína capaz de translocarse en el ER. Como ejemplo no limitante, la variante de IL-18 (o IL-18, un fragmento de IL-18, un fragmento de la variante de IL-18) se fusiona al N-terminal de un botón de una proteína IgG1 heterodimérica de tipo botón en ojal con o sin un propéptido (pp).

En modalidades adicionales, donde la C-terminal de la IL-18 está unida a la N-terminal de la primera proteína capaz de translocarse en (o a través de) el ER, una segunda proteína capaz de translocarse a través del ER a menudo fusionado al N-terminal de la IL-18 para mediar el enmascaramiento. Se contempla que una proteína de fusión comprende además (iii) una segunda proteína capaz de translocarse en/a través de un ER, o un “supercóntigo” tal como proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) que pueden no translocarse a través del ER. En algunas modalidades, si la HSP (proteína nuclear) o una proteína citosólica se fusiona a la N-terminal de la IL-18 para mediar el enmascaramiento, a menudo requiere un

péptido señal fusionado a la N-terminal del "supercóntigo" para mediar el transporte al ER; y, si el supercóntigo se fusiona a la C-terminal de IL-18 para servir para estabilizar el complejo, entonces una segunda proteína capaz de translocarse a través del ER a menudo se fusiona al N-terminal de la IL-18 para mediar el enmascaramiento. Por lo tanto, en algunas modalidades, la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está en la C-terminal de la proteína de fusión; en algunas modalidades, la N-terminal de la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está en el extremo C-terminal en relación con la primera proteína capaz de translocarse en el ER, y la C-terminal de la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está en el extremo N-terminal en relación con la segunda proteína capaz de translocarse en el ER. La "primera" o "segunda" proteína capaz de translocarse en un ER se utiliza como referencia relativa. En las Tablas 1 y 4 se muestran una o más secuencias de aminoácidos ilustrativas de cada componente de la proteína de fusión.

Algunas modalidades proporcionan que la primera proteína/polipéptido capaz de translocarse en un ER comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, o una combinación de estos. En algunas modalidades, en donde la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 y un dominio CH3. En algunas modalidades, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina carece al menos de un dominio CH1. En algunas modalidades, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina presente en la misma especie que la

IL-18. En otras modalidades, la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina presente en la misma especie que un organismo con el cual se transforma o transfecta una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión o un precursor de la proteína de fusión. Otras modalidades proporcionan que la proteína de fusión carece de un dominio variable de inmunoglobulina (V_H).

En diversas modalidades, la IL-18 (o su fragmento, variante o fragmento de su variante) es idéntica (en secuencia) a la de un origen humano, y la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una región bisagra, y un dominio CH2 o un dominio CH3, y con mayor preferencia comprende una región bisagra y ambos dominios CH2 y un dominio CH3.

Con mayor preferencia, la IL-18 (o su fragmento, variante, o fragmento de su variante) es al menos 95 %, 90 %, u 85 % idéntica (en secuencia) a la de un origen humano, pero con sustituciones de aminoácidos u otras modificaciones que reducen la afinidad de la IL-18 (o su fragmento, variante, o fragmento de su variante) por IL-18BP. Se contempla que las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina adecuadas para la invención puedan derivarse de inmunoglobulinas pertenecientes a cualquiera de las cinco clases de inmunoglobulina referidas en la técnica como IgA (Igα), IgD (Igδ), IgE (Igε), IgG (Igγ), e IgM (Igμ). Sin embargo, se prefieren las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina de la clase IgG. Además, las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina pueden derivarse de cualquiera de las subclases de anticuerpos IgG referidas en la técnica como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los dominios de región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen homología cruzada entre las clases de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio CH2 de IgG es homologo al dominio CH2 de IgA e IgD, y al dominio CH3 de IgM e IgE. Las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina preferidas incluyen dominios proteicos

correspondientes a una región CH2 y una región CH3 de IgG, o porciones funcionales o derivadas de estas. La descripción adicional de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina se analiza en detalle en la patente de los EE. UU. núm. 5.541.087, y la patente de los EE. UU. núm. 5.726.044, las cuales se incorporan en la presente como referencia.

En múltiples modalidades, la proteína/polipéptido a fusionar con la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) es un dímero de dos cadenas/regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina, opcionalmente reticuladas por un par de enlaces disulfuro entre cisteínas en regiones bisagra adyacentes. En algunas modalidades, una región bisagra puede tener un dominio bisagra superior, un dominio bisagra central y un dominio bisagra inferior. En algunas modalidades, una porción superior del dominio bisagra puede incluir o eliminar la cisteína que se sabe que forma un enlace disulfuro con la cadena ligera o un fab, dando como resultado secuencias tales como EPKSC (sec. con núm. de ident.: 241) o EPKSS (sec. con núm. de ident.: 242) o EPKSA (sec. con núm. de ident.: 243). Por ejemplo, las proteínas de fusión que incluyen la proteína que se transloca al ER basada en IgG1, excepto FUSE-501, FUSE-503 y FUSE-509, pueden haber eliminado cisteína de la región bisagra, p. ej., EPKSS (sec. con núm. de ident.: 242) en la proteína que se transloca al ER basada en IgG1, excepto FUSE-507 (FUSE-507 tiene EPKSA (sec. con núm. de ident.: 243) en la región bisagra). Una región bisagra también puede contener un dominio bisagra central, tal como que comprende una secuencia CPPCP (sec. con núm. de ident.: 244) o una variante en la que se reemplaza la cisteína. Una región bisagra puede incluir además un dominio bisagra inferior, tal como que comprende una secuencia APELLGGP (sec. con núm. de ident.: 245) o APEAAGGP (sec. con núm. de ident.: 246). En otro ejemplo, FUSE-509 tiene una proteína que se transloca al ER basada en IgG4, usando una región bisagra como se ilustra en Chiu et al., *Antibodies* 2019, *8*(4), 55, 2019. Aunque se prefieren constructos que incluyen regiones bisagra de inmunoglobulina,

como se ilustran en las figuras, la invención contempla que la reticulación en otras posiciones puede elegirse según se desee. Además, en algunos casos, dos o más monómeros pueden asociarse de manera no covalente para producir dímeros o multímeros. En diversos aspectos en donde la proteína/polipéptido es un dímero de dos regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas, la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está ligada a una, y solo una, de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas. En el caso de una IgG-Fc silvestre que forma un homodímero, en diversos casos, se coloca una IL-18 en la C-terminal de cada monómero de la Fc, teniendo de esta manera dos IL-18 colocadas en la C-terminal de la Fc. En algunos casos, se puede formar un heterodímero (p. ej., en la etapa de purificación) cuando una Fc silvestre fusionada a una IL-18 se mezcla con otra Fc silvestre no fusionada a IL-18. En otros aspectos, una IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está ligada cada una de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas en la proteína de fusión.

En algunas modalidades, dos brazos (o cadenas) de regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden heterodimerizarse creando mutaciones de “botones en ojales” (KiH) en el dominio CH3. Esta característica estructural en los brazos polipeptídicos permite la unión de dos semianticuerpos (p. ej., heterodímero Fc; y dominios VH–CH y VL–CL). Por ejemplo, un heteromultímero (que incluye un heterodímero) puede comprender un primer polipéptido y un segundo polipéptido que comprende cada uno un dominio CH3, en donde los polipéptidos se encuentran en una interfaz diseñada genéticamente dentro del dominio CH3, y el primer polipéptido contiene una protuberancia diseñada (“botón”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo original, y el segundo polipéptido contiene una cavidad (“ojal”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto

sustituido por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo original. En algunas modalidades, la interfaz diseñada genéticamente de un heteromultímero incluye al menos dos pares mutantes de protuberancia dentro de la cavidad. Los volúmenes y áreas superficiales accesibles de cada aminoácido se describen en *A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol*. 24: 107-123, 1972 y C. Chothia, *J. Mol. Biol*. 105: 1-14, 1975. Por ejemplo, los residuos de importación para la formación de una protuberancia pueden ser arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W); y preferentemente el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un pequeño volumen de cadena lateral, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Como otro ejemplo, los residuos de importación para la formación de una cavidad pueden ser alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V); y preferentemente el residuo original para la formación de la cavidad tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Por ejemplo, una mutación T366W en el dominio CH3 para la cadena de "botón" /protuberancia, y una mutación T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 para la cadena "ojal" /cavidad. Adicionalmente, la configuración KiH puede combinarse con mutaciones adicionales para permitir el enlace disulfuro S-S entre las dos cadenas. En diversos aspectos en donde la proteína/polipéptido es un heterodímero de una configuración KiH, la IL-18 (o su fragmento, variante, o un fragmento de su variante) está ligada a una, y solo una, de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas (es decir, botón u ojal).

En algunas modalidades, los dos o más brazos (o cadenas) de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden contener otro diseño de complementariedad estérica simétrica a asimétrica (p. ej., HA-TF, ZW1), una interacción de intercambio de carga a carga (DD-KK), un intercambio de complementariedad carga-estérico más una interacción electrostática adicional de largo alcance (p. ej., EW-RVT), o

un diseño de intercambio de cadena de isotipo (p. ej., dominio de diseño genético de intercambio de cadena (SEED, por sus siglas en inglés)), o Xmab, 7.8.60, dirección electrostática, A107 o Duobody, para formar heterodímeros/heteromultímeros. Se observa una descripción adicional de estas configuraciones y mutaciones/residuos ilustrativos en *Front Immunol.* 2016; 7: 394.

En modalidades adicionales, las proteínas adecuadas capaces de translocarse en el ER o un fragmento de este de la proteína de fusión son una proteína globular, proteína inmunoglobular, o un fragmento de estas. En diversas modalidades, las proteínas adecuadas capaces de translocarse en el ER o un fragmento de este de la proteína de fusión son un polipéptido corto o proteína diseñada genéticamente con un péptido señal para translocarse en el ER. En algunas modalidades, las proteínas adecuadas capaces de translocarse en el ER o un fragmento de este de la proteína de fusión son un polipéptido corto o proteína que es aproximadamente 2 kDa o no mayor que 250 kDa. Como ejemplos, el polipéptido corto o proteína es aproximadamente 2-5 kDa, aproximadamente 6-10 kDa, aproximadamente 11-20 kDa, aproximadamente 21-30 kDa, aproximadamente 31-40 kDa, aproximadamente 41-50 kDa, aproximadamente 51-75 kDa, aproximadamente 76-100 kDa, aproximadamente 101-125 kDa, aproximadamente 126-150 kDa, aproximadamente 151-175 kDa, aproximadamente 176-200 kDa, aproximadamente 201-225 kDa, o aproximadamente 256-250 kDa. Como ejemplos adicionales, el polipéptido corto tiene 2, 3 o 4 aminoácidos, o enlazadores flexibles o cadena de aminoácidos de 2-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30 aminoácidos. Como ejemplos adicionales, el polipéptido corto tiene 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o enlazadores flexibles o cadena de aminoácidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos. Los ejemplos adicionales de estos polipéptidos cortos incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos, un 4-mero de cuatro aminoácidos, un 5-mero de cinco aminoácidos, o un péptido seleccionado del grupo que

consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), y (GGGGX$_\lambda$ (sec. con núm. de ident.: 236))n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud. Ejemplos adicionales incluyen (X$_\lambda$GGGG (sec. con núm. de ident.: 317))$_n$ en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX$_\lambda$GGG (sec. con núm. de ident.: 318))$_n$ en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX$_\lambda$GG (sec. con núm. de ident.: 319))$_n$ en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX$_\lambda$G (sec. con núm. de ident.: 320))$_n$ en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X$_\lambda$GGG)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX$_\lambda$GG)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX$_\lambda$G)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX$_\lambda$)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X$_\lambda$GG)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX$_\lambda$G)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX$_\lambda$)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades. Ejemplos aun adicionales incluyen (X$_\lambda$G)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX$_\lambda$)n en donde X$_\lambda$ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5.

En modalidades adicionales, las proteínas adecuadas capaces de translocarse en un ER pueden ser una proteína globular, albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de unión al antígeno de fragmento (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento

variable de cadena única (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio de unión a esta, y un fragmento de esta. Las proteínas adecuadas adicionales capaces de translocarse en un ER pueden incluir proteínas transmembrana de tipo I o un fragmento de estas, o proteínas transmembrana de tipo II o un fragmento de estas.

En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende el polipéptido corto o proteína y la IL-18 o variante de IL-18, o fragmentos de estas, comprende además una segunda proteína capaz de translocarse en el ER o un fragmento de esta. La segunda proteína capaz de translocarse en el ER o un fragmento de este puede ser un dominio Fc o HSA, beta2microglobulina, transferrina, región de unión al antígeno de fragmento (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena única (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio de unión a esta, y un fragmento de esta, o proteínas transmembrana de tipo I o un fragmento de estas, o proteínas transmembrana de tipo II o un fragmento de estas como se describe en la presente. Las Figuras 50A y 53A (las tres primeras de izquierda a derecha) son ejemplos no limitantes de tales proteínas de fusión.

En aun otras modalidades, la proteína de fusión comprende además una proteína que no puede translocarse de manera natural en el ER tal como proteínas nucleares o citosólicas fusionadas al N-terminal de IL-18. Para tales proteínas, un péptido señal (que puede denominarse secuencia líder), tal como la secuencia líder Ig-kappa (p. ej., METDTLLLWVLLLWVPGSTG (sec. con núm. de ident.: 247)) en FUSE-499, o uno o más otros péptidos señal que incluyen pero no se limitan a los derivados de albúmina humana y azurocidina humana, *ver* Kober et al. *Biotechnol Bioeng*. abril de 2013;110(4):1164-73 está fusionado con el N-terminal de la proteína que se transloca al no ER. Por ejemplo, el péptido señal puede estar en el extremo N-terminal del propéptido o de la IL-18 (o su fragmento, variante, o una variante de su fragmento). Un ejemplo adicional de una proteína capaz de translocarse en/a través de

ER puede ser una proteína diseñada genéticamente con un péptido señal, p. ej., en el extremo N-terminal. Como ejemplo, Hsp70 es una proteína nuclear, pero puede diseñarse genéticamente para que sea una proteína que se transloca al ER cuando se fusiona o se une con un péptido señal en la N-terminal de Hsp70. En diversas modalidades, la adición de un péptido señal N-terminal, tal como la secuencia líder Ig-kappa, está en lugar de una Fc, proteína globular o HSS que de cualquier otra manera estaría presente en una proteína de fusión descrita en la presente.

En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende además un fragmento dirigido a un tumor, p. ej., un fragmento que se dirige a proteínas de la superficie celular que incluyen, pero no se limita a, un antígeno asociado a tumores (TAA). Por ejemplo, FUSE-517 como se muestra en la Figura 51G es una proteína de fusión IL-18 enmascarada que también comprende un fragmento de anticuerpo anti-EGFR, p. ej., Fab de cetuximab. Uno o más fragmentos dirigidos a antígenos (preferentemente dirigidos a antígenos tumorales) de anticuerpos conocidos se conciben para ser compatibles con el sistema de proteínas de fusión descrito en la presente.

En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende un fragmento dirigido al receptor de activación, p. ej., un fragmento que se dirige a los receptores de activación en la superficie celular que incluye, pero no se limita a, CD16 en la superficie de una célula destructora natural. El fragmento dirigido al receptor de activación puede ser uno como se describe en la presente o uno conocido en la técnica a partir de la fecha de presentación de la presente invención. Los receptores de activación incluyen receptores asociados al motivo de activación basado en la tirosina-inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés), tales como CD16 y NKp46. Los receptores de activación también incluyen aquellos que participan en la activación espontánea de células NK, tales como NKp46 (CD335), NKp30 (CD337), NKp44 (CD336), NKG2D (CD314), DNAM-1 (CD226), 2B4

(CD244), LFA-1 (CD11a-CD18), y CD2. En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende tanto un fragmento dirigido al receptor de activación como un fragmento dirigido al tumor. Los ejemplos de fragmentos anti-CD16 incluyen, pero no se limitan a, dominios CH2 de IgG1, dominio CH2 de IgG4. En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende un fragmento de polipéptido que se dirige a un punto de control inmunitario, p. ej., fragmento que se dirige a un punto de control inmunitario expresado en células T. Por ejemplo, FUSE-694 como se muestra en la Figura 23 es una proteína de fusión IL-18 enmascarada que también comprende un fragmento anti-PD1. Los puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen pero no se limitan a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3. Uno o más fragmentos dirigidos al punto de control inmunitario de anticuerpos conocidos están concebidos para ser compatibles con el sistema de proteínas de fusión descrito en la presente. Los ejemplos de fragmentos anti-PD1 incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-514, spartalizumab, cemiplimab, AK105, BCD-100, BI 754091, JS001, LZM009, MGA012, Sym021, TSR-042, MGD013, AK104, XmAb20717, tislelizumab, o PF-06801591. Los ejemplos adicionales de fragmentos anti-PD1 también incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de vopratelimab, camrelizumab, sintilimab, AMP-224, AMP-514 y acrixolimab. Por lo tanto, por ejemplo, la proteína de fusión comprende un fragmento anti-PD1 de un anticuerpo anti-PD1 (p. ej., Fab, Fv), una variante de IL-18, y una proteína capaz de translocarse en un ER (p. ej., un dominio Fc), y opcionalmente, un enlazador.

En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende un polipéptido de direccionamiento, en donde el polipéptido de direccionamiento se dirige a una proteína en la misma superficie que el RC de IL-18. Los ejemplos de tales proteínas incluyen, pero no se limitan a, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, NKp46, CD137, CD40 o NKG2D. El polipéptido dirigido a CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o

δ1 TCR, NKp46, CD137, CD40 o NKG2D puede ser uno como se describe en la presente o uno conocido en la técnica a partir de la fecha de presentación de la presente invención. En algunas modalidades, la proteína de fusión (p. ej., una IL-18 enmascarada) comprende un polipéptido de direccionamiento, en donde el polipéptido de direccionamiento se dirige a una proteína en una célula que no contiene una IL-18RC. En estas modalidades, la proteína de fusión IL-18 necesitará ser suministrada cerca del complejo de IL-18R para que un efecto cis o de densidad resulte en la interacción entre la proteína de fusión IL-18 y el complejo de IL-18R. Por ejemplo, la proteína de fusión IL-18 dirigida a TAA podría llegar a interactuar con el complejo de IL-18R en las células T si (a) la proteína de fusión uniera a las células T con las células TAA+ o (b) la proteína de fusión se combinaba con otra proteína que uniera las células T con las células TAA+ o (c) la proteína de fusión unida a una célula TAA+ que interactuaba naturalmente con la célula T a través de un medio secundario (p. ej., interacción TCR/MHC). En otros ejemplos, la proteína de fusión podría ser suministrada a fibroblastos u otras células accesorias en el microambiente tumoral y liberada por proteasas de tal manera que pueda actuar sobre las células T o NK IL-18R+ a distancia.

Los polipéptidos de direccionamiento ilustrativos incluyen los señalados en la Tabla 18 o fragmentos de estos. De los enumerados como los anticuerpos de unión al antígeno, sus regiones VHH, Fab o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) pueden usarse como el sitio de unión al antígeno de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente.

En algunas modalidades, la enteroquinasa se usa para la escisión específica del sitio de proteínas de fusión recombinantes que contienen un sitio de reconocimiento de enteroquinasa accesible. Por ejemplo, la enteroquinasa puede escindirse específicamente después del extremo C-terminal del residuo de lisina en su sitio de escisión, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (sec. con núm. de ident.: 87). Por lo tanto, el fragmento producido a partir de esta

reacción de escisión no hereda ningún residuo de la secuencia de reconocimiento DDDDK (sec. con núm. de ident.: 87). Adicionalmente, DDDDK (sec. con núm. de ident.: 87) es parte de la etiqueta FLAG octapéptida (DYKDDDDK (sec. con núm. de ident.: 248)), que puede utilizarse como una etiqueta de fusión para el reconocimiento por anticuerpo, y para la detección de la proteína de fusión con análisis de transferencia de Western, así como para la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad anti-FLAG.

Preferentemente, un sitio de escisión puede basarse en sustratos peptídicos sensibles a otras enzimas, especialmente proteasas altamente expresadas en microambiente tumoral, tales como granzima B, granzima A, granzima M, granzima K, metaloproteinasa de matriz (MMP, por sus siglas en inglés) 1/2/9/14 u otras MMP. Es de destacar que las granzimas generalmente solo están reguladas al alza en los tumores inflamados. Por ejemplo, una secuencia de sustrato para la granzima B puede ser Ile–Glu–Xaa–Asp↓Xaa–Gly (sec. con núm. de ident.: 249) con la escisión en el enlace peptídico Asp↓Xaa. Alternativamente, una secuencia de sustrato para la granzima B también puede ser Ile–Glu–Xaa–Asp↓, con la escisión en el extremo C-terminal de Asp, y Xaa puede ser Gln (sec. con núm. de ident.: 88) u otro aminoácido.

Varias células inmunitarias pueden liberar granzima, tales como células T, células NK, neutrófilos y mastocitos. En varias modalidades, una proteína de fusión que comprende (a) un fragmento de polipéptido que se dirige a un punto de control inmunitario expresado en una célula inmunitaria y/o un fragmento de polipéptido que se dirige a un receptor de activación en la célula NK, y (b) un fragmento dirigido al tumor, es efectivo para llevar la célula inmunitaria (p. ej., célula T, célula NK) al tumor, lo que puede dar como resultado la liberación de granzimas que liberan IL-18. Por ejemplo, una proteína de fusión IL-18 que comprende un fragmento de polipéptido dirigido a una proteína de punto de control inmunitario puede revertir el agotamiento de las células NK y/o T que después son capaces de liberar más granzimas.

En modalidades adicionales, la proteína de fusión comprende un sitio de escisión reconocido por una serina proteasa, una cisteína proteasa, una aspartato proteasa, una treonina proteasa, una glutámico proteasa, una metaloproteasa, una gelatinasa o una asparagina péptido liasa. En algunas modalidades, el sitio de escisión de proteasa se reconoce por una catepsina B, una catepsina C, una catepsina D, una catepsina E, una catepsina K, una catepsina L, una calicreína, una hKl, una hK10, una hK15, una plasmina, una colagenasa, una colagenasa de tipo IV, una estromelisina, un factor Xa, una proteasa similar a la quimotripsina, una proteasa similar a la tripsina, una proteasa similar a la elastasa, una proteasa similar a la subtilisina, una actinidina, una bromelina, una calpaína, una caspasa, una caspasa-3, una Mir 1-CP, una papaína, una proteasa del VIH-1, una proteasa del VHS, una proteasa del CMV, una quimosina, una renina, una pepsina, una matriptasa, una legumaína, una plasmepsina, una nepentesina, una metaloexopeptidasa, una metaloendopeptidasa, una metaloproteasa de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), una MMP1, una MMP2, una MMP3, una MMP8, una MMP9, una MMP10, una MMP11, una MMP12, una MMP13, una MMP14, un ADAM10, un ADAM17, un ADAM12, un activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA, por sus siglas en inglés), una enteroquinasa, una diana específico de la próstata (PSA, hK3), una enzima convertidora de interleucina-1β, una trombina, un FAP (FAP-α), una dipeptidil peptidasa, o dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26), una serina proteasa transmembrana tipo II (TTSP, por sus siglas en inglés), una elastasa de neutrófilos, una catepsina G, una proteinasa 3, una serina proteasa de neutrófilos 4, una quimasa de mastocitos, una triptasa de mastocitos, una dipeptidil peptidasa y una dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26). En la Tabla 6B se incluyen ejemplos no limitativos de sitios de escisión. Como ejemplo particular, puede usarse IEQD.

Se contempla que una variante, fragmento, o un fragmento de una variante de la IL-18 es adecuada, y en algunas modalidades preferida, para la composición de la proteína

de fusión. Por ejemplo, una variante de IL-18 madura puede tener una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la IL-18 madura silvestre. Por ejemplo, una o más cisteínas en la IL-18 o su propéptido se reemplazan por un aminoácido natural o no natural, tal como de Cys a Ser, Ala o Val, para reducir la agregación de la molécula en la proteína de fusión. Ejemplos adicionales incluyen cisteína a treonina, asparagina o glutamina; cisteína a alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano; cisteína a fenilalanina, alanina, ácido aspártico o asparagina; o cisteína a treonina, glutamina, ácido aspártico, fenilalanina, isoleucina o histidina.

Una variante de IL-18 puede tener una identidad de secuencia de 95 %, 90 %, 85 %, 83 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % o al menos 60 % con la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, una variante de IL-18 puede tener al menos 60 % y como máximo 83 % de identidad de secuencia con la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, una variante de la IL-18 puede tener entre 60 %-64 %, 65 %-69 %, 70 %-74 %, 75 %-89 %, u 80 %-83 % de identidad de secuencia con la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, la variante de IL-18 en la proteína de fusión se libera como un fragmento funcional de aproximadamente 15 kDa (p. ej., en los geles de electroforesis probados) cuando se escinden en un sitio de escisión de la proteína de fusión. (Se concibe que la proteína liberada puede ser IL-18 madura que normalmente correría a 18 kDa, pero puede aparecer como aproximadamente 15 kDa debido al marcador que se usa o al porcentaje específico de poliacrilamida en un gel.) Un fragmento de IL-18 puede tener un 95 %, 90 %, 85 %, 83 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, o al menos 60 % de identidad de secuencia (y/o longitud) con la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, un fragmento de IL-18 producido por la proteína de fusión descrita en la presente, especialmente después de la escisión de proteasa de la proteína de fusión, tiene menos de 85 % (p. ej., aproximadamente 83 %, aproximadamente 83 %-80 %, aproximadamente 80 %-75 %,

aproximadamente 75 %-70 %, o aproximadamente 70 %-65 %) en tamaño en comparación con la IL-18 madura natural/silvestre; por ejemplo, un fragmento de IL-18 de aproximadamente 15 kDa de tamaño, que preferentemente tiene afinidad de unión comparable por IL-18Ra/b como la IL-18 madura silvestre, se fusiona a un propéptido (o variante de PP) y una proteína que se transloca al ER (con o sin mutaciones), y la proteína de fusión también incluye un sitio de escisión de proteasa, de tal manera que después de la escisión de proteasa, un pequeño fragmento de IL-18 (p. ej., aproximadamente 15 kDa en tamaño), se libera. Preferentemente, este pequeño fragmento de IL-18 mantiene la afinidad de unión natural por IL-18Ra/b y una afinidad de unión igual o menor en relación con IL-18Ra/b para IL-18BP. Preferentemente una variante, fragmento, o un fragmento de una variante de la IL-18 es capaz de unirse a IL-18R y formar un complejo, para activar unos programas proinflamatorios y/o una ruta NF-κB. En algunas modalidades, la variante, fragmento o un fragmento de una variante de la IL-18 es capaz de tener una afinidad de unión aumentada (p. ej., 150 %, 140 %, 130 %, 120 %, 110 %, o al menos 100 % en relación con la IL-18 silvestre) y/o inducir la actividad biológica de al menos 150 %, 140 %, 130 %, 120 %, 110 %, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, o 10 %, en comparación con la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, la variante, fragmento o un fragmento de una variante de la IL-18 es capaz de tener una afinidad de unión aumentada al 120 %, 110 % o al menos 100 % en relación con la IL-18 silvestre, y/o inducir la actividad biológica de al 120 %, 110 %, 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 %, en comparación con la IL-18 silvestre. En modalidades adicionales, una variante, fragmento, o un fragmento de una variante de la IL-18 tiene una unión disminuida a la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), en comparación con una IL-18 silvestre.

En algunas modalidades, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene al menos 1000, 2000, 3000, 5000, 10.000, 30.000, 50.000, 70.000,

80.000, 90.000, o 100.000 veces de aumento en la actividad biológica (p. ej., la unión con IL-18R para formar el complejo de IL-18/IL-18Rα/β e inducir la señalización corriente abajo), en comparación con una forma no escindida en la proteína de fusión especialmente con el propéptido. En modalidades adicionales, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una actividad biológica comparable, o dentro de aproximadamente 10, 20, 30, 40 o 50 veces de diferencia en la actividad biológica, en comparación con la IL-18 madura humana recombinante.

En algunas modalidades, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una afinidad de unión por su complejo de IL-18R con una constante de disociación en equilibrio (KD) de aproximadamente 18 nM, (p. ej., 18 nM ± 0,3 nM, 18 nM ± 0,5 nM, 18 nM ± 1,0 nM). En algunas modalidades, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una afinidad de unión por su complejo de IL-18R que es aproximadamente la misma, o al menos 100 %, 95 %, o 90 %, en comparación con la de la IL-18 silvestre. En algunas modalidades, la IL-18 o su fragmento o variante escindido de la proteína de fusión tiene una afinidad de unión por su complejo de IL-18R que es mayor que la de la IL-18 silvestre, p. ej., una afinidad de unión que es al menos 105 %, 110 % en comparación con la de la IL-18 silvestre, o que tiene un valor de KD al menos 10 % o 20 % menor que el de la IL-18 silvestre. Preferentemente, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una afinidad de unión reducida por IL-18BP, en comparación con la de la IL-18 silvestre. Por ejemplo, en algunos casos, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una KD con IL-18BP de 18 nM o mayor, de tal manera que tiene una afinidad de unión menor a IL-18BP que a IL-18R. En algunos casos, la IL-18 o su fragmento o variante escindida de la proteína de fusión tiene una KD con IL-18BP de 18 nM o mayor, mientras que la

IL-18 silvestre tiene una KD con IL-18BP de aproximadamente 0,4 nM. También se concibe que KD puede variar dependiendo de la configuración del instrumento y del protocolo.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende un primer polipéptido o proteína capaz de translocarse en un retículo endoplásmico (ER) o un fragmento de este; y una interleucina 18 (IL-18), un fragmento de IL-18, una variante de IL-18, o un fragmento de la variante de IL-18, en donde la IL-18, el fragmento de IL-18, la variante de IL-18, o el fragmento de la variante de IL-18 está en el extremo C-terminal de la proteína de fusión en relación con el primer polipéptido o proteína capaz de translocarse al ER. En diversas modalidades, el primer polipéptido no es el propéptido IL-18 silvestre. En diversas modalidades, la proteína capaz de translocarse en un retículo endoplásmico (ER) o un fragmento de este no es el propéptido IL-18 silvestre. Además de estas características, en la presente se analizan características adicionales de la proteína de fusión.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una variante de IL-18. En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPP DNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMF TVQNED (sec. con núm. de ident.: 250) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPP DNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMF TVQNED (sec. con núm. de ident.: 250). En diversas modalidades, las sustituciones de uno

a cinco aminoácidos son una sustitución de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son dos sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son tres sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cuatro sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cinco sustituciones de aminoácidos. En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende no más de cinco sustituciones de aminoácidos, con la excepción de sustituir las cisteínas. En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251).

En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en posiciones 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una o más sustituciones de aminoácidos en

las posiciones C74, C104, C112, y C164, y de una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149.

En diversas modalidades, las sustituciones de aminoácidos en una o más de C74, C104, C112, y C164 se sustituyen cada una independientemente con valina, alanina o serina. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una o más de: E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; o M149V o M149I. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; y M149V o M149I.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende una variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B. En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B, comprende además un propéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna propéptido en la Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18. En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B y el propéptido seleccionado de la Tabla 6B, comprende además un péptido de escisión seleccionado de la Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18 y el propéptido. Como ejemplo particular, se puede usar IEQD (sec. con núm. de ident.: 88).

En diversas modalidades, la variante de IL-18 es una variante de IL-18 descrita en la patente de los EE. UU 7.524.488, la publicación de patente de los EE. UU, núm. 2019/0070262, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2021/0015891, o la publicación PCT núm. WO 2022/038417, las variantes y secuencias de IL-18 de cada una de estas patentes o publicaciones de las cuales se incorporan en la presente como referencia, como si estuviesen completamente establecidas.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un polipéptido de direccionamiento. En algunas modalidades, el polipéptido de direccionamiento se dirige a una proteína en una superficie celular, en donde la superficie celular también tiene un RC de IL-18 o la célula es capaz de expresar el RC de IL-18. En diversas modalidades, la proteína de fusión se une a una célula que tiene un RC de IL-18 o es capaz de expresar el RC de IL-18 después de la activación de la célula, y activa la señal del RC de IL-18.

En otras modalidades, el polipéptido de direccionamiento se dirige a una proteína en una superficie celular que no tiene un RC de IL-18 o la célula no es capaz de expresar el RC de IL-18. La célula que no tiene el RC de IL-18 en su superficie o no es capaz de expresar el RC de IL-18 está en estrecha proximidad a una célula que expresa el RC de IL-18 o es capaz de expresar el RC de IL-18. En otros casos, la proteína de fusión puede llevar a la célula que no tiene el RC de IL-18 en su superficie o que no es capaz de expresar el RC de IL-18 que está en estrecha proximidad de una célula que expresa el RC de IL-18 o es capaz de expresar el RC de IL-18.

En diversas modalidades, el polipéptido de direccionamiento comprende un dominio de unión al antígeno asociado al tumor.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un dominio de unión para una proteína expresada en células inmunitarias. En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un dominio de unión para una proteína expresada en células inmunitarias que expresan el complejo receptor de IL-18 o en células inmunitarias que después de la activación expresan el complejo receptor de IL-18.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Esto permite que la proteína de fusión se una a una célula tumoral, o a una célula inmunitaria o a una célula estromal en un tejido tumoral, o a un ganglio linfático

de drenaje tumoral, u otro órgano linfoide secundario. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmento Fc, fragmento Fab, fragmento Fv, así como otros analizados en la presente.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además un dominio de enmascaramiento. En algunas de estas modalidades, el dominio de enmascaramiento proporciona protección para IL-18, e IL-18 no puede liberarse por una proteasa. En algunas de estas modalidades, una IL-18 madura o variante de IL-18 madura puede liberarse de un dominio de enmascaramiento por una proteasa. En diversas modalidades, la proteasa es granzima, que puede liberarse de una célula inmunitaria. Los ejemplos de células inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, una célula NK, una célula T, un neutrófilo o un mastocito. En diversas modalidades, la proteasa es una metaloproteasa, cuya metaloproteasa puede expresarse en un microambiente tumoral o ganglio linfático de drenaje tumoral. En la presente se describen ejemplos adicionales de proteasa y tipos de granzimas. En diversas modalidades, la IL-18 madura aumenta la actividad de las células NK o células T, y opcionalmente la actividad es una o más de proliferación, supervivencia y citotoxicidad.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además una molécula que extiende la vida media. Un ejemplo no limitante de una molécula que extiende la vida media es un polipéptido que extiende la vida media; por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA) o un fragmento de unión a HSA. En diversas modalidades, la proteína de fusión tiene una actividad reducida en comparación con la IL-18 silvestre cuando no está unida a una célula que tiene el RC de IL-18. En diversas modalidades, la actividad reducida es al menos una reducción de 75 % en la actividad en comparación con la IL-18 silvestre.

En algunas modalidades, se atenúa una variante de IL-18 madura en el C-terminal de la máscara. Por ejemplo, la IL-18-mut13A madura está 100 veces atenuada.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido 1 y el polipéptido 2 seleccionados de la Tabla 6A. En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además el polipéptido 3 seleccionado de la Tabla 6A. En diversas modalidades, el polipéptido 1 y el polipéptido 2, y opcionalmente el polipéptido 3 se seleccionan de la misma fila de la Tabla 6A.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende el polipéptido 1 seleccionado de la Tabla 6A, en donde el polipéptido 1 comprende HSA.

En diversas modalidades, la proteína de fusión no comprende una variante de IL-18 descrita en la patente de los EE. UU 7.524.488, la publicación de patente de los EE. UU, núm. 2019/0070262, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2021/0015891, o la publicación PCT núm. WO 2022/038417, las variantes y secuencias de IL-18 de cada una de estas patentes o publicaciones de las cuales se incorporan en la presente como referencia, como si estuviesen completamente establecidas.

Diversas modalidades de la invención incluyen variantes de propéptido. En diversas modalidades, la variante de propéptido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: AAEPVEDNX_1INFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN en donde X_1 es cualquier aminoácido excepto cisteína (sec. con núm. de ident.: 238). En diversas modalidades, X_1 es alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano (sec. con núm. de ident.: 239). En diversas modalidades, X_1 es valina (sec. con núm. de ident.: 78). En diversas modalidades, X1 es serina, treonina, asparagina o glutamina (sec. con núm. de ident.: 240). En diversas modalidades, X_1 es serina (sec. con núm. de ident.: 76).

Diversas modalidades incluyen variantes de IL-18 que se van a usar en las proteínas de fusión de múltiples citocinas de la presente invención. En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las

posiciones de aminoácidos 37-193 de la sec. con núm. de ident.: 250 con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRP LFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D (sec. con núm. de ident.: 250). En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una sustitución de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son dos sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son tres sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cuatro sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son cinco sustituciones de aminoácidos. En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende no más de cinco sustituciones de aminoácidos, con la excepción de sustituir las cisteínas.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGN RPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNP PDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIM FTVQNED (sec. con núm. de ident.: 251).

En diversas modalidades, la variante de IL-18 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en las posiciones 37-193 de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNR PLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPD NIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTV QNED (sec. con núm. de ident.: 251) con una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones C74, C104, C112, y C164, y una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones E42, M87, K89, M96, y M149, de MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENIEQDYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNR PLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPD NIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTV QNED (sec. con núm. de ident.: 251). En diversas modalidades, las sustituciones de aminoácidos en una o más de C74, C104, C112, y C164 se sustituyen cada una independientemente con valina, alanina o serina.

En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son una o más de: E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; o M149V o M149I. En diversas modalidades, las sustituciones de uno a cinco aminoácidos son E42K, E42R, E42A, E42H, o E42Q; M87K, o M87H; K89G, K89A, o K89E; M96L, o M96I; y M149V o M149I.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 se selecciona de la columna “variante de IL18 madura” en la Tabla 6B.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende además un propéptido IL-18 o una variante de propéptido IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende además una variante de propéptido de IL-18 que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: AAEPVEDNX_1INFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN en donde X_1 es cualquier aminoácido excepto cisteína (sec. con núm. de ident.: 238). En diversas modalidades, X_1 es alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano (sec. con núm. de ident.: 239). En diversas modalidades, X_1 es valina (sec. con núm. de ident.: 78). En diversas modalidades, X_1 es serina, treonina, asparagina o glutamina (sec. con núm. de ident.: 240). En diversas modalidades, X_1 es serina (sec. con núm. de ident.: 76). En diversas modalidades, la variante de IL-18 se selecciona de la columna "Variante de IL18 madura" de la Tabla 6B, y además comprende un propéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de la columna "Propéptido" en la Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 comprende además una variante de propéptido IL-18 y un péptido de escisión. En diversas modalidades, el péptido de escisión seleccionado de la Tabla 6B. Como ejemplo particular, puede usarse IEQD.

En diversas modalidades, la proteína de fusión que comprende la variante de IL-18 seleccionada de la Tabla 6B, un propéptido seleccionado de la Tabla 6B y un péptido de escisión seleccionado de la Tabla 6B, y opcionalmente de la misma fila que la variante de IL-18 y el propéptido.

En diversas modalidades, la variante de IL-18 no es una variante de IL-18 descrita en la patente de los EE. UU. núm. 7.524.488, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2019/0070262, la publicación de patente de los EE. UU. núm. 2021/0015891 o la publicación PCT núm. WO 2022/038417, cuyas variantes y secuencias de IL-18 de cada una de estas patentes o publicaciones se incorporan en la presente como referencia, como si estuviesen completamente establecidas.

Tabla 6A. Secuencias de aminoácidos de componentes respectivos en proteínas de fusión ilustrativas (“FUSE”). Algunas de las secuencias del “Polipéptido 1”, es decir, las primeras secuencias de brazo polipeptídicas, son idénticas en FUSE-422, FUSE-423, FUSE-424, FUSE-441, FUSE-442, FUSE-462, FUSE-480, FUSE-481, FUSE-484, FUSE-485, FUSE-486, FUSE-487, FUSE-499, FUSE-500, FUSE-505, FUSE-516, FUSE-517, FUSE-545, FUSE-546, FUSE547, FUSE5-556, FUSE-583-587, FUSE-599-602, FUSE-645, FUSE-686, FUSE-756-758, FUSE-775, FUSE-874-876, y FUSE-878-892.

	Polipéptido 1	**Polipéptido 2**	**Polipéptido 3**
FUSE-422	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 20)	
FUSE-423	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 21)	
FUSE-424	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 22)	
FUSE-441	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 23)	
FUSE-442	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 24)	
FUSE-462	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 25)	
FUSE-480	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 26)	
FUSE-481	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 27)	
FUSE-484	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 28)	
FUSE-485	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 29)	
FUSE-486	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 30)	
FUSE-487	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 31)	
FUSE-499	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 32)	
FUSE-500	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 33)	
FUSE-501	(sec. con núm. de ident.: 2)		
FUSE-502	(sec. con núm. de ident.: 3)		
FUSE-503	(sec. con núm. de ident.: 4)		
FUSE-504	(sec. con núm. de ident.: 5)		
FUSE-505	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 34)	
FUSE-507	(sec. con núm. de ident.: 6)		
FUSE-508	(sec. con núm. de ident.: 7)		
FUSE-509	(sec. con núm. de ident.: 8)		
FUSE-510	(sec. con núm. de ident.: 9)		
FUSE-516	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 35)	
FUSE-517	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 36)	(sec. con núm. de ident.: 73)

FUSE-545	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 37)	
FUSE-546	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 38)	
FUSE-547	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 39)	
FUSE-555	(sec. con núm. de ident.: 10)	(sec. con núm. de ident.: 40)	(sec. con núm. de ident.: 73)
FUSE-556	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 41)	
FUSE-557	(Sec. con núm. de ident.:1	(sec. con núm. de ident.: 254)	(sec. con núm. de ident.: 73)
FUSE-583	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 42)	
FUSE-584	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 43)	
FUSE-585	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 44)	
FUSE-586	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 45)	
FUSE-587	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 46)	
FUSE-599	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 47)	
FUSE-600	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 48)	
FUSE-601	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 49)	
FUSE-602	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 50)	
FUSE-624	(sec. con núm. de ident.: 10)	(sec. con núm. de ident.: 51)	(sec. con núm. de ident.: 73)
FUSE-625	(sec. con núm. de ident.: 11)	(sec. con núm. de ident.: 52)	(sec. con núm. de ident.: 74)
FUSE-626	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 257)	
FUSE-627	(sec. con núm. de ident.: 12)	(sec. con núm. de ident.: 53)	
FUSE-645	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 54)	
FUSE-658	(sec. con núm. de ident.: 13)	Sec. con núm. de ident.: 41	
FUSE-659	(sec. con núm. de ident.: 14)	Sec. con núm. de ident.: 41	
FUSE-660	(sec. con núm. de ident.: 15)	Sec. con núm. de ident.: 41	
FUSE-669	(sec. con núm. de ident.: 10)	Sec. con núm. de ident.: 254	(sec. con núm. de ident.: 73)
FUSE-670	(sec. con núm. de ident.: 255)		(sec. con núm. de ident.: 73)
FUSE 675	(sec. con núm. de ident.: 256)		
FUSE-676	(sec. con núm. de ident.: 267)		
FUSE-682	(sec. con núm. de ident.: 258)	Sec. con núm. de ident.: 35	
FUSE-683	(sec. con núm. de ident.: 259)	(sec. con núm. de ident.: 272)	
FUSE-684	Sec. con núm. de ident.: 259	(sec. con núm. de ident.: 273)	
FUSE-685	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 275)	
FUSE-686	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 55)	
FUSE-691	(sec. con núm. de ident.: 16)		Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-694	(sec. con núm. de ident.: 17)	(sec. con núm. de ident.: 56)	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-756	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 57)	
FUSE-757	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 58)	
FUSE-758	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 59)	

FUSE-775	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 60)	
FUSE-782	(sec. con núm. de ident.: 18)	(sec. con núm. de ident.: 61)	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-783	(sec. con núm. de ident.: 18)	(sec. con núm. de ident.: 62)	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-827	(sec. con núm. de ident.: 19)	(sec. con núm. de ident.: 63)	
FUSE-832	(sec. con núm. de ident.: 260)	(sec. con núm. de ident.: 276)	
FUSE-874	(sec. con núm. de ident.:1)	(sec. con núm. de ident.: 64)	
FUSE-875	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 65)	
FUSE-876	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 66)	
FUSE-882	(sec. con núm. de ident.: 261)	(sec. con núm. de ident.: 277)	Sec. con núm. de ident.: 280
FUSE-887	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 67)	
FUSE-888	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 68)	
FUSE-889	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 69)	
FUSE-890	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 70)	
FUSE-891	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 71)	
FUSE-892	(sec. con núm. de ident.: 1)	(sec. con núm. de ident.: 72)	
FUSE-895	(sec. con núm. de ident.: 261)	(sec. con núm. de ident.: 278)	Sec. con núm. de ident.: 280
FUSE-952	Sec. con núm. de ident.: 260	(sec. con núm. de ident.: 279)	Sec. con núm. de ident.: 281
FUSE-1015	(sec. con núm. de ident.: 262)	Sec. con núm. de ident.: 279	Sec. con núm. de ident.: 281
FUSE-1017	Sec. con núm. de ident.: 18	Sec. con núm. de ident.: 276	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1041	Sec. con núm. de ident.: 260	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1042	Sec. con núm. de ident.: 262	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1044	(sec. con núm. de ident.: 263)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1109	(sec. con núm. de ident.: 264)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1110	(sec. con núm. de ident.: 265)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1111	(sec. con núm. de ident.: 266)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1112	(sec. con núm. de ident.: 274)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1113	(sec. con núm. de ident.: 268)	Sec. con núm. de ident.: 279	Sec. con núm. de ident.: 281
FUSE-1116	(sec. con núm. de ident.: 269)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1176	(sec. con núm. de ident.: 270)	-	Sec. con núm. de ident.: 282
FUSE-1177	(sec. con núm. de ident.: 271)	Sec. con núm. de ident.: 56	Sec. con núm. de ident.: 75
FUSE-1179	GGGGS***YFGKLKSKLSVIRN LNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDVRDNAPRTIFIISMYDDS QPRGRAVTISVKVEKISTLSV ENKIISFKEMNPPDNIKDTKS DIIFFQRSVPGHDNKMQFES SSYEGYFLAVEKERDLFKLI LKKEDELGDRSIMFTVQNED*** *EPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR*	**QVQLVESGGGVVQPGRSLRL DCKASGITFSNSGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYCATNDDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVD**	**Sec. con núm. de ident.: 75**

	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPG (sec. con núm. de ident.: 321)	**KKV***EPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK* (sec. con núm. de ident.: 56)	
FUSE-1229	GGGGS***YFGKLQSKLSVIRN LNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDVRDNAPRTIFIISMYDDS QPRGKAVTISVKVEKISTLSV ENKIISFKEMNPPDNIKDTKS DIIFFQRSVPGHDNKMQFES SLYEGYFLAVEKERDLFKLIL KKEDELGDRSIMFTVQNED*** *EPKSSDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNRFTQKSLSLSPGK* (sec. con núm. de ident.: 322)	**QVQLVESGGGVVQPGRSLRL DCKASGITFSNSGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSKRYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYCATNDDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKV***EPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK*** (sec. con núm. de ident.: 56)	**Sec. con núm. de ident.: 75**

Para FUSE1179 y 1229: (1) fuente regular = péptido corto; (2) ***fuente en negrita y en cursiva*** = variante IL-18; (3) *fuente en cursiva* = orificio Fc; (4) *fuente en cursiva y subrayada* = botón Fc; (5) **fuente en negrita** = Fab

Secuencias del polipéptido 3

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 73)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE (sec. con núm. de ident.: 74)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 75)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 280)

DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPGQSPQLLIYWMSTRA
SGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTKLELKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.: 281)

GGGGSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSQ
PRGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSS
YEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
DIVMTQGTLPNPVPSGESVSITCRSSKSLLYSDGKTYLNWYLQRPGQSPQLLIYWMSTRA
SGVSDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYYCQQGLEFPTFGGGTKLELKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (sec. con núm. de ident.:282)

Tabla 6B. Secuencias para el propéptido, escisión y variante madura de IL18 en la Tabla 6A.

	Propéptido	**Escisión**	**IL18 madura** **Variante de**
FUSE-422	AAEPVEDNSINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm. de ident.: 76)	DDDDK (sec. con núm. de ident.: 87)	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKSEKISTLSSENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSSYEGYFLASEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 97)
FUSE-423	AAEPVEDNAINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm. de ident.: 77)	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDARDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKAEKISTLSAENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSSYEGYFLAAEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 98)
FUSE-424	AAEPVEDNVINFVAMKFIDNTLYFIAEDDEN (sec. con núm. de ident.: 78)	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKVQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 99)
FUSE-441		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-442	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 100)
FUSE-462	Sec. con núm. de ident.: 78	IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-480	Sec. con núm. de ident.: 76	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKSEKISTLSSENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLASEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 101)
FUSE-481	Sec. con núm. de ident.: 77	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDARDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKAEKISTLSAENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLAAEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 102)
FUSE-484	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDVRDNAPRTIFIISKYGDSGARGLAVTISVKVEKISTLSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHSGKVQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 103)
FUSE-485	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-486	Sec. con núm. de ident.: 78	GPLGVR (sec. con núm. de ident.: 89)	Sec. con núm. de ident.: 100

FUSE-487	Sec. con núm. de ident.: 78	VHMPLGFLGP (sec. con núm. de ident.: 90)	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-499	Sec. con núm. de ident.: 78	LESD (sec. con núm. de ident.: 91)	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-500			Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-501	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-502	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-503		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-504		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-505		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-507	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-508		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-509	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-510		Sec. con núm. de ident.: 87	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-516	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-517	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-545			Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-546			YFGKLkSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYgDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 104)
FUSE-547			YFGKLrSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYgDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 105)
FUSE-555	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-583			YFGKLaSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYaDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD

			NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 106)
FUSE -584			YFGKLhSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYgDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 107)
FUSE -585			YFGKLrSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYeDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 108)
FUSE -586			YFGKLqSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYaDSQPRGMAVTISVKVEKIST LSVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHD NKMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGD RSIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 109)
FUSE -587	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE -599			(sec. con núm. de ident.: 110)
FUSE -600			YFGKLkSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISkYgDSQPRGMAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 111)
FUSE -601			YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIIShYaDSQPRGiAVTISVKVEKISTLS VENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNK iQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSI MFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 112)
FUSE -602			YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISKYaDSQPRGiAVTISVKVEKISTLS VENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNK iQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDRSI MFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 113)
FUSE -624	Sec. con núm. de ident.: 78	KPLGLQARVVGG GGTIEQD (sec. con núm. de ident.: 92)	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -625	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 92	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -626	Sec. con núm. de ident.: 78		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -627	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -645	Sec. con núm. de ident.: 76	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 97

FUSE-658	Sec. con núm. de ident.: 78	IGNRS (sec. con núm. de ident.: 93)	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-659	Sec. con núm. de ident.: 78	KPLGLQARVV (sec. con núm. de ident.: 94)	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-660	Sec. con núm. de ident.: 78	IEQDGGSIGNRS GGGGKPLGLQAR VVGGGGTIEQD (sec. con núm. de ident.: 95)	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-670	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-676	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-682	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-683	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-684	Sec. con núm. de ident.: 78	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-685	Sec. con núm. de ident.: 76		Sec. con núm. de ident.: 97
FUSE-686	AAEPVEDNsINFVAMKFID NTLYFIAEnDEN (sec. con núm. de ident.: 79)	QDIE (sec. con núm. de ident.: 96)	Sec. con núm. de ident.: 97
FUSE-694	Sec. con núm. de ident.: 76	Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 97
FUSE-756		Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-757		Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-758		Sec. con núm. de ident.: 88	Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-775	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-782	Sec. con núm. de ident.: 79		Sec. con núm. de ident.: 97
FUSE-783	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-827	Sec. con núm. de ident.: 79		Sec. con núm. de ident.: 97
FUSE-832			Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-874			Sec. con núm. de ident.: 100

FUSE-875			Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-876			Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-882	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-887	AAEPVEDNtINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 81)		Sec. con núm. de ident.: 101
FUSE-888	AAEPVEDNqINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 82)		Sec. con núm. de ident.: 101
FUSE-889	AAEPVEDNdINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 83)		Sec. con núm. de ident.: 102
FUSE-890	AAEPVEDNfINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 84)		Sec. con núm. de ident.: 102
FUSE-891	AAEPVEDNlINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 85)		Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-892	AAEPVEDNhINFVAMKFIDN TLYFIAEDDENLESD (sec. con núm. de ident.: 86)		Sec. con núm. de ident.: 100
FUSE-895	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-1015	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-1017	Sec. con núm. de ident.: 131		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-1042	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE-1044	Sec. con núm. de ident.: 80		Sec. con núm. de ident.: 110
FUSE-1109			YFGKLqSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYdDSQPRGkAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 283)
FUSE-1110			YFGKLqSKLSVIRNLNDQVLkIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYdDSQPRGkAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 284)
FUSE-1111			YFGKLqSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYdDSQPRGkAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN

			eMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 285)
FUSE -1112			YFGKLkSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYdDSQPRGrAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 286)
FUSE -1113			Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -1116			YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISKYGDSQPRGLAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHRN KVQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 287)
FUSE -1176			Sec. con núm. de ident.: 99
FUSE -1177			YFGKLqSKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DVRDNAPRTIFIISMYdDSQPRGkAVTISVKVEKISTL SVENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDN KMQFESSSYEGYFLAVEKERDLFKLILKKEDELGDR SIMFTVQNED (sec. con núm. de ident.: 283)

Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de polipéptidos respectivos de la Tabla 6A.

	Polinucleótido 1	**Polinucleótido 2**	**Polinucleótido 3**
FUSE-422	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 133)	
FUSE-423	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 134)	
FUSE-424	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 135)	
FUSE-441	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 136)	
FUSE-442	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 137)	
FUSE-462	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 138)	
FUSE-480	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 139)	
FUSE-481	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 140)	
FUSE-484	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 141)	
FUSE-485	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 142)	
FUSE-486	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 143)	
FUSE-487	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 144)	
FUSE-499	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 145)	
FUSE-500	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 146)	
FUSE-501	(sec. con núm. de ident.: 115)		
FUSE-502	(sec. con núm. de ident.: 116)		
FUSE-503	(sec. con núm. de ident.: 117)		

FUSE-504	(sec. con núm. de ident.: 118)		
FUSE-505	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 147)	
FUSE-507	(sec. con núm. de ident.: 119)		
FUSE-508	(sec. con núm. de ident.: 120)		
FUSE-509	(sec. con núm. de ident.: 121)		
FUSE-510	(sec. con núm. de ident.: 122)		
FUSE-516	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 148)	
FUSE-517	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 149)	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-545	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 150)	
FUSE-546	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 151)	
FUSE-547	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 152)	
FUSE-555	(sec. con núm. de ident.: 123)	(sec. con núm. de ident.: 153)	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-556	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 154)	
FUSE-557	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 288)	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-583	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 155)	
FUSE-584	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 156)	
FUSE-585	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 157)	
FUSE-586	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 158)	
FUSE-587	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 159)	
FUSE-599	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 160)	
FUSE-600	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 161)	
FUSE-601	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 162)	
FUSE-602	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 163)	
FUSE-624	(sec. con núm. de ident.: 123)	(sec. con núm. de ident.: 164)	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-625	(sec. con núm. de ident.: 124)	(sec. con núm. de ident.: 165)	Sec. con núm. de ident.: 187
FUSE-626	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 289)	
FUSE-627	(sec. con núm. de ident.: 125)	(sec. con núm. de ident.: 166)	
FUSE-645	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 167)	
FUSE-658	(sec. con núm. de ident.: 126)	(sec. con núm. de ident.: 154)	
FUSE-659	(sec. con núm. de ident.: 127)	(sec. con núm. de ident.: 154)	
FUSE-660	(sec. con núm. de ident.: 128)	(sec. con núm. de ident.: 154)	
FUSE-669	(sec. con núm. de ident.: 114)	Sec. con núm. de ident.: 288	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-670	(sec. con núm. de ident.: 290)	-	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-675	(sec. con núm. de ident.: 291)	-	-
FUSE-676	(sec. con núm. de ident.: 292)	-	-
FUSE-682	(sec. con núm. de ident.: 293)	(sec. con núm. de ident.: 148)	-
FUSE-683	(sec. con núm. de ident.: 294)	(sec. con núm. de ident.: 307)	-

FUSE-684	(sec. con núm. de ident.: 294)	(sec. con núm. de ident.: 308)	Sec. con núm. de ident.: 186
FUSE-685	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 309)	-
FUSE-686	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 168)	-
FUSE-691	(sec. con núm. de ident.: 129)		Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-694	(sec. con núm. de ident.: 130)	(sec. con núm. de ident.: 169)	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-756	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 170)	
FUSE-757	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 171)	
FUSE-758	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 172)	
FUSE-775	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 173)	
FUSE-782	(sec. con núm. de ident.: 131)	(sec. con núm. de ident.: 174)	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-783	(sec. con núm. de ident.: 131)	(sec. con núm. de ident.: 175)	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-827	(sec. con núm. de ident.: 132)	(sec. con núm. de ident.: 176)	
FUSE-832	(sec. con núm. de ident.: 295)	(sec. con núm. de ident.: 314)	-
FUSE-874	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 177)	
FUSE-875	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 178)	
FUSE-876	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 179)	
FUSE-882	(sec. con núm. de ident.: 296)	(sec. con núm. de ident.: 310)	Sec. con núm. de ident.: 311
FUSE-887	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 180)	
FUSE-888	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 181)	
FUSE-889	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 182)	
FUSE-890	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 183)	
FUSE-891	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 184)	
FUSE-892	(sec. con núm. de ident.: 114)	(sec. con núm. de ident.: 185)	
FUSE-895	(sec. con núm. de ident.: 296)	(sec. con núm. de ident.: 315)	Sec. con núm. de ident.: 311
FUSE-952	(sec. con núm. de ident.: 295)	(sec. con núm. de ident.: 316)	Sec. con núm. de ident.: 312
FUSE-1015	(sec. con núm. de ident.: 297)	(sec. con núm. de ident.: 316)	Sec. con núm. de ident.: 312
FUSE-1017	(sec. con núm. de ident.: 131)	Sec. con núm. de ident.: 314	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1041	(sec. con núm. de ident.: 295)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1042	(sec. con núm. de ident.: 297)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1044	(sec. con núm. de ident.: 298)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1109	(sec. con núm. de ident.: 299)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1110	(sec. con núm. de ident.: 300)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1111	(sec. con núm. de ident.: 301)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1112	(sec. con núm. de ident.: 302)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1113	(sec. con núm. de ident.: 303)	Sec. con núm. de ident.: 316	Sec. con núm. de ident.: 312
FUSE-1116	(sec. con núm. de ident.: 304)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1176	(sec. con núm. de ident.: 305)	-	Sec. con núm. de ident.: 313

FUSE-1177	(sec. con núm. de ident.: 306)	Sec. con núm. de ident.: 169	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1179	(sec. con núm. de ident.: 323)	(sec. con núm. de ident.: 169)	Sec. con núm. de ident.:188
FUSE-1229	(sec. con núm. de ident.: 324)	(sec. con núm. de ident.: 169)	Sec. con núm. de ident.:188

Tabla 20. Rendimientos de proteínas de fusión ilustrativas.

	Rendimiento		**Rendimiento**		**Rendimiento**		**Rendimiento**
FUSE-422	191 ml/l	**FUSE-504**	135 ml/l	**FUSE-600**	79 ml/l	**FUSE-889**	223 ml/l
FUSE-423	214 ml/l	**FUSE-505**	162 ml/l	**FUSE-601**	86 ml/l	**FUSE-890**	190 ml/l
FUSE-424	198 ml/l	**FUSE-507**	557 ml/l	**FUSE-602**	64 ml/l	**FUSE-891**	181 ml/l
FUSE-441	386 ml/l	**FUSE-508**	34 ml/l	**FUSE-691**	69 ml/l	**FUSE-892**	371 ml/l
FUSE-442	197 ml/l	**FUSE-509**	537 ml/l	**FUSE-694**	67 ml/l	**FUSE-1145**	232 mg/l
FUSE-462	304 ml/l	**FUSE-510**	32 ml/l	**FUSE-756**	46 ml/l	**FUSE-1146**	328 mg/l
FUSE-480	130 ml/l	**FUSE-516**	215 ml/l	**FUSE-757**	96 ml/l	**FUSE-1147**	232 mg/l
FUSE-481	199 ml/l	**FUSE-517**	150 ml/l	**FUSE-758**	64 ml/l	**FUSE-1148**	286 mg/l
FUSE-484	164 ml/l	**FUSE-545**	144 ml/l	**FUSE-775**	79 ml/l		
FUSE-485	348 ml/l	**FUSE-546**	143 ml/l	**FUSE-782**	41 ml/l		
FUSE-486	400 ml/l	**FUSE-547**	135 ml/l	**FUSE-783**	99 ml/l		
FUSE-487	205 ml/l	**FUSE-583**	86 ml/l	**FUSE-827**	207 ml/l		
FUSE-499	410 ml/l	**FUSE-584**	124 ml/l	**FUSE-874**	246 ml/l		
FUSE-500	253 ml/l	**FUSE-585**	136 ml/l	**FUSE-875**	137 ml/l		
FUSE-501	147 ml/l	**FUSE-586**	107 ml/l	**FUSE-876**	216 ml/l		
FUSE-502	159 ml/l	**FUSE-587**	228 ml/l	**FUSE-887**	155 ml/l		
FUSE-503	44 ml/l	**FUSE-599**	76 ml/l	**FUSE-888**	149 ml/l		

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos para la heterodimerización de Fc que incluyen diferentes versiones de perillas en agujeros de brazos polipeptídicos respectivos; por ejemplo, como polipéptido de supercóntigo o formando (parte de) la proteína capaz de translocarse al ER, para proteínas de fusión ilustrativas.

	Primer brazo de polipéptidos	**Segundo brazo de polipéptidos**
7.8.60	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTDNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLMSDGSFFLASKLTV	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPRRPRVYTLPPS RDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSVLTV

	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 189)	DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 190)
7.8.60 CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTDNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL MSDGSFFLASKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 191)	GQPRRPRVYTLPPSRDELTKNQVSLVCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSVLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 192)
A107	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 193)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDNLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 194)
A107 CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 195)	GQPREPQVYTLPPSRDNLTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 196)
DD-KK	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 197)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 198)
DD-KK CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 199)	GQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 200)
Duobody	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 201)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 202)
Duobody CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 203)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 204)
Direccionamiento electrostático CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSNLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 205)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 206)
Direccionamiento	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

electrostático	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSNLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 207)	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 208)
EW-RVT	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 193)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 209)
EW-RVT (2)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 210)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPC RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 211)
EW-RVT (2) CH3	GQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 212)	GQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 213)
EW-RVT CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 195)	GQPREPRVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 214)
HA-TF (1)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVHLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 215)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTFPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 216)
HA-TF (1) CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVHLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFALYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 217)	GQPREPQVTTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTFPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 218)
Botón en ojal (1)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 219)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 220)

Botón en ojal (1) CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 221)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 222)
Botón en ojal (2)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 223)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 224)
Botón en ojal (2) CH3	GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 225)	GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 226)
XmAb	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 227)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDQLTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 228)
XmAb CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCDV SGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 229)	GQPREPQVYTLPPSRDQLTKNQVKLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 230)
ZW1	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 231)	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPS RDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 232)
ZW1 CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 233)	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 234)

Detalles y modalidades de ROR1

El contenido de la solicitud internacional núm. PCT/US2023/070587, presentado el 20 de julio de 2023, titulado Anticuerpos VHH específicos del receptor

huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1) y anticuerpos multiespecíficos de estos como agentes reclutadores de células inmunitarias se incorporan en la presente como referencia como si estuviesen completamente establecidas.

Se describen en la presente anticuerpos (p. ej., anticuerpos aislados), o fragmentos de unión al antígeno de estos, que se unen inmunoespecíficamente a ROR1 que se pueden usar con las proteínas de fusión de múltiples citocinas de la presente invención. También se describe en la presente un constructo de anticuerpo multiespecífico que puede usarse en los métodos que implican administrar proteína/constructos de fusión separadas.

Los inventores han identificado VHH específico para ROR1 humano producido en camellos en respuesta a la estimulación por ROR1 *humano*, (denominado de esta manera como VHH derivado de camellos bactrianos). Estos VHH derivados de camellos estimulados por ROR1 humanos incluyen:

2A11 (un polipéptido que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de QVQLQESGGGSVPAGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKEREEVASMSIRSGRT YYSDSVKGRFTISQDGSKNTLYLQLNSLKAEDTALYYCAAAYGGSRCVYNYRGQGTQVT VSS, sec. con núm. de ident.: 331), y

5A1 (un polipéptido que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTY YADSVKGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQ VTVSS, sec. con núm. de ident.: 332).

Un anticuerpo anti-ROR1 aislado (o específico de ROR1), o fragmento de unión a ROR1 de este, puede comprender un VHH que comprende un polipéptido que tiene

una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo VHH (o nanocuerpo), que puede comprender, o consistir en, el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331.

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) para unirse a ROR1 humano, y estas CDR se identifican/están presentes en 2A11, en donde CDR1 de 2A11 consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325), CDR2 de 2A11 consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326), y la CDR3 de 2A11 consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327).

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende una o más de una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325, una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 326, y una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 327, en donde cada una de las variantes comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en comparación con los respectivos polipéptidos “silvestres” que tienen la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325, 326 o 327, respectivamente. En diversas modalidades, las sustituciones son sustituciones conservadoras. Preferentemente, una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325, una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 326, y/o una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de

ident.: 327 son capaces de unirse a ROR1 humano, con mayor preferencia aún capaces de unirse inmunoespecíficamente a ROR1 humano, o poseen una afinidad de unión a ROR1 que es al menos 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, o 50 % en comparación con los respectivos polipéptidos CDR "silvestres" presentes en 2A11. Preferentemente, uno o ambos de los residuos de cisteína en las CDR de 2A11 (es decir, residuos de cisteína en la sec. con núm. de ident.: 325 y en la sec. con núm. de ident.: 327) no se modifican, en un polipéptido que es una variante de 2A11 o en un polipéptido que es una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325, 326 o 327. Por lo tanto, en algunas modalidades, un polipéptido que comprende uno o más de una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325, una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 326, y una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 327, todavía mantiene los residuos de cisteína como aquellos en el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325 y en el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 327. Alternativamente, un polipéptido puede ser una variante de 2A11, en donde uno o ambos de los residuos de cisteína en las CDR de 2A11 se reemplazan con un aminoácido natural o no natural que contiene un grupo funcional reticulante, para apoyar la formación de enlaces inter/intramoleculares; ejemplos de estos aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, p-benzoil-L-fenilalanina (Bpa), azida y haloalcano. Preservar la capacidad de formar enlaces disulfuro y/o intramoleculares en aquellas ubicaciones de residuos donde la cisteína está presente en la CDR de 2A11 se indica que es importante, ya que los datos de la Figura 62G demuestran que reemplazar los residuos de cisteína con valina debilita significativamente la afinidad de unión de 2A11 al antígeno.

En algunas modalidades, los aminoácidos en la porción no CDR de 2A11 se modifican para generar una versión humanizada de 2A11 (que comprende las CDR de las sec. con núms. de ident.: 325, 326 y 327 y una porción marco/no CDR que está humanizada), para adaptarse mejor a las aplicaciones en sujetos humanos. Por lo tanto, diversas modalidades proporcionan un anticuerpo anti-ROR1 humanizado o fragmento de este.

En modalidades adicionales, se proporciona un anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 (o específico de ROR1), que comprende (1) una porción de unión al antígeno que es un VHH que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331, o que es un VHH que comprende los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 325, 326 y 327, y (2) un dominio Fc de una cadena pesada de Ig. Preferentemente, el anticuerpo de cadena pesada comprende además un dominio bisagra de una cadena pesada de Ig, de manera que el VHH se une a los dominios bisagra y Fc de la cadena pesada de Ig. El anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 descrito, o un fragmento de unión al antígeno de este, incluye todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulina (Ig) de cuatro cadenas, así como el isotipo IgY que generalmente se encuentra en el suero de gallina o pavo y en la yema de huevo de gallina o pavo. En algunas modalidades, el anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 comprende (1) una porción de unión al antígeno que es un VHH que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331, o un VHH que comprende CDR que tienen secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 325, 326 y 327, y (2) los dominios bisagra y Fc de una cadena pesada de IgG, en donde la IgG puede ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4.

Un anticuerpo anti-ROR1 (o específico de ROR1) aislado, o fragmento de unión a ROR1 de este, puede comprender alternativamente un VHH que comprende un

polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331. En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo VHH (o nanocuerpo), que puede comprender, o consistir en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331.

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de 5A1, en donde CDR1 de 5A1 consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328), CDR2 de 5A1 consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329), y CDR3 de 5A1 consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330).

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido que comprende una o más de una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328, una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 329, y una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 330, en donde cada una de las variantes comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en comparación con el respectivo polipéptido “silvestre” que tiene las secuencias de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328, 329 o 330. En diversas modalidades, las sustituciones son sustituciones conservadoras. Preferentemente, una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328, una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 329, y/o una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 330 son capaces de unirse a ROR1 humano, con mayor preferencia

aún capaces de unirse inmunoespecíficamente a ROR1 humano, o poseen una afinidad de unión al ROR1 humano que es al menos 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, o 50 % en comparación con las respectivas CDR “silvestres” presentes en 5A1. Preferentemente, uno o ambos de los residuos de cisteína en las CDR de 5A1 (es decir, residuos de cisteína en la sec. con núm. de ident.: 328 y en la sec. con núm. de ident.: 330) no se modifican, en un polipéptido que es una variante de 5A1 o en un polipéptido que es una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328, 329 o 330. Por lo tanto, en algunas modalidades, un polipéptido que comprende una o más de una variante de la sec. con núm. de ident.: 328, una variante de la sec. con núm. de ident.: 329, y una variante de la sec. con núm. de ident.: 330 aún mantiene los residuos de cisteína como los de la sec. con núm. de ident.: 328 y la sec. con núm. de ident.: 330. Alternativamente, un polipéptido puede ser una variante de 5A1, en donde uno o ambos de los residuos de cisteína en las CDR de 5A1 se reemplazan con un aminoácido natural o no natural que contiene un grupo funcional de reticulación, para apoyar la formación de enlaces inter-/intramoleculares; ejemplos de estos aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, p-benzoil-L-fenilalanina (Bpa), azida y haloalcano. Preservar la capacidad de formar enlaces disulfuro y/o intramoleculares en esas ubicaciones de residuos se indica que es importante, ya que los datos de la Figura 62F demuestran que reemplazar los residuos de cisteína con valina debilita significativamente la afinidad de unión de 5A1 al antígeno.

En algunas modalidades, los aminoácidos en la porción no CDR de 5A1 se modifican, para generar una versión humanizada de 5A1 (que comprende las CDR cuyas secuencias de aminoácidos son las sec. con núms. de ident.: 328, 329, 330, y una porción marco/no CDR que está humanizada), para adaptarse mejor a las aplicaciones en sujetos humanos. Los VHH humanizados ejemplares derivados de 5A1 incluyen:

5A1-H1 (un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELASISTGTGNTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSRGQGTLVT VSS, sec. con núm. de ident.: 335).

5A1-H2 (un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWVRQAPGKEREEVATISTGTGNT YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGT QVTVSS, sec. con núm. de ident.: 336).

5A1-H3 (un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVSTISTGTGNTY YADSVKGRFTISQDKSKNTLYLRMNSLRAEDTALYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQV TVSS, sec. con núm. de ident.: 337).

5A1-H4 (un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTY YADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMKTLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTQV TVSS, sec. con núm. de ident.: 338), y

5A1-H5 (un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTY YADSVKGRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQ VTVSS, sec. con núm. de ident.: 339).

En la Tabla 14 se muestran ejemplares adicionales de VHH humanizados.

En modalidades adicionales, se proporciona un anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 (o específico de ROR1), que comprende (1) una porción de unión al antígeno (i) que es un VHH que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con

núm. de ident.: 332, o (ii) que es un VHH que comprende las CDR que son polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 328, 329 y 330, o (iii) que comprende un VHH que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 335-339, o (iv) que comprende uno o más de (i), (ii) y (iii), y (2) un dominio Fc de una cadena pesada de Ig. Preferentemente, el anticuerpo de cadena pesada comprende además un dominio bisagra de una cadena pesada de Ig, de manera que el VHH se une a los dominios bisagra y Fc de la cadena pesada de Ig. El anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 descrito, o un fragmento de unión al antígeno de este, incluye todos los isotipos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulina (Ig) de cuatro cadenas, así como el isotipo IgY que generalmente se encuentra en el suero de gallina o pavo y en la yema de huevo de gallina o pavo. En algunas modalidades, el anticuerpo de cadena pesada anti-ROR1 comprende (1) una porción de unión al antígeno que es una VHH que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332, o que es una VHH que comprende las CDR cuyas secuencias de aminoácidos son las sec. con núm. de ident.: 328, 329 y 330, o que es un VHH que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 335-339, y (2) los dominios bisagra y Fc de una cadena pesada de IgG, en donde la IgG puede ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

También se proporcionan polipéptidos que comprenden (1) dos o más repeticiones de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331, (2) dos o más repeticiones de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332, (3) una o más repeticiones de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331 y una o más repeticiones de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332, (4) dos o más repeticiones de un polipéptido que tiene una

secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 335-339, o (5) una o más repeticiones de un primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una de las sec. con núms. de ident.: 335-339 y una o más repeticiones de un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una de las sec. con núms. de ident.: 335-339, donde el primer y el segundo polipéptido tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, un polipéptido comprende una secuencia en tándem de un primer VHH y un segundo VHH, en donde el primer VHH y el segundo VHH pueden ser iguales o diferentes. La secuencia de aminoácidos del primer VHH y la secuencia de aminoácidos del segundo VHH pueden seleccionarse individualmente de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 331 y 332, o seleccionarse de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 335-339. En un aspecto, el primer VHH y el segundo VHH son iguales y ambos tienen la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331; en otro aspecto, el primer VHH y el segundo VHH son iguales y ambos tienen la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332; en otro aspecto más, el primer VHH y el segundo VHH tienen la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331 y/o una variante del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331; en otro aspecto más, el primer VHH y el segundo VHH tienen la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332 y/o una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332; o en un aspecto alternativo, el primer VHH puede tener la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331 o puede ser una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331, y el segundo VHH puede tener la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332 o puede ser una variante del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm.

de ident.: 332. En modalidades adicionales, el polipéptido que comprende la secuencia en tándem comprende además un enlazador, en donde el primer VHH y el segundo VHH se conectan con un enlazador. El enlazador puede estar en el extremo N-terminal del VHH más cercano al extremo N del Fc, o alternativamente en el extremo C-terminal.

Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una región determinante de complementariedad (CDR) 1, un polipéptido que tiene una CDR2 y un polipéptido que tiene una CDR3 seleccionada de la Tabla 15A, en donde CDR1, CDR2 y CDR3 se seleccionan de la misma fila en la Tabla 15A. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una región determinante de complementariedad (CDR) 1, un polipéptido que tiene una CDR2, y un polipéptido que tiene una CDR3 seleccionada de la Tabla 15B, en donde CDR1, CDR2 y CDR3 se seleccionan de la misma fila en la Tabla 15B. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: una variante del polipéptido que tiene el polipéptido que tiene la CDR1, el polipéptido que tiene la CDR2 y el polipéptido que tiene la CDR3 seleccionada de la Tabla 15A, en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR1 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR1, en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR2 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR2, y en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR3 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR3, en donde CDR1, CDR2 y CDR3 se seleccionan de la misma fila en la Tabla 15A. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: una variante del polipéptido que tiene el polipéptido que tiene la CDR1, el polipéptido que tiene la CDR2 y el polipéptido que tiene la CDR3 seleccionada

de la Tabla 15B, en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR1 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR1, en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR2 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR2, y en donde la variante del polipéptido que tiene la CDR3 comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de un residuo de aminoácido en el polipéptido que tiene la CDR3, en donde CDR1, CDR2 y CDR3 se seleccionan de la misma fila en la Tabla 15B. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 328, un polipéptido que tiene una CDR2 de la sec. con núm. de ident.: 401, y un polipéptido que tiene una CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 330. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 397, un polipéptido que tiene una CDR2 de la sec. con núm. de ident.: 401, y un polipéptido que tiene una CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 408. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 397, un polipéptido que tiene una CDR2 de la sec. con núm. de ident.: 401, y un polipéptido que tiene una CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 409. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 397, un polipéptido que tiene una CDR2 de la sec. con núm. de ident.: 329, y un polipéptido que tiene una CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 408. Diversas modalidades proporcionan un polipéptido, que comprende: un polipéptido que tiene una CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 397, un polipéptido que tiene una CDR2 de la sec. con núm. de ident.: 329, y un polipéptido que tiene una CDR3 de la sec. con núm. de ident.: 409. En diversas modalidades, las sustituciones son sustituciones conservadoras.

Preferentemente, las variantes de la CDR1, CDR2 o CDR3 son capaces de unirse a ROR1 humano, con mayor preferencia aún capaces de unirse inmunoespecíficamente a ROR1 humano, o poseen una afinidad de unión a ROR1 que es al menos 90 %, 80 %, 70 %, 60 % o 50 % en comparación con los polipéptidos CDR respectivos. En diversas modalidades, el polipéptido comprende además región marco (FWR) 1, región marco 2, región marco 3 y región marco 4 seleccionada de la Tabla 15B, y en donde FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4 se seleccionan de la misma fila en la Tabla 15B. En diversas modalidades, el polipéptido que tiene CDR1, CDR2, CDR3, comprende además un FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4 de una IgG humana. En diversas modalidades, el polipéptido que tiene una variante de CDR1, una variante de CDR2, una variante de CDR3, comprende además un FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4 de una IgG humana. En diversas modalidades, el polipéptido es un polipéptido VHH seleccionado de la Tabla 14. En diversas modalidades, el polipéptido es una variante de un polipéptido VHH seleccionado de la Tabla 14, en donde la variante comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido. En diversas modalidades, la variante comprende hasta 5 deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido. En diversas modalidades, la variante comprende hasta 1, 2 3 o 4 deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido... En diversas modalidades, la variante es al menos 95 % idéntica al polipéptido seleccionado de la Tabla 14. En diversas modalidades, la variante es al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al polipéptido seleccionado de la Tabla 14. En diversas modalidades, la variante es al menos 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 % idéntica a su polipéptido correspondiente seleccionado de la Tabla 14. En diversas modalidades, el polipéptido es un polipéptido de VHH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 340, sec. con núm. de ident.: 384, sec. con núm.

de ident.: 363, o sec. con núm. de ident.: 364. En diversas modalidades, el polipéptido es una variante de un polipéptido VHH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 340, sec. con núm. de ident.: 384, sec. con núm. de ident.: 363, o sec. con núm. de ident.: 364, en donde la variante comprende una o más deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido. En diversas modalidades, la variante comprende hasta 5 deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido. En diversas modalidades, la variante comprende hasta 1, 2 3 o 4 deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos del polipéptido... En diversas modalidades, la variante es al menos 95 % idéntica al polipéptido VHH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 340, sec. con núm. de ident.: 384, sec. con núm. de ident.: 363, o sec. con núm. de ident.: 364. En diversas modalidades, la variante es al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al polipéptido VHH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 340, sec. con núm. de ident.: 384, sec. con núm. de ident.: 363, o sec. con núm. de ident.: 364. En diversas modalidades, la variante es al menos 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 % idéntica a su polipéptido VHH que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 340, sec. con núm. de ident.: 384, sec. con núm. de ident.: 363, o sec. con núm. de ident.: 364.

El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígenos del mismo, puede unirse preferiblemente a una región del dominio extracelular ROR1, y por lo tanto unirse a células con expresión superficial de ROR1.

El VHH anti-ROR1 (nanocuerpo), anticuerpos de cadena pesada, y/o fragmentos de unión al antígeno de estos, o polipéptidos que contienen el VHH anti-ROR1 o las CDR de estos, como se describe anteriormente, pueden derivarse de cualquier especie por medios recombinantes. Por ejemplo, los VHH, los anticuerpos de cadena pesada o los fragmentos de

unión al antígeno pueden ser de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovino, pollo, conejo, camélido, burro, humano o versiones quiméricas de estos. Particularmente, el VHH, anticuerpos de cadena pesada o fragmentos de unión a antígenos pueden ser camélidos o versión humanizada de los mismos. Para usar en la administración a humanos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que no se derivan de humanos pueden alterarse genética o estructuralmente para ser menos antigénicos después de la administración al paciente humano.

También se proporcionan secuencias polinucleotídicas que codifican el VHH anti-ROR1 desvelado, los anticuerpos de cadena pesada anti-ROR1 divulgados y/o los polipéptidos divulgados que contienen el VHH anti-ROR1 o CDR de los mismos. Por ejemplo, los vectores que codifican la secuencia de 2A11, 5A1, o versiones humanizadas de 2A11 o 5A1 pueden expresarse en diversos tipos celulares compatibles con la transfección, sin limitarse a células de camello o células humanas. Además, los vectores que codifican cualquiera de las secuencias señaladas en la Tabla 14 pueden expresarse en diversos tipos de células compatibles con transfección, sin limitarse a células de camello o células humanas. Se proporcionan, además, vectores que comprenden los polinucleótidos. Los vectores pueden ser vectores de expresión, tales como vectores de expresión recombinantes. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero no se limitan a, secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador), marcadores de selección y señales de poliadenilación. Los vectores para transformar una amplia variedad de células huésped se conocen bien e incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), así como además otros vectores bacterianos, de levaduras y virales. Además, se describen células que expresan y que son capaces de expresar los vectores descritos. Estas células pueden ser de mamífero (tales como células 293F, células CHO), células de

insecto (tales como Sf7), células de levadura, células de plantas o células bacterianas (tal como E. coli). Además, los anticuerpos descritos pueden producirse por células hibridomas.

Anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos

También se describen en la presente anticuerpos multiespecíficos (que incluyen biespecíficos o triespecíficos), o fragmentos multiespecíficos de unión a antígenos de estos, que se unen a al menos ROR1 y CD3 (anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3), o se unen a al menos ROR1 y un receptor de activación expresado en una célula inmunitaria (que incluyen, pero no se limitan a, CD3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, NKp46, y NKG2D). En diversas modalidades, se proporcionan anticuerpos biespecíficos aislados, o fragmentos biespecíficos de unión a antígenos de estos, que se unen a ROR1 y CD3 (anticuerpos biespecíficos anti-ROR1/anti-CD3).

En diversas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 tienen al menos un primer sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a ROR1 (brazo ROR1) y un segundo sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a CD3 (brazo CD3). Los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 ilustrativos de estas modalidades se muestran en las Figuras 58A y 58E.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 tienen al menos un primer brazo que es específico de ROR1 y un segundo brazo que es biespecífico, en donde el primer brazo que es específico de ROR1 comprende un primer sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1, y el segundo brazo que es biespecífico comprende un sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a CD3 y un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1. Los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 ilustrativos de estas modalidades se muestran en las Figuras 58B y 58C.

En diversas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKG2D tienen al menos un primer sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a ROR1 (brazo ROR1) y un segundo sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a NKG2D (brazo NKG2D).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKG2D tienen al menos un primer brazo que es específico de ROR1 y un segundo brazo que es biespecífico, en donde el primer brazo que es específico de ROR1 comprende un primer sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1, y el segundo brazo que es biespecífico comprende un sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a NKG2D y un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1.

En diversas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD16 tienen al menos un primer sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a ROR1 (brazo ROR1) y un segundo sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a CD16 (brazo CD16).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD16 tienen al menos un primer brazo que es específico de ROR1 y un segundo brazo que es biespecífico, en donde el primer brazo que es específico de ROR1 comprende un primer sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1, y el segundo brazo que es biespecífico comprende un sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a CD16 y un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1.

En diversas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKp46 tienen al menos un primer sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a ROR1 (brazo ROR1) y un segundo sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a NKp46 (brazo NKp46).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKp46 tienen al menos un primer brazo que es específico de ROR1 y un segundo brazo que es biespecífico, en donde el primer brazo que es específico de ROR1 comprende un primer sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1, y el segundo brazo que es biespecífico comprende un sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a NKp46 y un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1.

En modalidades adicionales, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos, que contienen al menos un sitio de unión a ROR1, al menos un sitio de unión a CD3, y un dominio Fc de una cadena pesada de Ig, y opcionalmente un dominio bisagra de la cadena pesada de Ig. La cadena pesada de Ig puede ser una cualquiera de los isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulina (Ig) de cuatro cadenas, así como el isotipo IgY que generalmente se encuentra en el suero de gallina o pavo y la yema de huevo de gallina o pavo. Preferentemente, la cadena pesada de Ig es una cadena pesada IgG, que puede ser cualquiera de las subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD3 tienen al menos (1) un primer sitio de unión a antígenos específico para ROR1, (2) un segundo sitio de unión a antígenos al menos específico para CD3, o un sitio de unión a antígenos biespecífico para ROR1 y CD3, y (3) los dominios bisagra y Fc de dos o más cadenas de Ig, que pueden dimerizarse o multimerizarse, en donde al menos una cadena pesada de la Ig puede comprender además un sitio de unión al antígeno específico para ROR1, preferentemente en el extremo C de la cadena pesada de Ig.

Por lo tanto, en otras modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKG2D tienen al menos (1) un primer sitio de unión a antígenos específico para ROR1, (2) un

segundo sitio de unión a antígenos al menos específico para NKG2D, o un sitio de unión a antígenos biespecífico para ROR1 y NKG2D, y (3) los dominios bisagra y Fc de dos o más cadenas de Ig, que pueden dimerizarse o multimerizarse, en donde al menos una cadena pesada de la Ig puede comprender además un sitio de unión al antígeno específico para ROR1, preferentemente en el extremo C de la cadena pesada de Ig.

Por lo tanto, en otras modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-CD16 tienen al menos (1) un primer sitio de unión a antígenos específico para ROR1, (2) un segundo sitio de unión a antígenos al menos específico para CD16, o un sitio de unión a antígenos biespecífico para ROR1 y CD16, y (3) los dominios bisagra y Fc de dos o más cadenas de Ig, que pueden dimerizarse o multimerizarse, en donde al menos una cadena pesada de la Ig puede comprender además un sitio de unión al antígeno específico para ROR1, preferentemente en el extremo C de la cadena pesada de Ig.

Por lo tanto, en otras modalidades, los anticuerpos anti-ROR1/anti-NKp46 tienen al menos (1) un primer sitio de unión a antígenos específico para ROR1, (2) un segundo sitio de unión a antígenos al menos específico para NKp46, o un sitio de unión a antígenos biespecífico para ROR1 y NKp46, y (3) los dominios bisagra y Fc de dos o más cadenas de Ig, que pueden dimerizarse o multimerizarse, en donde al menos una cadena pesada de la Ig puede comprender además un sitio de unión al antígeno específico para ROR1, preferentemente en el extremo C de la cadena pesada de Ig.

Alternativamente, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos multiespecíficos de unión a antígenos de estos, que contienen al menos un sitio de unión a ROR1, al menos un sitio de unión a CD3, y una proteína de supercóntigo tal como albúmina sérica humana. Alternativamente, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos multiespecíficos de unión a antígenos de estos, que contienen al

menos un sitio de unión a ROR1, al menos un sitio de unión a NKG2D, y una proteína de supercóntigo tal como albúmina sérica humana. Alternativamente, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos multiespecíficos de unión a antígenos de estos, que contienen al menos un sitio de unión a ROR1, al menos un sitio de unión a CD16, y una proteína de supercóntigo tal como albúmina sérica humana. Alternativamente, se proporcionan anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos multiespecíficos de unión a antígenos de estos, que contienen al menos un sitio de unión a ROR1, al menos un sitio de unión a NKp46, y una proteína de supercóntigo tal como albúmina sérica humana.

Los anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos, pueden comprender:

a) un primer sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a ROR1, el primer sitio de unión a antígenos que comprende uno o más de:

2A11 (el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 331), una variante de 2A11 descrita anteriormente,

5A1 (el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 332), una variante de 5A1 descrita anteriormente (tal como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 335-339),

tres, dos o al menos uno de las CDR1 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325), CDR2 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 326), y CDR3 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 327) de 2A11,

una o más variantes de las tres, dos, o al menos una de las CDR1 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 325), CDR2 (que tiene una secuencia de

aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 326), y CDR3 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 327) de 2A11,

tres, dos o al menos uno de las CDR1 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328), CDR2 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 329), y CDR3 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 330) de 5A1, y

una o más variantes de las tres, dos, o al menos una de las CDR1 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 328), CDR2 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 329), y CDR3 (que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 330) de 5A1; y

b) un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a CD3, CD16, NKp46, o NKG2D.

En diversas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno se une inmunoespecíficamente a CD3. En diversas modalidades, el sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a NKG2D.

En otras modalidades, los anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos, pueden comprender:

a1) un primer sitio de unión a antígenos que comprende un polipéptido seleccionado de la Tabla 14, o

a2) un primer sitio de unión a antígenos que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionados de la Tabla 15A, o

a3) un primer sitio de unión a antígenos que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionados de la Tabla 15B; y

b) un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a CD3, CD16, NKp46 o NKG2D.

En diversas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno se une inmunoespecíficamente a CD3. En diversas modalidades, el sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a NKG2D.

En otras modalidades, los anticuerpos multiespecíficos aislados, o fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos, pueden comprender:

a1) un primer sitio de unión a antígenos que comprende una variante de CDR1, una variante de CDR2 y una variante de CDR3 seleccionada de la Tabla 15A, o

a2) un primer sitio de unión a antígenos que comprende una variante de CDR1, una variante de CDR2 y una variante de CDR3 seleccionada de la Tabla 15B; y

b) un segundo sitio de unión a antígenos que se une inmunoespecíficamente a CD3, CD16, NKp46 o NKG2D.

En diversas modalidades, el anticuerpo multiespecífico comprende dos o más dominios VHH, o dos o más fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA), en donde los dos o más dominios VHH son cada uno independientemente el uno o más primeros polipéptidos, en donde el uno o más primeros polipéptidos comprenden un polipéptido seleccionado de la Tabla 14.

En diversas modalidades, el anticuerpo multiespecífico comprende dos o más dominios VHH, o dos o más fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), capaces de unirse a un antígeno asociado a tumores (TAA), en donde los dos o más dominios VHH son cada uno independientemente el uno o más primeros polipéptidos, en donde el uno o más primeros polipéptidos comprenden un polipéptido que tiene una secuencia como se establece en las sec. con núms. de ident.: 335-339.

En diversas modalidades, el anticuerpo multiespecífico comprende dos o más dominios VHH, o dos o más fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), capaces de unirse a un antígeno asociado a tumor (TAA), en donde los dos o más dominios VHH son cada uno independientemente uno o más primeros polipéptidos, en donde el uno o más primeros polipéptidos comprenden un polipéptido que tiene una secuencia como se establece en las sec. con núms. de ident.: 335, 338-394.

Las variantes de CDR1, CDR2 y CDR3 son como se analizarán en la presente. En diversas modalidades, el primer sitio de unión a antígenos comprende además un FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4 seleccionados de la Tabla 15B. En diversas modalidades, el primer sitio de unión a antígenos comprende además un FWR1, FWR2, FWR3 y FWR4 de una IgG humana. En diversas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno se une inmunoespecíficamente a CD3. En diversas modalidades, el sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a NKG2D.

Los sitios de unión al antígeno adecuados pueden tener la forma de un VHH, scFv, Fab, $(Fab')_2$, uno o más CDR, o una fusión (secuencia en tándem conectada opcionalmente mediante un enlazador) de uno o más de los VHH, scFv, Fab, $(Fab')_2$, o las CDR. Los sitios de unión al antígeno adecuados que se unen inmunoespecíficamente a ROR1 incluyen cualquiera de los anticuerpos anti-ROR1 descritos anteriormente o fragmentos de unión a ROR1 de estos. Los sitios de unión a antígenos adecuados que se unen inmunoespecíficamente a CD3 pueden derivarse de anticuerpos CD3 descritos en una o más publicaciones que incluyen pero no se limitan a la patente de los EE. UU. núm. 8.236.308, la solicitud de patente de los EE. UU. núm. 2010/0260668, 2013/0018174, 2012/0321626, 2013/0060011, 2013/0058936, 2013/0078249, y 2013/0058937.

En algunas modalidades, el sitio de unión a antígenos de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente se conecta a una región constante de cadena pesada de Ig que contiene una mutación. En algunos aspectos, las mutaciones "botón en ojal" (KiH) están presentes en los dominios CH3 de dos brazos (o cadenas) de regiones constantes de cadena pesada de Ig, de manera que los dos pueden heterodimerizarse. Esta característica estructural en los brazos polipeptídicos permite la unión de dos semianticuerpos (p. ej., heterodímero Fc; y dominios VH–CH y VL–CL). Por ejemplo, un heteromultímero (que incluye un heterodímero) puede comprender un primer polipéptido y un segundo polipéptido que comprende cada uno un dominio CH3, en donde los polipéptidos se encuentran en una interfaz diseñada genéticamente dentro del dominio CH3, y el primer polipéptido contiene una protuberancia diseñada ("botón") en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo original, y el segundo polipéptido contiene una cavidad ("ojal") en la interfaz con al menos un residuo de contacto sustituido por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo original. En algunas modalidades, la interfaz diseñada genéticamente de un heteromultímero incluye al menos dos pares mutantes de protuberancia dentro de la cavidad. Los volúmenes y áreas superficiales accesibles de cada aminoácido se describen en *A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol*. 24: 107-123, 1972 y C. Chothia, *J. Mol. Biol*. 105: 1-14, 1975. Por ejemplo, los residuos de importación para la formación de una protuberancia pueden ser arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W); y preferentemente el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un pequeño volumen de cadena lateral, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Como otro ejemplo, los residuos de importación para la formación de una cavidad pueden ser alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V); y preferentemente el residuo original

para la formación de la cavidad tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Por ejemplo, una mutación T366W en el dominio CH3 para la cadena de "botón" /protuberancia, y una mutación T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 para la cadena "ojal" /cavidad. Adicionalmente, la configuración KiH puede combinarse con mutaciones adicionales para permitir el enlace disulfuro S-S entre las dos cadenas.

En algunas modalidades, los dos o más brazos (o cadenas) de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden contener otro diseño de complementariedad estérica simétrica a asimétrica (p. ej., HA-TF, ZW1), una interacción de intercambio de carga a carga (DD-KK), un intercambio de complementariedad carga-estérico más una interacción electrostática adicional de largo alcance (p. ej., EW-RVT), o un diseño de intercambio de cadena de isotipo (p. ej., dominio diseñado para intercambio de cadenas (SEED, por sus siglas en inglés)), o Xmab, 7.8.60, dirección electrostática, A107 o Duobody, para formar heterodímeros/heteromultímeros. Se observa una descripción adicional de estas configuraciones y mutaciones/residuos ilustrativos en, por ejemplo, *Front Immunol.* 2016; 7: 394.

Otras modalidades proporcionan que un anticuerpo multiespecífico puede comprender además uno o más enlazadores, tales como enlazadores de aminoácidos. En algunas modalidades, al menos un enlazador está entre el Fc o la HSA y al menos uno de los sitios de unión a antígenos. En algunas modalidades, al menos un enlazador se posiciona entre dos sitios de unión a antígenos.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG "botón en ojal" con (2) un Fab específico para CD3 en el extremo N de la cadena de "botón" (o la cadena "orificio") del dominio Fc de IgG y (3) dos VHH específicos para ROR1 fusionados en tándem, opcionalmente conectados mediante un enlazador (VHH-enlazador-

VHH), en el extremo N de la cadena de “retención” (o la “cadena de botón”, respectivamente) del dominio Fc de IgG. Los dos VHH específicos para ROR1 fusionados en tándem en la presente pueden ser dos 2A11, dos 5A1, o uno 2A11 y uno 5A1, dos variantes de 2A11, o dos variantes de 5A1. Los anticuerpos multiespecíficos ilustrativos de estas modalidades incluyen proteínas de fusión de FUSE-211, y FUSE-393, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla 8. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG “botón en ojal” con (2) un Fab específico para CD3 (que comprende un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesadas específicas para CD3 y la cadena ligera específica para CD3) en el extremo N de la cadena de “botón” (o la cadena de “orificio”) del dominio Fc de IgG, (3) un primer VHH específico para ROR1 fusionado al extremo N de la cadena de “orificio” (o la cadena de “botón”, respectivamente), y (4) un segundo VHH específico para ROR1 fusionado al extremo C de la cadena ligera específica para CD3. El primer y segundo VHH específico para ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de 2A11, 5A1, o una variante de 2A11 o una variante de 5A1. Los anticuerpos multiespecíficos ilustrativos de estas modalidades incluyen la proteína de fusión FUSE-394, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Tabla 8. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGNFGNSYV SWFAYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (sec. con núm. de ident.: 532) es una cadena pesada ilustrativa de un Fab anti-CD3, y la sec. con núm. de ident.: 479 es una cadena ligera ilustrativa de un Fab anti-CD3. En diversas

modalidades, el Fab anti-CD3 es constante y a veces está presente en el Fc del botón y a veces está presente en el Fc del orificio.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG "botón en ojal" con (2) un Fab específico para CD3 (que comprende un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesadas específicas para CD3 y la cadena ligera específica para CD3) fusionado en el N-terminal de la cadena de "botón" (o la cadena de "orificio") del dominio Fc de IgG, (3) dos VHH específicos para ROR1 fusionados en tándem al extremo N de la cadena de "orificio" (o la cadena de "botón", respectivamente) del dominio Fc de IgG, y (4) un tercer VHH específico fusionado al extremo C de la cadena ligera específica de CD3. Los dos VHH específicos para ROR1 fusionados en tándem y el tercer VHH específico para ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, cada uno seleccionado independientemente entre 2A11, 5A1 o una variante de 2A11 o una variante de 5A1. En otras modalidades, el primer y segundo VHH específico de ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de la Tabla 14. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG "botón en ojal" con (2) un Fab específico para CD3 fusionado al extremo N de la cadena de "botón" (o la cadena de "orificio") de los dominios Fc de IgG, (3) un primer VHH específico para ROR1 fusionado al extremo N de la cadena de "orificio" (o la cadena de "clave", respectivamente) de los dominios Fc de IgG, y (4) un segundo VHH específico para ROR1 fusionado al extremo N de la cadena ligera específica para CD3 del Fab. El primer y segundo VHH específico para ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de 2A11, 5A1, o una variante de 2A11 o una variante de 5A1. En otras modalidades, el primer y segundo VHH específico de ROR1 pueden ser

idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de la Tabla 14. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG "botón en ojal" con (2) un Fab específico para CD3 fusionado al extremo N de la cadena de "botón" (o la cadena de "orificio") de los dominios Fc de IgG, (3) un primer scFv específico para ROR1 fusionado al extremo N de la cadena de "orificio" (o la cadena de "botón", respectivamente) de los dominios Fc de IgG, y (4) un segundo scFv específico para ROR1 fusionado al extremo C del "orificio" (o la cadena de "botón", respectivamente) de los dominios Fc de IgG. El primer y segundo scFv específico de ROR1 pueden ser idénticos o diferentes. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

En algunas modalidades, un anticuerpo multiespecífico comprende (1) un dominio Fc de IgG "botón en ojal" con (2) un Fab específico para CD3 fusionado al extremo N de la cadena de "botón" (o la cadena de "orificio") de los dominios Fc de IgG, (3) un primer VHH específico para ROR1 fusionado al extremo N de la cadena de "botón" (o la cadena de "orificio", respectivamente) de los dominios Fc de IgG, y (4) un segundo VHH específico para ROR1 fusionado al extremo C de la cadena ligera específica para CD3 del Fab. El primer y segundo VHH específico para ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de 2A11, 5A1, o una variante de 2A11 o una variante de 5A1. En otras modalidades, el primer y segundo VHH específico para ROR1 pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados independientemente de la Tabla 147. En algunas modalidades, el dominio Fc se selecciona de la Tabla 17A.

En diversas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos descritos (p. ej., al menos con inmunoespecificidad hacia ROR1 y CD3) pueden unirse a ROR1 con una afinidad de unión aparente que generalmente aumenta (es decir, correspondiente a una EC_{50} de

unión, una concentración del anticuerpo que da como resultado un 50 % de la unión máxima a una determinada población de células diana que expresan ROR1, que generalmente disminuye) con un aumento en la densidad de la superficie celular de ROR1 de las células diana. Es decir, los anticuerpos multiespecíficos pueden tener en diversas modalidades una mayor avidez de unión hacia las células que expresan ROR1 con un nivel de expresión mayor de ROR1 que hacia las células con un nivel de expresión menor o cero de ROR1.

En diversas modalidades, un sistema que comprende los anticuerpos multiespecíficos descritos (p. ej., al menos con inmunoespecificidad hacia ROR1 y CD3) y una población de células efectoras inmunitarias CD3 positivas o una fracción CD3 positiva de células mononucleares o una población de células mononucleares que comprende una fracción CD3 positiva puede inducir citotoxicidad contra células positivas para ROR1, es decir, células tumorales que expresan ROR1.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a CD3 pueden unirse a CD3-épsilon en células T humanas primarias y/o células T de cynomolgus primarias. En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos que comprenden un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a CD3 activan la citotoxicidad de las células T CD3+ humanas primarias y/o las células T CD3+ de cynomolgus primarias. En general, las células T CD8+ son citotóxicas mientras que las células T CD4+ secretan citocinas primarias para ‘‘ayudar’’ a las células T CD8+. En algunos casos, también se ha reportado que las células T CD4+ son citotóxicas (David Oh, et al., *Immunity*, volumen 54, número 12, 14 de diciembre de 2021, páginas 2701-2711). La citotoxicidad generalmente se asocia con la destrucción de células diana mediante la vía de perforina/granzima que activa la caspasa 3 y la posterior apoptosis de las células diana. Otros mecanismos de destrucción

del objetivo incluyen, pero no se limitan a, la activación de la expresión de Fas por parte de las células objetivo, TNF-R y DR4. Los TCE inducen directamente citotoxicidad y también pueden inducir indirectamente los otros mecanismos dichos de destrucción de objetivos (Sandra Ross et al., *PLoS One*, 24 de ago de 2017;12(8):e0183390).

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos descritos pueden inducir citotoxicidad contra células positivas para ROR1, es decir, células tumorales que expresan ROR1, en presencia de una población de células efectoras inmunitarias CD3 positivas, una fracción CD3 positiva de células mononucleares, o una población de células mononucleares que comprende una fracción CD3 positiva. En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos descritos pueden inducir una mayor citotoxicidad contra células ROR1 positivas que tienen un nivel de expresión más alto de ROR1 que contra las células ROR1 negativas o las células ROR1 positivas que tienen un menor nivel de expresión de ROR1, cuando están en presencia de una población de células efectoras inmunitarias CD3 positivas, una fracción CD3 positiva de células mononucleares, o una población de células mononucleares que comprende una fracción CD3 positiva.

Otras modalidades prevén que en lugar de, o además de, tener especificidad CD3, un anticuerpo multiespecífico de la invención puede tener una especificidad contra otro receptor de activación y/o receptor coestimulador y/o receptor de coactivación típicamente expresado en una célula inmunitaria, además de tener una especificidad contra ROR1. Por ejemplo, un receptor de activación puede expresarse en una célula T, de manera que el anticuerpo multiespecífico puede ser un reclutador de células T que se une inmunoespecíficamente al receptor de activación en el linfocito T y activa la citotoxicidad o una propiedad de expresión de citocinas de la célula T. Alternativamente, se puede expresar un receptor de activación en una célula destructora natural (NK), de manera que el anticuerpo

multiespecífico puede ser un reclutador de células NK que se une inmunoespecíficamente al receptor de activación en la célula NK y activa la citotoxicidad de la célula NK. Adicionalmente, un receptor de activación puede expresarse en múltiples células inmunitarias tales como células T, células NK y células dendríticas (DC). Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos pueden ser reclutadores de células inmunitarias trifuncionales, o anticuerpos triespecíficos, que se unen a dos o más receptores de activación (tales como dos o más de CD3, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, NKp46, CD137 y CD40), induciendo de esta manera la actividad de las células inmunitarias, y también se unen a células positivas para ROR1, dirigiendo de esta manera la actividad de las células inmunitarias hacia las células positivas para ROR.

Los receptores de activación ilustrativos que pueden unirse inmunoespecíficamente por un sitio de unión a antígenos de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, CD16, γ9 TCR, δ2 TCR o δ1 TCR, NKp46, CD137, CD40 o NKG2D. Los fragmentos de unión a antígenos ilustrativos contra dichos receptores de activación y/o coestimulación y/o coactivación incluyen scFv, VH, VL, VHH, Fab, etc., descritos en diversas publicaciones, que incluyen la patente de los EE. UU. núm. 9.035.026 y Gauthier et al., 2019, *Cell* 177, 1701–1713. Los anticuerpos y/o fragmentos adicionales de unión a antígenos ejemplares contra dichos receptores de activación y/o coestimuladores y/o coactivación incluyen los señalados en la Tabla 18. De los enumerados como anticuerpos de unión al antígeno, sus regiones VHH o Fab se pueden usar como sitio de unión al antígeno de los anticuerpos multiespecíficos descritos en la presente.

Las modalidades adicionales proporcionan conjugados de fármaco-anticuerpo (ADC, por sus siglas en inglés) específicos para ROR1, que comprenden un anticuerpo anti-ROR1, o un fragmento de unión a ROR1 de este, descrito en la presente, y una unidad de fármaco que se conjuga o une al anticuerpo anti-ROR1 o fragmento de unión a ROR1 de

este. Opcionalmente, se posiciona una unidad de enlace entre el anticuerpo anti-ROR1 o su fragmento de unión a ROR1 de este y la unidad de fármaco, y la unidad de enlace puede ser un enlazador de aminoácido o un enlazador de entidad química. Las unidades farmacológicas ejemplares pueden ser agentes citotóxicos tales como fármacos antitumorales o agentes de quimioterapia, incluyendo moléculas pequeñas así como ARNip.

En modalidades adicionales, el anticuerpo multiespecífico, el fragmento de unión al antígeno multiespecífico o la composición que lo comprende también pueden contener un agente/terapia terapéutica adicional, según sea necesario para el trastorno particular que se esté tratando. Preferentemente, el anticuerpo biespecífico o el fragmento de unión al antígeno multiespecífico de este y el agente terapéutico adicional tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. En algunas modalidades, el agente/terapia terapéutica adicional es un agente quimioterapéutico o una radioterapia. La administración combinada de los anticuerpos multiespecíficos descritos o de los fragmentos de unión a antígenos multiespecíficos de estos y el otro agente terapéutico puede ser simultáneo, separado o secuencial, en cualquier orden. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según convenga.

La dosis del anticuerpo multiespecífico, del fragmento de unión al antígeno multiespecífico, o de la composición que lo comprende depende del efecto deseado, de la duración del tratamiento y de la vía de administración usada. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico descrito en la presente incluye una o más dosis, en donde una dosis está en el rango de aproximadamente 10-50 mg, 50-100 mg, 100-150 mg, 150-200 mg, 100-200 mg, 200-300 mg, 300-400 mg, 400-500 mg, 500-600 mg, 600-700 mg, 700-800 mg, 800-900 mg, 900-1000 mg, 1000-1100 mg, 1100-1200 mg, 1200-1300 mg, 1300-1400 mg, 1400-1500 mg, 1500-1600 mg, 1600-1700 mg,

1700-1800 mg, 1800-1900 mg, 1900-2000 mg, 2000-2100 mg, 2100-2200 mg, 2200-2300 mg, 2300-2400 mg, 2400-2500 mg, 2500-2600 mg, 2600-2700 mg, 2700-2800 mg, 2800-2900 mg o 2900-3000 mg. En otra modalidad, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo multiespecífico descrito en la presente incluye una o más dosis, en donde una dosis está en el rango de 0,001-0,005 mg/kg, 0,005-0,01 mg/kg, 0,01-0,02 mg/kg, 0,02-0,04 mg/kg, 0,04-0,06 mg/kg, 0,06-0,08 mg/kg, 0,08-1 mg/kg, 1-5 mg/kg, 5-10 mg/kg, 10-15 mg/kg, 15-20 mg/kg, 20-25 mg/kg, 25-30 mg/kg, 30-35 mg/kg, 35-40 mg/kg, 40-45 mg/kg, 45-50 mg/kg, 10-50 mg/kg, 50-100 mg/kg, 100-150 mg/kg, 150-200 mg/kg, 100-200 mg/kg, 200-300 mg/kg, 300-400 mg/kg, 400-500 mg/kg, 500-600 mg/kg, 600-700 mg/kg, 700-800 mg/kg, 800-900 mg/kg, 900-1000 mg/kg, 1000-1100 mg/kg, 1100-1200 mg/kg, 1200-1300 mg/kg, 1300-1400 mg/kg, 1400-1500 mg/kg, 1500-1600 mg/kg, 1600-1700 mg/kg, 1700-1800 mg/kg, 1800-1900 mg/kg, 1900-2000 mg/kg, 2000-2100 mg/kg, 2100-2200 mg/kg, 2200-2300 mg/kg, 2300-2400 mg/kg, 2400-2500 mg/kg, 2500-2600 mg/kg, 2600-2700 mg/kg, 2700-2800 mg/kg, 2800-2900 mg/kg o 2900-3000 mg/kg. En algunas modalidades, una cantidad terapéuticamente efectiva incluye dos, tres o más dosis administradas en una frecuencia diaria, semanal, quincenal, mensual, trimestral o anual; o continuar cuando la evaluación de la gravedad de la enfermedad muestre una mejoría, en comparación con antes de la última dosis, hasta que la enfermedad se trate con éxito o el sujeto no presente síntomas ni signos de la enfermedad.

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de proteínas de fusión ilustrativas. El polipéptido 1 comprende el ‘orificio’ del Fc de KiH; el polipéptido 2 comprende el ‘botón’ del Fc de KiH; y el polipéptido 3 comprende la cadena ligera. El VHH puede incluirse en el polipéptido 1, polipéptido 2 y/o polipéptido 3 con un enlazador entre ellos. En esta tabla el dominio anti-CD3 se encuentra en el N-terminal del Fc de botón o Fc de orificio.

	Polipéptido 1	Polipéptido 2	Polipéptido 3
FUSE-211	(sec. con núm. de ident.: 481)	(sec. con núm. de ident.: 478)	(sec. con núm. de ident.: 479)
FUSE-393	(sec. con núm. de ident.: 482)	(sec. con núm. de ident.: 478)	(sec. con núm. de ident.: 479)
FUSE-394	(sec. con núm. de ident.: 483)	(sec. con núm. de ident.: 478)	(sec. con núm. de ident.: 480)
FUSE-399	(sec. con núm. de ident.: 484)	(sec. con núm. de ident.: 478)	(sec. con núm. de ident.: 479)
FUSE-489	(sec. con núm. de ident.: 477)	(sec. con núm. de ident.: 485)	(sec. con núm. de ident.: 486)
FUSE-494	(sec. con núm. de ident.: 477)	(sec. con núm. de ident.: 487)	(sec. con núm. de ident.: 488)
FUSE-497	(sec. con núm. de ident.: 477)	(sec. con núm. de ident.: 489)	(sec. con núm. de ident.: 490)
FUSE-498	(sec. con núm. de ident.: 477)	(sec. con núm. de ident.: 491)	(sec. con núm. de ident.: 492)
FUSE-536	(sec. con núm. de ident.: 477)	(sec. con núm. de ident.: 493)	(sec. con núm. de ident.: 494)

Tabla 9. Secuencias polinucleotídicas que codifican las proteínas de fusión correspondientes a las de la Tabla 8.

	Codificación Polipéptido 1	Codificación Polipéptido 2	Codificación Polipéptido 3
FUSE-211	(sec. con núm. de ident.: 499)	(sec. con núm. de ident.: 496)	(sec. con núm. de ident.: 497)
FUSE-393	(sec. con núm. de ident.: 500)	(sec. con núm. de ident.: 496)	(sec. con núm. de ident.: 497)
FUSE-394	(sec. con núm. de ident.: 501)	(sec. con núm. de ident.: 496)	(sec. con núm. de ident.: 498)
FUSE-399	(sec. con núm. de ident.: 502)	(sec. con núm. de ident.: 496)	(sec. con núm. de ident.: 497)
FUSE-489	(sec. con núm. de ident.: 495)	(sec. con núm. de ident.: 503)	(sec. con núm. de ident.: 504)
FUSE-494	(sec. con núm. de ident.: 495)	(sec. con núm. de ident.: 505)	(sec. con núm. de ident.: 506)
FUSE-497	(sec. con núm. de ident.: 495)	(sec. con núm. de ident.: 507)	(sec. con núm. de ident.: 508)
FUSE-498	(sec. con núm. de ident.: 495)	(sec. con núm. de ident.: 509)	(sec. con núm. de ident.: 510)
FUSE-536	(sec. con núm. de ident.: 495)	(sec. con núm. de ident.: 511)	(sec. con núm. de ident.: 512)

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos de VHH ilustrativo.

2A11	QVQLQESGGGSVPAGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKEREEVASMSIRSGRTYYSDS VKGRFTISQDGSKNTLYLQLNSLKAEDTALYYCAAAYGGSRCVYNYRGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 331)
5A1	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSV KGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 332)
5A1-H1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELASISTGTGNTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 335)

5A1-H2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWVRQAPGKEREEVATISTGTGNTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 336)
5A1-H3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVSTISTGTGNTYYADSV KGRFTISQDKSKNTLYLRMNSLRAEDTALYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 337)
5A1-H4	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSVK GRFTISRDNSRNTLYLQMKTLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 338)
5A1-H5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSVK GRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 339)
2A11-CV	QVQLQESGGGSVPAGGSLRLSCAASGSTYSANvMGWFRQAPGKEREEVASMSIRSGRTYYSDS VKGRFTISQDGSKNTLYLQLNSLKAEDTALYYCAAAYGGSRvVYNYRGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 513)
5A1-CV	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGYTNRLKvMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSV KGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAADVRPDGTTvHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 514)

Tabla 11. Secuencias polinucleotídicas que codificaban el VHH mostradas en la Tabla 10.

2A11	(sec. con núm. de ident.: 333)
5A1	(sec. con núm. de ident.: 334)
5A1-H1	(sec. con núm. de ident.: 515)
5A1-H2	(sec. con núm. de ident.: 516)
5A1-H3	(sec. con núm. de ident.: 517)
5A1-H4	(sec. con núm. de ident.: 518)
5A1-H5	(sec. con núm. de ident.: 519)
2A11-CV	(sec. con núm. de ident.: 520)
5A1-CV	(sec. con núm. de ident.: 521)

Tabla 12. Rendimiento de expresiones como se demuestra en Ejemplos para algunas proteínas de fusión.

	Rendimiento
FUSE-211	360 mg/l
FUSE-393	458 mg/l
FUSE-394	455 mg/l
FUSE-489	253 ml/l
FUSE-497	213 mg/l

FUSE-498	117 mg/l

Tabla 13. Temperatura de fusión (Tm) de proteínas de fusión ilustrativas.

	Tm
FUSE-210	70,5 °C
FUSE-211	70,4 °C
FUSE-394	70,6 °C

Tabla 14. Secuencias de VHH ilustrativas adicionales usadas de acuerdo con diversas modalidades de la invención. Todas las secuencias son secuencias humanizadas excepto la sec. con núm. de ident.: 7 y la sec. con núm. de ident.: 8.

	Región marco	**VHH**
FUSE-112	camello	QVQLQESGGGSVPAGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKEREEV ASMSIRSGRTYYSDSVKGRFTISQDGSKNTLYLQLNSLKAEDTALYYCAAAY GGSRCVYNYRGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 331)
FUSE-179	camello	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIA TISTGTGNTYYADSVKGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAAD VRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 332)
FUSE-488	camello	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIA TISTGTGNTYYADSVKGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAAD VRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 332)
FUSE-497	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAT ISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMKTLRAEDTAVYYCAADVR PDGTTCHYNSWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 338)
FUSE-498	Ab de fusión	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAT ISTGTGNTYYADSVKGRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVR PDGTTCHYNSGGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 339)
FUSE-524	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELASI STGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRP DGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 335)
FUSE-525	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELvA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 340)
FUSE-537	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKERELAS MSIRSGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 341)
FUSE-559	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAS ISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDKSRNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAADVR PHGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 342)

FUSE-560	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKERELAS MSIRSGRTYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 343)
FUSE-561	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKERELAS MSIRSGRTYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 344)
FUSE-562	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKERELAS MSIRSGRTYYSDSVKGRFTISRDGSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 345)
FUSE-563	Ab de fusión	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAT ISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVR PDGTTCHYNSWGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 346)
FUSE-569	Ab de fusión	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELAS ISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAADVR PDGTTCHYNSWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 347)
FUSE-570	Ab de fusión	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIA TISSGTGNTYYADSVKGRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGMYYCAAD VRPDGTTCHYNSGGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 348)
FUSE-589	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTYSANCMGWFRQAPGKERELAS MSIRSGRTYYADSVKGRFTISQDGSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 349)
FUSE-590	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIA SISTGTGNTYYSDSVKGRFTISRDKSRNTLYLQMKSLRAEDTAVYYCAADV RPRGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 350)
FUSE-591	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAT ISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVR PKGTTCHYNKRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 351)
FUSE-592	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAADVR PRGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 352)
FUSE-593	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQRGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIA SISTGTGNTYYSDSVKGRFTISRDKSRNTLYLQLNSLKAEDTAVYYCAADVR PKGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 353)
FUSE-594	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAS ISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVR PRGTTCHYNSRGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 354)
FUSE-595	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAT ISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDKSRNTLYLQMKSLKAEDTAVYYCAADVR PKGTTCHYNSRGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 355)
FUSE-596	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAS ISTGTGNTYYSDSVKGRFTISRDKSRNTLYLKLKSLRAEDTAVYYCAADVRP DGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 356)
FUSE-597	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELASI STGTGNTYYADSVKGRFTISRDGSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRP DGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 357)
FUSE-598	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELASI STGTGNTYYADSVKGRFTISQDGSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRP DGTTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 358)

FUSE-654	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLkLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIASI STGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRP RGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 359)
FUSE-655	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIAS ISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQMsSLKAEDTAVYYCAADVRP RGTTCHYNSRGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 360)
FUSE-661	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSQRSANCMGWFRQAPGKDRELA SMSIRSGRTYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMSSLKAEDTAVYYCAAAY GGSRCVYNYRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 361)
FUSE-662	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVGYSANCMGWFRQAPGKDRELAS MSIRSGRTYYADSVKGRFTISRDSSKNTLYLQMSSLKAEDTAVYYCAAAYG GSRCVYNYRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 362)
F22158101/h5 A1-BI-001	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGFTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 363)
F22158102/h5 A1-BI-002	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 364)
F22158103/h5 A1-BI-003	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNKRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 365)
F22158104/h5 A1-BI-004	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 366)
F22158105/h5 A1-BI-005	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGFTCHYNKRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 367)
F22158106/h5 A1-BI-006	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGRTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 368)
F22158107/h5 A1-BI-007	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGRTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 369)
F22158108/h5 A1-BI-008	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGRTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 370)
F22158109/h5 A1-BI-009	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNSYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGRTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 371)
F22158110/h5 A1-BI-010	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPDGRTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 372)
F22158111/h5 A1-BI-011	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPFGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 373)
F22158112/h5 A1-BI-012	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVA SISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADV RPFGRTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 374)

F22158113/h5A1-BI-013	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPFGTTCHYNKRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 375)
F22158114/h5A1-BI-014	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPFGRTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 376)
F22158115/h5A1-BI-015	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPFGTTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 377)
F22158116/h5A1-BI-016	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGTTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 378)
F22158117/h5A1-BI-017	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGTTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 379)
F22158118/h5A1-BI-018	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGRTCHYNSRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 380)
F22158119/h5A1-BI-019	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGRTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 381)
F22158120/h5A1-BI-020	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGTTCHYNKRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 382)
F22158121/h5A1-BI-021	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRIKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNAYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPHGTTCHYNKRGQGTLVTVS (sec. con núm. de ident.: 383)
BI-HU9-HK h5A1	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKERELVASISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 340)
BI-HU9-HK-1 h5A1	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEVASISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLKAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSRGQGTLVTVSS (sec. con núm. de ident.: 384)
BI-HU9-VH9 h5A1	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMKTLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 338)
BI-HU9-VH9-1 h5A1	GenBank AWH66715	EVQLLESGGGLVPRGGSLRLSCTASGYTNRLKCMGWFRQAPGKEREEIATISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSRNTLYLQMKTLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTQVTVS (sec. con núm. de ident.: 385)
BI-HU9-VHH11 h5A1-Fc	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRLKCMGWFRQAPGKGLEEVATISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTTVTVSS (sec. con núm. de ident.: 386)
BI-HU9-VHH12 h5A1-Fc	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEVATISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 387)
BI-HU9-VHH13 h5A1	IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEVATISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADVRPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 388)

BI-HU9-VHH21 h5A1	IGHV3-30	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRLKCMGWFRQAPGKGLEEVA TISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 389)
BI-HU9-VHH22 h5A1	IGHV3-30	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEV ATISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVSS (sec. con núm. de ident.: 390)
BI-HU9-VHH23 h5A1	IGHV3-30	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEV ATISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 391)
BI-HU9-VHH31 h5A1	IGHV3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVRLKCMGWFRQAPGKGLEEVA TISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 392)
BI-HU9-VHH32 h5A1	IGHV3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEVA TISTGTGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVS (sec. con núm. de ident.: 393)
BI-HU9-VHH33 h5A1	IGHV3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTNRLKCMGWFRQAPGKGLEEVA TISTGTGNTYYADSVKGRFTISQDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADV RPDGTTCHYNSWGQGTTVTVSS (sec. con núm. de ident.: 394)

Tabla 15A CDR

	CDR1	**CDR2**	**CDR3**
FUSE-112	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	SIRSGR (sec. con núm. de ident.: 400)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-179	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-488	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-497	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-498	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-524	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-525	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-537	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-559	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 404)
FUSE-560	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-561	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)

FUSE-562	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-563	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-569	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-570	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	SSGTGN (sec. con núm. de ident.: 403)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-589	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-590	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPRGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 405)
FUSE-591	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPKGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 406)
FUSE-592	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPRGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 405)
FUSE-593	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPKGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 407)
FUSE-594	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPRGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 405)
FUSE-595	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPKGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 407)
FUSE-596	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-597	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-598	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
FUSE-654	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPRGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 405)
FUSE-655	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPRGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 405)
FUSE-661	GSQRSANC (sec. con núm. de ident.: 395)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
FUSE-662	GVGYSANC (sec. con núm. de ident.: 396)	IRSGR (sec. con núm. de ident.: 402)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)
F22158101/h5A1-BI-001	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGFTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 408)
F22158102/h5A1-BI-002	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 409)
F22158103/h5A1-BI-003	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 409)
F22158104/h5A1-BI-004	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 409)

F22158105/h5A1-BI-005	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGFTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 410)
F22158106/h5A1-BI-006	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)
F22158107/h5A1-BI-007	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)
F22158108/h5A1-BI-008	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)
F22158109/h5A1-BI-009	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGRTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 412)
F22158110/h5A1-BI-010	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGRTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 412)
F22158111/h5A1-BI-011	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPFGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 413)
F22158112/h5A1-BI-012	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPFGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 414)
F22158113 h5A1-BI-013	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPFGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 415)
F22158114/h5A1-BI-014	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPFGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 414)
F22158115/h5A1-BI-015	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPFGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 415)
F22158116/h5A1-BI-016	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 404)
F22158117/h5A1-BI-017	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 404)
F22158118/h5A1-BI-018	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 416)
F22158119/h5A1-BI-019	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGRTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 9416)
F22158120/h5A1-BI-020	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 417)
F22158121/h5A1-BI-021	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPHGTTCHYNK (sec. con núm. de ident.: 417)
BI-HU9-HK h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-HK-1 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VH9 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VH9-1 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH11 h5A1-Fc	GFTFRLKC (sec. con núm. de ident.: 398)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)

BI-HU9-VHH12 h5A1-Fc	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH13 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH21 h5A1	GFTFRLKC (sec. con núm. de ident.: 398)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH22 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH23 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH31 h5A1	GFTVRLKC (sec. con núm. de ident.: 399)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH32 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)
BI-HU9-VHH33 h5A1	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	STGTGN (sec. con núm. de ident.: 401)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)

Tabla 15B. Regiones del marco y algunas CDR alternativas

	FW1	**CDR1**	**FW2**	**CDR2**	**FW3**	**CDR3**	**FW4**
FUSE-112	QVQLQESGGGSVPAGGSLRLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 421)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	MGWFRQAPGKEREEVAS (sec. con núm. de ident.: 435)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YSDSVKGRFTISQDGSKNTLYLQLNSLKAEDTALYYCAA (sec. con núm. de ident.: 442)	AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327)	RGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-179	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTAS (sec. con núm. de ident.: 422)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	MGWFRQAPGKEREEIAT (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAA (sec. con núm. de ident.: 443)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	GGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 469)
FUSE-488	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLSCTAS (sec. con núm. de ident.: 422)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	MGWFRQAPGKEREEIAT (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRFTFSQDKVKNTVYLQMNTLKPDDTGMYYCAA (sec. con núm. de ident.: 443)	DVRPDGTTCHYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	GGQGTQVTVSS (sec. con núm. de ident.: 469)

FUSE-497	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIA**T (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSRN TLYLQMKTL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 444)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 470)
FUSE-498	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 424)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**EIAT** (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF T**I**SRDN**S**RN TLYLQMKTL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 444)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**G**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 469)
FUSE-524	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 445)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-525	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKERE**L**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 438)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 445)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-537	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 445)	AYGGSRCVY NY (sec. con núm. de ident.: 327)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-559	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 426)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**EIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRD**K**SRN TLYLQM**N**TL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 446)	DVRPHGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 404)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-560	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 325)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 326)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TISRD**S**SKN TLYLQMNSL	AYGGSRCVY NY	**R**GQGTLVTV SS

	(sec. con núm. de ident.: 425)		(sec. con núm. de ident.: 437)		**K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 447)	(sec. con núm. de ident.: 327)	(sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-561	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TISRD**S**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 448)	AYGGSRCVY NY (sec. con núm. de ident.: 327)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-562	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	Y**S**DSVKGRF TISRD**G**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 449)	AYGGSRCVY NY (sec. con núm. de ident.: 327)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-563	EVQLLESGG GLVQPGGSL **K**LSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 427)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**EIAT** (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**R**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 450)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTLVT VSS (sec. con núm. de ident.: 472)
FUSE-569	QVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCSAS (sec. con núm. de ident.: 428)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LAS** (sec. con núm. de ident.: 437)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RA**D**DTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 451)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**W**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 470)
FUSE-570	QVQLVESGG GLVQPGGSL RLSC**S**AS (sec. con núm. de ident.: 428)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**EIAT** (sec. con núm. de ident.: 436)	ISSGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 418)	YADSVKGRF T**F**SRDNSKN TLYLQMNSL RAEDT**GM**Y YCA**A** (sec. con núm. de ident.: 452)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**G**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 469)
FUSE-589	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LAS** (sec. con núm. de ident.: 437)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TIS**Q**D**G**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A**	AYGGSRCVY NY (sec. con núm. de ident.: 327)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)

					(sec. con núm. de ident.: 453)		
FUSE-590	EVQLLESGG GLV**Q**RGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 429)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	Y**S**DSVKGRF TISRD**K**SRN TLYLQMK**S**L RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 454)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-591	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 430)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIA**T (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQM**NS**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 455)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-592	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 430)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREE**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQ**LNS**L RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 564)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-593	EVQLLESGG GLV**Q**RGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 431)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	Y**S**DSVKGRF TISRD**K**SRN TLYLQ**LNS**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 457)	DVRPKGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 407)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-594	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQM**NS**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 455)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-595	EVQLLESGG GLV**Q**RGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 429)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIA**T (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRD**K**SRN TLYLQMK**S**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 458)	DVRPKGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 407)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)

FUSE-596	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	Y**S**DSVKGRF TISRD**K**SRN TLYL**KL**K**S**LR AEDTAVYYC A**A** (sec. con núm. de ident.: 459)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-597	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRD**G**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 460)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-598	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 437)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**G**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 461)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-654	EVQLLESGG GLVPRGGSL **k**LSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 432)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQM**NS**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 455)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-655	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIAS** (sec. con núm. de ident.: 439)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQM**sS**L **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 462)	DVRPRGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 405)	**R**GQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 468)
FUSE-661	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GSQRSANC (sec. con núm. de ident.: 395)	M**G**W**F**RQAP GK**DR**E**LA**S (sec. con núm. de ident.: 440)	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TISRD**S**SKN TLYLQM**S**SL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 463)	AYGGSRCVY NY (sec. con núm. de ident.: 327)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
FUSE-662	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	GVGYSANC (sec. con núm. de ident.: 396)	M**G**W**F**RQAP GK**DR**E**LA**S	MSIRSGRTY (sec. con núm. de ident.: 326)	YADSVKGRF TISRD**S**SKN TLYLQM**S**SL	AYGGSRCVY NY	**R**GQGTLVTV SS

	(sec. con núm. de ident.: 425)		(sec. con núm. de ident.: 440)		**K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 463)	(sec. con núm. de ident.: 327)	(sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8101/h 5A1-BI-001	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGFTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 408)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8102/h 5A1-BI-002	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 409)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8103/h 5A1-BI-003	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 409)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8104/h 5A1-BI-004	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 409)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8105/h 5A1-BI-005	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGFTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 410)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8106/h 5A1-BI-006	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A**	DVRPDGRT CHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)

					(sec. con núm. de ident.: 464)		
F2215 8107/h 5A1-BI-007	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGRT CHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8108/h 5A1-BI-008	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGRT CHYNS (sec. con núm. de ident.: 411)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8109/h 5A1-BI-009	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNSY (sec. con núm. de ident.: 420)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGRT CHYNK (sec. con núm. de ident.: 412)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8110/h 5A1-BI-010	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGRT CHYNK (sec. con núm. de ident.: 412)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8111/h 5A1-BI-011	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPFGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 413)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8112/h 5A1-BI-012	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPFGRTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 414)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)

F2215 8113/h 5A1-BI-013	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPFGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 415)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8114/h 5A1-BI-014	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPFGRTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 414)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8115/h 5A1-BI-015	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPFGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 415)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8116/h 5A1-BI-016	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPHGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 404)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8117/h 5A1-BI-017	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPHGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 404)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8118/h 5A1-BI-018	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPHGRT CHYNS (sec. con núm. de ident.: 416)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8119/h 5A1-BI-019	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS**	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL	DVRPHGRT CHYNS	**R**GQGTLVTV SS

	(sec. con núm. de ident.: 425)		(sec. con núm. de ident.: 435)		**K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	(sec. con núm. de ident.: 416)	(sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8120/h 5A1-BI-020	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPHGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 417)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
F2215 8121/h 5A1-BI-021	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRIKC (sec. con núm. de ident.: 397)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNAY (sec. con núm. de ident.: 419)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPHGTTC HYNK (sec. con núm. de ident.: 417)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
BI-HU9-HK h5A1	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**L**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 438)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 445)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
BI-HU9-HK-1 h5A1	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**ER**E**E**V**AS** (sec. con núm. de ident.: 435)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL **K**AEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 464)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	**R**GQGTLVTV SS (sec. con núm. de ident.: 471)
BI-HU9-VH9 h5A1	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSC**T**AS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIA**T (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSRN TLYLQMKTL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 444)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 470)
BI-HU9-VH9-1 h5A1	EVQLLESGG GLVPRGGSL RLSCTAS (sec. con núm. de ident.: 423)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GK**EREEIA**T (sec. con núm. de ident.: 436)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SRN TLYLQMKTL RAEDTAVYY CA**A**	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGT**Q**VT VSS (sec. con núm. de ident.: 470)

					(sec. con núm. de ident.: 465)		
BI-HU9-VHH11 h5A1-Fc	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GFTFRLKC (sec. con núm. de ident.: 398)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	**YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH12 h5A1-Fc	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH13 h5A1	EVQLLESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 425)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 467)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH21 h5A1	QVQLVESGG GVVQPGGS LRLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 433)	GFTFRLKC (sec. con núm. de ident.: 398)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**VA**T** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH22 h5A1	QVQLVESGG GVVQPGGS LRLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 433)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**VA**T** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH23 h5A1	QVQLVESGG GVVQPGGS LRLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 433)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**VA**T** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 467)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)

BI-HU9-VHH31 h5A1	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 434)	GFTVRLKC (sec. con núm. de ident.: 399)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH32 h5A1	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 434)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TISRDNSKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 466)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)
BI-HU9-VHH33 h5A1	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS (sec. con núm. de ident.: 434)	GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328)	M**G**W**F**RQAP GKGLE**E**V**AT** (sec. con núm. de ident.: 441)	ISTGTGNTY (sec. con núm. de ident.: 329)	YADSVKGRF TIS**Q**D**K**SKN TLYLQMNSL RAEDTAVYY CA**A** (sec. con núm. de ident.: 467)	DVRPDGTTC HYNS (sec. con núm. de ident.: 330)	WGQGTTVT VSS (sec. con núm. de ident.: 473)

Tabla 17A. El polipéptido 1 comprende un dominio Fc; el polipéptido 2 comprende un dominio Fc; y el polipéptido 3 comprende la cadena ligera. El anticuerpo VHH puede incluirse en el polipéptido 1, polipéptido 2 y/o polipéptido 3, y puede utilizar un enlazador entre ellos. En esta tabla el dominio anti-CD3 se encuentra en el N-terminal de la Fc. El "(anticuerpo VHH)" puede seleccionarse de la Tabla 14.

	Polipéptido 1	**Polipéptido 2**	**Polipéptido 3**
Monoclonal Fc	(Anticuerpo VHH) EPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (sec. con núm. de ident.: 522)		

Ac 13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHGNF GNSYVSWFAYWGQGTMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK (sec. con núm. de ident.: 477)	**(Anticuerpo VHH)** EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (sec. con núm. de ident.: 523)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTP QSKPSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECSGGGGSGGSGGS GGSGGSGGSGGSGGSGGGGS **(Anticuerpo VHH) (sec. con núm. de ident.: 524)**

Tabla 17B. Secuencias nucleotídicas que codifican los polipéptidos en la Tabla 17A.

	DNA1	**DNA2**	**DNA3**
Monoclonal Fc	**(ADN que codifica el anticuerpo VHH)** GAGCCCAAATCTGCTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCC CGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGG		

	AGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAAA (sec. con núm. de ident.: 525)		
Ac13	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC CGGAGGAGGACTGGTGCAGC CTGGAGGAAGCCTGAGGCTG TCCTGCGCTGCTTCCGGATTT ACATTTAGCACATATGCCATGA ACTGGGTGAGGCAGGCCCCT GGAAAAGGTCTGGAATGGGTG GCTAGGATTCGGTCCAAGTAC AACAATTACGCCACCTACTATG CCGACAGTGTCAAGGACAGGT TTACCATCTCCAGGGACGATT CAAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACTCCCTGAGGGCCG AGGATACCGCTGTGTATTACTG TGCCCGGCACGGAAATTTCGG GAACTCCTACGTGTCCTGGTT CGCATACTGGGGCCAGGGAA CAATGGTGACTGTGTCCTCCG CTAGCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCCG CAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCCGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAG	**(ADN que codifica el anticuerpo VHH)** GAGCCCAAATCTAGCGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCCGCCGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCC CGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGTGGTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCGGGTAAA (sec. con núm. de ident.: 526)	CAGGCTGTGGTGACCCAGGA GCCCAGCCTGACCGTGAGCC CCGGAGGAACAGTGACCCTG ACCTGCAGAAGCAGCACCGG CGCCGTGACAACCTCAAACTA CGCCAACTGGGTGCAGCAGA AACCTGGACAGGCCCCCAGA GGACTGATCGGCGGAACCAA CAAGAGAGCCCCCGGCACCC CCGCCAGATTCAGCGGAAGTC TGCTGGGCGGCAAAGCCGCC CTGACCCTGAGCGGAGTGCA GCCTGAGGATGAAGCCGAGTA CTACTGCGCTCTGTGGTACAG CAACCTGTGGGTGTTCGGAG GAGGCACCAAGCTGACCGTG CTGGGTCAGCCCAAGGCTGC CCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCA AGCCAACAAGGCCACACTGGT GTGTCTCATAAGTGACTTCTAC CCGGGAGCCGTGACAGTGGC CTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGA CCACCACACCCTCCAAACAAA GCAACAACAAGTACGCGGCCA GCAGCTACCTGAGCCTGACGC CTGAGCAGTGGAAGTCCCACA GGAGCTACAGTTGCCAGGTCA CGCATGAAGGGAGCACCGTG GAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCAGGTGGCGGAGG GTCTGGTGGTGGAGGATCAG GGGGTGGAGGTTCAGGAGGC GGGGGAAGT **(ADN que codifica el anticuerpo VHH) (sec. con núm. de ident.: 527)**

	GAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGA GCTGCGCGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCGTC AGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACAG ATTTACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA(sec. con núm. de ident.: 495)		

Tabla 18.

Nombre	**Nombres alternativos**	**Descripción**
Anti-CD3		
Muromonab	OKT3 (Ortho Kung T3)	Primer anticuerpo murino monoclonal disponible para terapia en humanos: la IgG2a de ratón se dirige contra la cadena épsilon CD3 del complejo CD3/TCR
Teplizumab	hOKT3γ1 (Ala-Ala) y MGA031	CDR otorgadas a la cadena principal de IgG humana con dos mutaciones (L234/A, L235A)
Otelixizumab	ChAglyCD3, TRX4, GSK2136525	La IgG1 quimérica y humanizada lleva una sola mutación en la porción Fc γ1 (N297/A) para evitar la glicosilación y así inhibir la unión de FcR
Visilizumab	Nuvion, HuM291	anticuerpo IgG2 humanizado que se vuelve no mitogénico por dos mutaciones puntuales en su región Fc (V234/A, V237/A)
Foralumab	28F11-AE; NI-0401	mAb anti-CD3 completamente humano cuya porción Fc de esta IgG1 humana fue mutada (L234/A, V235E) de tal manera que el mAb no se une a FcR in vitro y exhibe solo una liberación menor de citocina
Biespecífico		
Blinatumomab	AMG 103	scFv ligado(s) contra CD19 en células tumorales y CD3 en células T; sin dominio Fc; El anti-CD3 proviene del mAb murino: L2K-07; secuencias publicadas que codifican scFv direccionando CD3ε (diL2K, la versión desinmunizada del anticuerpo monoclonal de ratón L2K)
Flotetuzumab	MGD006	DART dirigido a CD3 y CD123

Cibisatamab		1 sitio de unión para la cadena CD3e y 2 sitios de unión de CEA para células cancerosas
Catumaxomab		consiste en IgG2 de ratón e IgG2b de rata y se dirige a CD3 en células T y EpCAM en células tumorales
Mosunetuzumab		células T CD20×CD3 que enganchan bsAb
Todos los candidatos compartían el mismo anticuerpo de cadena única específico para CD3 derivado del anticuerpo monoclonal de ratón L2K, que es distinto de los anticuerpos monoclonales TR66 y OKT3. L2K se sometió a un procedimiento que identifica epítopos de células T colaboradoras humanas y elimina por mutaciones puntuales los aminoácidos de anclaje del MHC clase II dentro de epítopos potenciales (Jones et al., 2004). Esto resultó en L2K "desinmunizado" (diL2K)		
(secuencia que codifica el scFv que se dirige a CD3e se describe en K. Brischwein et al. / Molecular Immunology 43 (2006) 1129–1143)		
TR66		anticuerpo monoclonal anti-CD3 épsilon humano
PIT565		Triespecífico: CD19 X CD3 X CD2
Cuatro aglutinantes basados en mAb CD3: OKT3, L2K, h38E4.v1 y TRX4		
OKT3		
TRX4		
h38E4.v1		Se une a la porción N-terminal del dominio extracelular CD3e
L2K		L2K, por ejemplo, comparte más del 90 % de identidad de secuencia con OKT3 y reconoce el mismo epítopo en CD3*ε*, pero difiere en afinidad en aproximadamente 100 veces
Anti-CD16		
3G8		antihumano monoclonal CD16
US9035026		
HRS-3/**A9**		A9 es ratón anti-CD16 IgG1/λ Mab
Humanización de Fab anti-CD16		Protein Engineering, Design and Selection, Volumen 22, Número 3, marzo de 2009, Páginas 175—188. Las CDR del ratón anti-CD16 IgG1/λ Mab A9 fueron injertadas en secuencias Ig humanas (las CDR se trasplantaron a una cadena ligera κ humana + Maduración de afinidad vía mutación por radón en los dominios humanizados VH y Vκ)
AFM13		CD30/CD16 biespecífico tetravalente (se une a CD16A en la superficie de las células NK, activando y reclutando así células NK en células tumorales CD30+)
GTB-3550		CD16/IL-15/CD33 triespecífico (nanocuerpo anti-CD16, o primera generación usa scFv anti-CD16)
IPH6501		Tetraespecífico basado en anticuerpos contra NKp46, CD16a, CD122 o IL-2R y CD20
AFM13: El aglutinante anti-CD16A es dominios variables del clon scFv humano LSIV21		

Otros clones anti-CD16A de scFv humanos: LSIV14, LSIII49, LBIII6, LBIII5, LBIII3, 50NI		
Citar: Reusch et al., mAbs 6:3, 727-738, May/June 2014		
Aglutinantes para segmentos de gen V gamma 9, V delta 2, V delta 1 en TCR		
LAVA-051		Lava Therapeutics. Participantes biespecíficos de células T gamma delta (bsTCE): La ocupación del receptor de células T Vγ9Vδ2 de LAVA-051 aumentó con los aumentos de dosis de LAVA-051 y las células T Vγ9Vδ2 de sangre periférica también expresaron niveles más altos de marcadores de activación después de la dosificación de LAVA-051
		LAVA-051 consiste en dos anticuerpos humanizados de dominio único (VHH) unidos a través de cinco cortos a.a. El enlazador G-S, en donde un dominio de anticuerpo reconoce la cadena Vδ2 del receptor de células T Vγ9Vδ2, y el otro anticuerpo de dominio es específico para CD1d.
LAVA-1207		Se une: la cadena Vδ2 de las células Vγ9Vδ2-T y el antígeno de membrana prostática específica (PSMA, por sus siglas en inglés)
Bruin et al., Clinical Immunology, v. 169, 128-138, Agosto de 2016		conjunto de VHH específico de células Vγ9Vδ2-T (o nanocuerpo)
Clones: 5C1, 5D3, 5E3, 5G3, 5F5, 5C7, 5D7, 5E7, 5C8, 5B11, 6A1, 6C1, 6H1, 6E3, 6G3, 6H3, 6C4, 6E4, 6H4, 6F6		
la publicación de patente núms. 10.501.540 y 11384145		
clon **7A5**: las regiones variables del anticuerpo específico de células T Vg9gd (		Constructo: Vg9 TCR x Her2/neu; es decir, anticuerpo biespecífico $(Her2)_2$xVγ9
GDX012	GammaDelta Therapeutics	terapia de células T alogénicas, no diseñada, variable delta 1 (Vδ1) gamma-delta (γδ)
Ver sol. de pat. pub.: US20220403025; US20220290101;		
Anti-CD137 (4-1BB/TNFRSF9)		
AGEN2373		de Agenus Inc; mAb IgG1; **Patente de los EE. UU. núm. 11.098.117 y 11.242.385**
Utomilumab	PF-05082566	mAb IgG2 humanizado; sitio de unión: dominio rico en cisteína (CRD) III y IV
Urelumab	BMS-663513	mAb de IgG4 humano; sitio de unión: CRD I; ensayo por BMS
CTX-471	de Compass Therapeutics	mAb IgG4 completamente humano
ADG106	de Adagene Suzhou	IgG4 agonista que bloquea el ligando completamente humano

LVGN6051	de Lyvgen Biopharma/Merck Sharp & Dohme	IgG1, unión de FcγRIIB mejorada
ATOR-1017	de Alligator Bioscience AB	IgG4
HOT-1030	de Shanghai Huabo Biopharmaceutical (Huaota) /Eutilex	IgG1, unión a FcγRIIB abrogada
EU101	de Eutilex/Zhejiang Huahai Pharmaceutical	IgG
YH004	de Eucure (Beijing) Biopharma	IgG1
ADG206	de Adagene Suzhou	IgG1, unión IgG1 mejorada, sitios de unión 4—1BB están enmascarados
PE0116	de Shanghai Hyamab Biotech	IgG4
FS120	de F-Star Therapeutics Inc.	OX40/CD137 mAb^2 anticuerpo biespecífico agonista dual
Cinrebafusp alfacccccc	PRS-343	4-1BB biespecífico (Anticalin®) X HER2
RG7827	RO 7122290	Proteína de fusión de anticuerpos FAP x 4-1BBL
INBRX-105	ES101	IgG1 humanizada y biespecífica dirigida a PD-L1 X 4-1BB
Acasunlimab	GEN 1046, BNT 311	PD-L1 X 4-1BB biespecífico de IgG1 silenciado por Fc
MCLA-145		biespecífico CD137 X PD-L1
Englumafusp alfa	RG6076, RO7227166	CD19 X CD137
Bi/multiespecífico adicional en MAb. 2023; 15(1): 2167189.		
Anti-CD28		
Theralizumab	TGN1412, CD28-SuperMAB,	La tormenta de CITOCINA falló el ensayo de seguridad humana; anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el CD28 humano
	> Rebautizado como TAB08	Ensayo para artritis reumatoide
Anti-DNAM-1 (CD226 o PTA1)		
LY3435151		Anti-CD226 agonista; NCT04099277 de Eli Lilly; la publicación de patente núm. 11.440.959
Anti-NKp46 (NCR1, CD335)		

IPH6501		Terapéutico de participante celular asesino natural basado en anticuerpos tetraespecíficos dirigidos a NKp46 armado con una variante de IL-2 no alfa (de Innate Pharma)
NKCE trifuncional		Dirigido a NKp46, CD16 y un antígeno tumoral (Célula 177, 1701—1713, 13 de junio de 2019); **Patente de los EE. UU. núm. 10.519.234** (de Innate Pharma)
		Otras patentes de aglutinante NKp46 propiedad de Innate Pharma: **11.001.629, 11.377.492 y 11.267.897**
Anti-NKp30		
	Compass Therapeutics	**US20200109195, US20200079867, en particular las sec. con núms. de ident.: 14 y 18 en US20200109195 y US20200079867.**
Anti-NKG2D		
	NCT05213195 de Zhejiang Univ.	**US20200360437 de Asko (Suzhou)**
		NCT05213195, NCT05247957, NCT04324996, NCT04623944, NCT03415100
Anti-OX40 (CD134; TNFRSF4)		
INCAGN1949		IgG1 humano
		Patentes de anti-OX40: **Patente de los EE. UU. 11.472.883, 11.447.557, 11.359.028, 11.332.536, 11.136.404, 10.626.181, 10.259.882**
HFB301001		Antianticuerpo agonista IgG1 OX40 completamente humano de 2.ª gen. de HiFiBio
GSK3174998		mAb anti-OX40
INBRX 106		agonista hexavalente OX40, ingrediente activo: anticuerpo IgG hexavalente que se dirige al receptor OX40 humano (TNFRSF4)
FS120	de F-Star Therapeutics Inc.	OX40/CD137 mAb^2 anticuerpo biespecífico agonista dual
Ixuxolimab	PF-04518600 o PF 8600	anticuerpos monoclonales IgG2 agonistas humanizados contra OX40
BGB-A445		no bloquea la interacción OX40-OX40L;
MOXR0916	de Genentech	Agonista humanizado competente IgG1 mAb; unión OX40 completamente bloqueada a OX40L
BMS-986178		mAb agonista de IgG1 completamente humano
Anti-ICOS (CD278, AILIM, CVID1)		
Izuralimab	XmAb23104 de Xencor	ICOS X PD1 biespecífico

MEDI-570	de Astrazeneca	
BMS-986226		
KY1044	de Kymab	Anti-ICOS IgG1 completamente humano
Feladilimab	GSK3359609, INDUCE-1	IgG4 humanizada anti-ICOS monoclonal
Vopratelimab	JTX-2011 de Jounce Therapeutics	
Acazicolcept		ICOS X CD28
Anti-CD2		
Siplizumab	TCD601, MEDI-507, Hu-BTI-322	IgG1 **anti-CD2** monoclonal humanizada (forma humanizada de BTI-322 a continuación)
PIT565	de Novartis	triespecífico CD19 X CD3 X CD2 (NCT05397496)
Alefacept		proteína de fusión compuesta por el primer dominio extracelular de LFA-3 (ligando natural de CD2) fusionado a los dominios bisagra IgG1 humano, CH2 y CH3
BTI-322	Lo-CD2a	rata anti-humano CD2 IgG2b mAb
Anti-CD40L (CD154)		
Ruplizumab	BG 9588, hu5c8	IgG1k humanizada
Dazodalibep	HZN-4920 por	Antagonista
Dapirolizumab pegol	CDP7657	Fragmento de anticuerpo anti-CD40L con la fracción Fc sustituida por polietilenglicol
Tegoprubart	AT-1501	mAb humanizado
Frexalimab	SAR441344	mAb de 2.ª generación diseñado para carecer del dominio que activó FcgRIIA
Lu AG22515	APB-A1; de Lundbeck	Anticuerpo anti-CD40L diferenciado
Letolizumab	BMS 986004	mAb humanizado (una proteína de fusión dimérica compuesta por el C-terminal del anticuerpo de dominio (dAb) BMS2h-572-633 dirigido a CD40L unido a un fragmento Fc modificado de IgG1)
BIIB063		MAb de alta afinidad, diseñado para reducir la función efectora de Fc y evitar la formación de medio anticuerpo in vivo (IgG4P
Anti-CD40 (TNFRSF5)		
CDX-1140		mAb agonista de IgG2 completamente humano
Sotigalimab	APX005M	mAb agonista de IgG1 humanizado
2141-V11		anticuerpo anti-CD40 humano con dominio Fc modificado (IgG1), que puede inducir inmunidad antitumoral duradera

Selicrelumab	RO7009789 de Roche, o CP-870893	mAb agonista de IgG2 humano; CP-870,893
Dalnicastobart	LVGN7409	mAb de IgG1 humanizado
Iscalimab	CFZ533	mAb IGg1 completamente humano
Dacetuzumab	SGN-40	forma IgG1 humanizada de S2C6 (una CD40 antihumana murina)
BI 655064	de Boehringer Ingelheim	Anti-CD40 humanizado, no agotador, antagónico
Bleselumab	ASKP1240	mAb IgG4 completamente humano
YH003		mAb IgG2 CD40 agonista humanizado
SL-172154	SIRPα-Fc-CD40L	CD47 X CD40 bifuncional
Giloralimab	ABBV-927	mAb agonista
Lucatumumab	CHIR 12.12 o HCD122	mAb completamente humano
Mitazalimab	ADC-1013	mAb de IgG1 humano agonista
GEN1042		agonista biespecífico CD40 X 4-1BB
FFP104	PG102	Humanizado
KPL-404		Anticuerpo IgG4 humanizado diseñado para unirse a CD40 sin activar las funciones efectoras Fc
Cifurtilimab	SEA-CD40	mAb de IgG1 humanizado
Ravagalimab	ABBV-323	Antagonista
ABBV-428		CD40 X MSLN biespecífico
BMS-986090	INX-189	Un anticuerpo dimérico antidominio antagonista de VH CD40 humano formateado con un Fc de IgG4 humano
BSI-038		mAb agonista
MEDI5083		de MedImmune, ahora Astrazeneca; fusión hexamérica CD40L-Fc
RG6189		un anticuerpo biespecífico agonista CD40 dirigido a FAP
Inezetamab	AMG 994	un dímero de inmunoglobulina G1-scFv_L-lambda2

Variantes de IL-15 y proteínas de fusión IL-15

Diversas modalidades de la presente invención proporcionan variantes de IL-15.

Diversas modalidades proporcionan una variante de interleucina 15 (IL-15) que comprende la secuencia de la Fórmula I:

X_1WVX_4VISDLKKIEDLIQSMHIX_{22}ATLYTESX_{30}VHPSCKVTAMX_{41}CFLX_{45}ELQX_{49}ISLX_{53}S GDASIHDTVX_{64}NL$X_{67}X_{68}$LANNSLSSNGX_{79}VTESGCKECEELEX_{93}KNIKEFLQSX_{103}VHIVX_{108}MFIX_{112}TS, en donde

X_1 es cualquier aminoácido,

X_4 es cualquier aminoácido,

X_{22} es cualquier aminoácido,

X_{30} es cualquier aminoácido,

X_{41} es cualquier aminoácido,

X_{45} es cualquier aminoácido,

X_{49} es cualquier aminoácido excepto V,

X_{53} es cualquier aminoácido excepto E,

X_{64} es cualquier aminoácido,

X_{67} es cualquier aminoácido,

X_{68} es cualquier aminoácido,

X_{79} es cualquier aminoácido,

X_{93} es cualquier aminoácido,

X_{103} es cualquier aminoácido,

X_{108} es cualquier aminoácido, y

X_{112} es cualquier aminoácido; (sec. con núm. de ident.: 533).

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N (sec. con núm. de ident.: 534), X_4 es N (sec. con núm. de ident.: 535), X_{22} es D (sec. con núm. de ident.: 536), X_{30} es D (sec. con núm. de ident.: 537), X_{41} es K (sec. con núm. de ident.: 538), X_{45} es L (sec. con núm. de ident.: 539), X_{64} es E (sec. con núm. de ident.: 540), X_{67} es I (sec. con núm. de ident.: 541), X_{68} es I (sec. con núm. de ident.: 542), X_{79} es N (sec. con núm. de ident.: 543),

X_{93} es E (sec. con núm. de ident.: 544), X_{103} es F (sec. con núm. de ident.: 545), X_{108} es Q (sec. con núm. de ident.: 546), o X_{112} es N (sec. con núm. de ident.: 547), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N (sec. con núm. de ident.: 534), X_4 es N (sec. con núm. de ident.: 535), X_{22} es D (sec. con núm. de ident.: 536), X_{30} es D (sec. con núm. de ident.: 537), X_{41} es K (sec. con núm. de ident.: 538), X_{45} es L (sec. con núm. de ident.: 539), X_{49} es R o K (sec. con núm. de ident.: 548), X_{53} es G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549), X_{64} es E (sec. con núm. de ident.: 540), X_{67} es I (sec. con núm. de ident.: 541), X_{68} es I (sec. con núm. de ident.: 542), X_{79} es N (sec. con núm. de ident.: 543), X_{93} es E (sec. con núm. de ident.: 544), X_{103} es F (sec. con núm. de ident.: 545), X_{108} es Q (sec. con núm. de ident.: 546), o X_{112} es N (sec. con núm. de ident.: 547), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es N o G (sec. con núm. de ident.: 550), X_4 es N, K o L (sec. con núm. de ident.: 551), X_{22} es D o A (sec. con núm. de ident.: 552), X_{30} es D o N (sec. con núm. de ident.: 553), X_{41} es K o Q (sec. con núm. de ident.: 554), X_{45} es L o S (sec. con núm. de ident.: 555), X_{49} es R o K (sec. con núm. de ident.: 548), X_{53} es G, K, I o A (sec. con núm. de ident.: 549), X_{64} es E o Q (sec. con núm. de ident.: 556), X_{67} es I o T (sec. con núm. de ident.: 557), X_{68} es I o S (sec. con núm. de ident.: 558), X_{79} es N o Y (sec. con núm. de ident.: 559), X_{93} es E o A (sec. con núm. de ident.: 560), X_{103} es F o L (sec. con núm. de ident.: 561), X_{108} es Q o T (sec. con núm. de

ident.: 562), o X_{112} es N o R (sec. con núm. de ident.: 563), o cualquier combinación de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquiera de dos combinaciones de estas. En diversas modalidades, cualquier combinación de estas es cualquier combinación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 de estas.

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{49} es R o K, y X_{53} es G, K, I o A; (sec. con núm. de ident.: 564).

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{30} es N (sec. con núm. de ident.: 565).

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_{64} es Q (sec. con núm. de ident.: 566).

En diversas modalidades de la variante de IL-15, X_1 es G (sec. con núm. de ident.: 567).

En diversas modalidades, la variante de IL-15 es una variante seleccionada de la Tabla 1A o la Tabla 3A.

En diversas modalidades, las variantes de IL-15 no son variantes de IL-15 descritas en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm. US 2019/0263877, las variantes se incorporan en la presente como referencia.

También se proporcionan en la presente proteínas de fusión que comprenden variantes de IL-15 y un polipéptido de supercóntigo. Diversas modalidades de la invención proporcionan una proteína de fusión, que comprende una variante de IL-15 como se describe en la presente; y un polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende dos o más variantes de IL-15 como se describe en la presente; y un polipéptido de supercóntigo. En diversas modalidades, las dos o más

variantes de IL-15 pueden ser 3, 4, 5 o 6 variantes de IL-15. En diversas modalidades, las dos o más variantes de IL-15 pueden ser hasta 8 variantes de IL-15.

En diversas modalidades, la proteína de fusión comprende además uno o más fragmentos dirigidos al punto de control inmunitario.

En diversas modalidades, los puntos de control inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3. En diversas modalidades, uno o más fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios comprenden fragmentos dirigidos a puntos de control inmunitarios de anticuerpos conocidos. Los ejemplos de fragmentos anti-PD1 incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, spartalizumab, cemiplimab, penpulimab (AK105), prolgolimab (BCD-100), ezabenlimab (BI 754091), toripalimab (JS001), lipustobart (LZM009), retifanlimab (MGA012), Sym021, dostarlimab (TSR-042), tebotelimab (MGD013), cadonilimab (AK104), vudalimab (XmAb20717), tislelizumab, o PF-06801591. Los ejemplos adicionales de fragmentos anti-PD1 también incluyen fragmentos (p. ej., Fab, Fv) de vopratelimab, camrelizumab, sintilimab, AMP-224, AMP-514 y acrixolimab. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, garivulimab (BGB-A333), cosibelimab (CK-301), FAZ053, envafolimab (KN035), MDX-1105, betifisolimab (MSB2311), adebrelimab (SHR-1316), atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559, CK-301 y M7824. Por lo tanto, por ejemplo, la proteína de fusión comprende un fragmento anti-PD1 de un anticuerpo anti-PD1 (p. ej., Fab, Fv), y una variante de IL-15, y opcionalmente, un enlazador.

En algunas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al extremo C del polipéptido de supercóntigo. En algunas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al extremo N del polipéptido de supercóntigo.

En otra modalidad más, en donde el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo, la variante de IL-15 se fusiona con uno cualquiera del extremo C o extremo N de la cadena pesada o cadena ligera, o se fusiona con uno cualquiera del dominio C_H2, o región bisagra (p. ej., entre los dominios C_H2 y C_H1).

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es un anticuerpo o un fragmento de este. En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgA, IgM, IgG, o IgE.

En diversas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-224, AMP-514, espartalizumab, cemiplimab, penpulimab (AK105), prolgolimab (BCD-100), ezabenlimab (BI 754091), toripalimab (JS001), lipustobart (LZM009), retifanlimab (MGA012), Sym021, dostarlimab (TSR-042), tebotelimab (MGD013), cadonilimab (AK104), vudalimab (XmAb20717), tislelizumab, PF-06801591 y anticuerpo anti-PD1 que expresa linfocitos T asesinos pluripotentes (PIK-PD-1). Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 incluyen, pero no se limitan a, garivulimab (BGB-A333), cosibelimab (CK-301), FAZ053, envafolimab (KN035), MDX-1105, betifisolimab (MSB2311), adebrelimab (SHR-1316), atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559, CK-301 y M7824.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc o un fragmento de esta. En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo es una región Fc o un fragmento de esta y el polipéptido de supercóntigo no comprende un Fab.

En diversas modalidades, dos brazos (o cadenas) de regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden heterodimerizarse creando mutaciones de “botón en ojal” (KiH) en el dominio CH3. Esta característica estructural en los brazos polipeptídicos permite la unión de dos semianticuerpos (p. ej., heterodímero Fc; y dominios VH–CH y VL–CL). Por ejemplo, un heteromultímero (que incluye un heterodímero)

puede comprender dos polipéptidos, cada uno de los cuales comprende un dominio CH3, en donde los polipéptidos se encuentran en una interfaz diseñada genéticamente dentro del dominio CH3, y un polipéptido contiene una protuberancia diseñada genéticamente (“botón”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo original, y otro polipéptido contiene una cavidad diseñada genéticamente (“orificio”) en la interfaz con al menos un residuo de contacto reemplazado por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo original. En algunas modalidades, la interfaz diseñada genéticamente de un heteromultímero incluye al menos dos pares mutantes de protuberancia dentro de la cavidad. Los volúmenes y áreas superficiales accesibles de cada aminoácido se describen en *A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol*. 24: 107-123, 1972 y C. Chothia, *J. Mol. Biol*. 105: 1-14, 1975. Por ejemplo, los residuos de importación para la formación de una protuberancia pueden ser arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W); y preferentemente el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un pequeño volumen de cadena lateral, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Como otro ejemplo, los residuos de importación para la formación de una cavidad pueden ser alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V); y preferentemente el residuo original para la formación de la cavidad tiene un gran volumen de cadena lateral, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Por ejemplo, una mutación T366W en el dominio CH3 para la cadena de “botón” /protuberancia, y una mutación T366S/L368A/Y407V en el dominio CH3 para la cadena “ojal” /cavidad. Adicionalmente, la configuración KiH puede combinarse con mutaciones adicionales para permitir el enlace disulfuro S-S entre las dos cadenas. En diversos aspectos en donde la proteína/polipéptido es un heterodímero de una configuración KiH, la IL-18 (o su fragmento,

variante, o un fragmento de su variante) está ligada a una, y solo una, de las dos (o más) regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina/cadenas (es decir, botón u ojal).

Como tal, en algunas modalidades, la región Fc es una Fc de botón en ojal (KiH).

En diversas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al botón del Fc de KiH. En diversas modalidades, la variante de IL-15 se fusiona al orificio del Fc de KiH.

En diversas modalidades, la región Fc es una región Fc de una IgG4, Fc de botón en ojal (KiH) o IgG1. En diversas modalidades, la región Fc puede ser una IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

En algunas modalidades, los dos o más brazos (o cadenas) de las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina (p. ej., polipéptidos Fc) pueden contener otro diseño de complementariedad estérica simétrica a asimétrica (p. ej., HA-TF, ZW1), una interacción de intercambio de carga a carga (DD-KK), un intercambio de complementariedad carga-estérico más una interacción electrostática adicional de largo alcance (p. ej., EW-RVT), o un diseño de intercambio de cadena de isotipo (p. ej., dominio diseñado para intercambio de cadenas (SEED, por sus siglas en inglés)), o Xmab, 7.8.60, dirección electrostática, A107 o Duobody, para formar heterodímeros/heteromultímeros. Se observa una descripción adicional de estas configuraciones y mutaciones/residuos ilustrativos en *Front Immunol.* 2016; 7: 394.

En diversas modalidades, el polipéptido de supercóntigo de la proteína de fusión comprende una proteína globular, albúmina sérica humana (HSA), beta2microglobulina, transferrina, región de unión al antígeno de fragmentos (región Fab), anticuerpo VHH, fragmento variable de cadena única (scFv), anticalina, proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio de unión de esta, o un fragmento de esta.

En diversas modalidades, pueden insertarse uno o más polipéptidos entre la variante de IL-15 y el anticuerpo de las proteínas de fusión IL-15. En diversas modalidades,

el polipéptido puede insertarse o conjugarse en el extremo N, en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C del anticuerpo. En diversas modalidades, el polipéptido comprende un enlazador polipeptídico que conjuga la variante de IL-15 y el anticuerpo.

En diversas modalidades, uno o más polipéptidos pueden insertarse entre la variante de IL-15 y la región Fc de las proteínas de fusión IL-15. En diversas modalidades, el polipéptido puede insertarse o conjugarse en el extremo N, en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C de la región Fc. En diversas modalidades, el polipéptido comprende un enlazador polipeptídico que conjuga la variante de IL-5 y la región Fc. En estas modalidades, la proteína de fusión no incluye la región Fab de un anticuerpo.

Los anticuerpos que pueden fusionarse con IL-15 pueden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, Fab', F(ab')2, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos y cadena sencilla (ScFv). Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (que incluyen anticuerpos quiméricos o humanizados). Preferentemente, los anticuerpos son humanos o anticuerpos humanizados.

En diversas modalidades, las proteínas de fusión IL-15 son proteínas de fusión IL-15 enumeradas en la Tabla 1A. Es decir, una proteína de fusión IL-15 que comprende el polipéptido 1, el polipéptido 2 y el polipéptido 3.

En diversas modalidades, la proteína de fusión IL-15 comprende una variante de IL-15 enumerada en la Tabla 1A o Tabla 3A.

En diversas modalidades, la proteína de fusión IL-15 comprende el polipéptido 1, el polipéptido 2 y el polipéptido 3 enumerados en la Tabla 1A, excepto que el enlazador en el polipéptido 2 es un enlazador peptídico diferente. Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador flexible que tiene generalmente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de

longitud. Ejemplos adicionales de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), (GGGGX_λ (sec. con núm. de ident.: 236))n, y (X_λGGGG (sec. con núm. de ident.: 317))n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud.

En la presente se proporcionan métodos para producir las variantes de IL-15 y proteínas de fusión de IL-15.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una variante de IL-15 de la presente invención descrita en la presente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar en una dirección 5' a 3', la variante de IL-15 o la proteína de fusión IL-15.

Diversas modalidades proporcionan un polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención descrita en la presente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar en una dirección 5' a 3', la variante de IL-15.

Como tal, el polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención comprende polinucleótido 1, polinucleótido 2 y polinucleótido 3 enumerados en la Tabla 2A. En otras modalidades, el polinucleótido que codifica una proteína de fusión IL-15 de la presente invención comprende el polinucleótido 1, el polinucleótido 2 y el polinucleótido 3 enumerados en la Tabla 2A, excepto que los nucleótidos que codifican el enlazador codifican un enlazador diferente.

Por ejemplo, el enlazador puede ser un enlazador flexible que tiene generalmente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud. Ejemplos adicionales

de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), (GGGGX_λ (sec. con núm. de ident.: 236))n, y (X_λGGGG (sec. con núm. de ident.: 317))n en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud. Como tal, los nucleótidos que codifican el enlazador en el polinucleótido 2 codificarán uno de estos enlazadores antes mencionados en su lugar.

Los polinucleótidos ejemplares se encuentran en la Tabla 2A.

Diversas modalidades también proporcionan un vector de expresión que comprende uno cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Por lo tanto, el polipéptido que codifica la variante de IL-15 o las proteínas de fusión IL-15 también puede integrarse dentro de un vector de expresión replicable. Por lo tanto, también se proporciona un vector que codifica la proteína de fusión, que puede expresar la proteína de fusión en, por ejemplo, un huésped bacteriano, un receptor deseado, o ambos.

Las modalidades adicionales proporcionan células transformadas o transfectadas con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la variante de IL-15 o la proteína de fusión de IL-15. La célula puede ser una célula procariota. O la célula es una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, y con mayor preferencia una célula humana.

En diversas modalidades, la célula es una célula de mamífero. Las células de mamífero que son útiles incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) o células HEK-293.

En diversas modalidades, la célula es una célula bacteriana o una célula de levadura.

Diversas modalidades proporcionan un método para producir una variante de IL-15, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas en la presente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la variante de Il-15, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular.

En diversas modalidades, el método comprende además aislar la variante de IL-15 de la célula o del medio de cultivo celular. En diversas modalidades, el método comprende además purificar la variante de IL-15.

Diversas modalidades proporcionan un método para producir una proteína de fusión IL-15, que comprende: cultivar una cualquiera de las células descritas en la presente, en medio de cultivo celular para permitir que se produzca la proteína de fusión Il-15, y opcionalmente segregar en el medio de cultivo celular.

En diversas modalidades, el método comprende además aislar la proteína de fusión IL-15 de la célula o del medio de cultivo celular. En diversas modalidades, el método comprende además purificar la proteína de fusión IL-15.

En algunas modalidades, usando un sistema de expresión de ovario de hámster chino (CHO), la variante de IL-15 o la proteína de fusión se produce mediante un proceso que incluye las etapas de: (1) recuperación celular, que puede ser para recuperar las células CHO congeladas a través de un baño de agua a 37 °C; (2) subcultivo celular, que puede ser subcultivar las células y ajustar la densidad celular a 6×10^6/ml para la transfección; (3) transfección y expresión, usando una solución 1 (en la que se diluye un plásmido con un agente diluyente), una solución 2 (en la que se diluye un reactivo de transección con un/el agente diluyente), y después mezclar la solución 1, la solución 2 y las células CHO, seguido

por la incubación de la mezcla en un agitador para su expresión durante 12-14 días a 32 °C para recolectar el sobrenadante del cultivo después del centrifugado.

En algunas modalidades, se realiza un proceso de purificación después de la expresión de la proteína de fusión. En algunas modalidades, un proceso de purificación incluye las etapas de: (1) lavar una columna con un regulador de unión (10 veces el volumen) a una velocidad de flujo de 1 ml/min; (2) cargar una muestra que contiene proteína de fusión en la columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min; (3) lavar la columna con 10x volúmenes de regulador PBS con una velocidad de flujo de 1 ml/min; (4) eluir la proteína de la columna con 40 mM de citrato de sodio (Ph 3,4); opcionalmente, la muestra de elución puede recolectarse en tubos (1 ml/min) y medirse para la densidad óptica (OD, por sus siglas en inglés) usando NanoDrop a 280 nm; y (5) realizar diálisis, p. ej., contra el regulador PBS en una bolsa de diálisis durante la noche.

Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar una variante de IL-15 de la presente invención como se describe en la presente, a un sujeto que lo necesita.

Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), que comprende administrar una proteína de fusión IL-15 de la presente invención como se describe en la presente, a un sujeto que lo necesita.

En diversas modalidades, el sujeto tiene cáncer.

Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende

administrar una variante de IL-15 de la invención como se describe en la presente a un sujeto que lo necesita.

Diversas modalidades de la invención proporcionan un método para mejorar, inhibir o tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una proteína de fusión IL-15 de la invención como se describe en la presente a un sujeto que lo necesita.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección es cáncer.

Composiciones farmacéuticas

En diversas modalidades, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión. ‘‘Excipiente farmacéuticamente aceptable’’ significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.

En ciertas modalidades, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. Los términos “sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables’’ como se usan en la presente se refieren a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para usar en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y lo similar, son proporcionales a una relación

riesgo/beneficio razonable, y efectivos para su uso previsto de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a las sales de adición de ácidos relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando, por lo tanto, la sal formada. Estos pueden incluir cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y lo similar, así como cationes de amonio no tóxico, amonio cuaternario y amina que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetraetilanunonio, tetraetilamina, metil amina, dimetil amina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y lo similar (ver, p. ej., Berge S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66, 1, que se incorpora en la presente como referencia).

La expresión "ésteres farmacéuticamente aceptables" se refiere a los productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y purificación de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma ácida libre o hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los ácidos carboxílicos se pueden convertir en ésteres mediante tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. El término también pretende incluir grupos de hidrocarburos inferiores capaces de solvatarse en condiciones fisiológicas, p. ej., ésteres de alquilo, ésteres de metilo, etilo y propilo.

Como se usa en la presente, "sales o profármacos farmacéuticamente aceptables" son sales o profármacos que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para usar en contacto con los tejidos del sujeto sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y lo similar, son proporcionales a una relación riesgo/beneficio razonable, y efectivos para su uso previsto.

El término “profármaco” se refiere a compuestos que se transforman rápidamente in vivo para producir uno o más péptidos funcionalmente activos como se describe en la presente o un mutante, variante, análogo o derivado de estos. Se proporciona una discusión exhaustiva en T. Higachi and V. Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” Vol. 14 of the A. C. Serie S. Simposium, y en Portadores Biorreversibles en: Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambos se incorporan en la presente como referencia. Como se usa en la presente, un profármaco es un compuesto que, tras la administración in vivo, se metaboliza o, de cualquier otra manera, se convierte en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. Un profármaco del uno o más péptidos como se describe en la presente o un mutante, variante, análogo o derivado de este puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de uno o más péptidos como se describe en la presente o un mutante, variante, análogo o derivado de este, para enmascarar efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor de un compuesto o para alterar otras características o propiedades de un compuesto. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y del metabolismo de fármacos in vivo, una vez una forma farmacéuticamente activa del uno o más péptidos como se describe en la presente o un mutante, variante, análogo o derivado de estos, los expertos en la técnica farmacéutica generalmente pueden diseñar profármacos del compuesto (ver, p. ej., Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, N. Y., páginas 388-392). Los procedimientos convencionales para seleccionar y preparar derivados de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en Design of Prodrugs, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Los ejemplos adecuados de profármacos incluyen ésteres de metilo, etilo y glicerol del ácido correspondiente.

En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para su suministro mediante cualquier vía de administración. “Vía

de administración" puede referirse a cualquier ruta de administración conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, aerosol, nasal, oral, transmucosa, transdérmica o parenteral.

La administración "transdérmica" se puede lograr usando una crema o ungüento tópico o por medio de un parche transdérmico.

"Parenteral" se refiere a una ruta de administración que generalmente se asocia con la inyección, que incluye, intraorbitario, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaco, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterino, intravenoso, subaracnoideo, subcapsular, subcutáneo, transmucoso o transtraqueal. Por vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o inyección, o como polvos liofilizados.

Por vía de la ruta enteral, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos recubiertos de azúcar, jarabes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o vesículas poliméricas que permiten la liberación controlada. Por vía de la ruta parenteral, las composiciones pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para infusión o inyección.

Por vía de la ruta tópica, las composiciones farmacéuticas basadas en compuestos de acuerdo con la invención pueden formularse para tratar la piel y las membranas mucosas y están en forma de ungüentos, cremas, leches, pomadas, polvos, compresas impregnadas, soluciones, geles, aerosoles, lociones o suspensiones. También pueden estar en forma de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o vesículas poliméricas o parches poliméricos e hidrogeles permitiendo la liberación controlada. Estas composiciones de vía tópica pueden estar en forma anhidra o en forma acuosa dependiendo de la indicación clínica.

Por vía de la ruta ocular, pueden estar en forma de gotas para los ojos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden contener cualquier portador farmacéuticamente aceptable. ‘‘Portador farmacéuticamente aceptable’’ como se usa en la presente se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptables que participa en el traslado o transporte de un compuesto de interés desde un tejido, órgano o porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, o una combinación de estos. Cada componente del portador debe ser ‘‘farmacéuticamente aceptable’’ ya que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para usar en contacto con cualesquiera tejidos u órganos con los que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad, o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para la administración oral. Pueden añadirse portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para mejorar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de maní, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. El portador también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Las preparaciones farmacéuticas se elaboran siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que implican molienda, mezcla, granulación y compresión, cuando sea necesario, para formas de comprimidos; o molienda, mezcla y llenado para formas de

cápsulas de gelatina dura. Cuando se usa un portador líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Tal formulación líquida puede administrarse directamente p.o. o llenarse en una cápsula de gelatina blanda.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden suministrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad terapéuticamente efectiva precisa es aquella cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto determinado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a, las características del compuesto terapéutico (que incluye actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (que incluye edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, condición física general, capacidad de respuesta a una dosificación determinada y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables de la formulación, y la ruta de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación rutinaria, por ejemplo, monitorizando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosificación en consecuencia. Para obtener orientación adicional, consulte *Remington*: *The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000).

Kits

La presente invención también se dirige a un kit para tratar diversas enfermedades. El kit es un conjunto de materiales o componentes, que incluye al menos una de las composiciones inventivas. Por lo tanto, en algunas modalidades el kit contiene una composición que incluye proteínas de fusión, como se describió anteriormente.

La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit inventivo depende de su propósito previsto. Por ejemplo, algunas modalidades se configuran con el propósito de activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK). Algunas modalidades se configuran con el propósito de tratar el cáncer. En una modalidad, el kit se configura particularmente para el propósito de tratar sujetos mamíferos. En otra modalidad, el kit se configura particularmente con el propósito de tratar sujetos humanos. En modalidades adicionales, el kit se configura para aplicaciones veterinarias, tratando sujetos tales como, pero no se limitan a, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

Las instrucciones de uso pueden estar incluidas en el kit. Las "instrucciones de uso" típicamente incluyen una expresión tangible que describe la técnica que se va a emplear en el uso de los componentes del kit para lograr un resultado deseado, tal como activar, promover la diferenciación o promover la expansión de células T, células B o células destructoras naturales (NK), para tratar enfermedades, que incluyen el cáncer. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como diluyentes, reguladores, portadores farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o medición, materiales de vendaje u otra parafernalia útil que será fácilmente reconocida por aquellos expertos en la técnica.

Los materiales o componentes ensamblados en el kit pueden proporcionarse al profesional almacenados de cualquier manera conveniente y adecuada que preserve su operatividad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; pueden suministrarse a temperatura ambiente, refrigerados o congelados. Los componentes están típicamente contenidos en material(es) de empaquetado adecuado(s). Tal como se emplea en la presente, la frase "material de

empaquetado" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para alojar el contenido del kit, tales como composiciones inventivas y lo similar. El material de envasado se construye por métodos bien conocidos, preferiblemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. Tal como se usa en la presente, el término "empaque" se refiere a una matriz sólida o material adecuado tal como vidrio, plástico, papel, lámina y lo similar, capaz de contener los componentes individuales del kit. Así, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades adecuadas de una composición inventiva que contiene variantes de IL-15 o proteínas de fusión. El material de embalaje generalmente tiene una etiqueta externa que indica el contenido y/o propósito del kit y/o sus componentes.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente para fines ilustrativos y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLOS DE VARIANTES DE IL15/IL18

Ejemplo 1

Como se muestra en la Figura 2, se evaluó el impacto de un anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativo, uno de los tres anticuerpos anti-PD1-mutant-IL-15 ilustrativos o la combinación del anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 y de cada una de las tres fusiones de anticuerpos

IL-15 mutantes sobre la liberación de IFNγ mediada por células T purificadas expuestas a una dosis subóptima de anti-CD3 (Pelicluster CD3, que es capaz de reticular CD3 y activar células T independientes de la unión FcγR) durante 72 horas. Para el anti-PD1-pro-IL-18, el artículo de prueba ilustrativo fue Fuse694, el cual incorpora un pro-IL-18 (IL18mutAS escindible de granzima B) en el botón u orificio C-terminal de una versión IgG1-LALA de nivolumab (Fuse691). Para el anti-PD1-mutant-IL-15, los tres artículos de prueba fueron Fuse765 (Figura 2A, triángulo abierto, línea punteada), Fuse773 (Figura 2B, triángulo abierto, línea punteada) y Fuse774 (Figura 2C, triángulo abierto, línea punteada), que incorporaron respectivamente un IL-15m4, IL15m9 o IL15m10 en el botón u orificio C-terminal de Fuse691. Las Figuras 2A-2C son gráficos x-y no lineales de la concentración del artículo de prueba versus la liberación de IFNγ.

En cada gráfico, (1) el anticuerpo específico de la lisozima de huevo de gallina (HEL, por sus siglas en inglés), anti-HEL (círculo gris), se usó como control del isotipo IgG1 humano y se asoció con la liberación de IFNγ de fondo. Se observó que Fuse691 (cuadrado abierto, línea punteada) induce una liberación leve de IFNγ en este sistema, lo que equivale a un valor máximo de aproximadamente 1200 pg/ml. Dirigirse a pro-IL-18 o cualquiera de los tres mutantes de IL-15 por separado a PD1 usando Fuse694, Fuse765, Fuse773 y Fuse774 dio como resultado solo en un aumento modesto en la liberación máxima de IFNγ observada en relación con Fuse691 con valores de aproximadamente 1.900 pg/ml, 3.000 pg/ml, 2.800 pg/ml y 1.700 pg/ml, respectivamente. En contraste, la combinación de Fuse765 más Fuse694 (triángulo negro), Fuse773 más Fuse694 (triángulo negro) y Fuse774 más Fuse694 (triángulo negro) dio como resultado valores máximos de liberación de IFNγ observados de aproximadamente 12.000 pg/ml, 11.500 pg/ml y 7.400 pg/ml, respectivamente. Estos valores corresponden a 4-6 veces el de anti-PD1-pro-IL-18 solo (Fuse694) y/o cualquiera de las variantes anti-PD1-mutante-IL15 (Fuse765, Fuse773 y Fuse774) lo que indica que el impacto combinado de dirigirse tanto a IL-

15 como IL-18 a PD1 en este sistema es sinérgico. Curiosamente, la liberación de IFN-EC50γ, aunque solo semicuantitativa para Fuse691 y las fusiones de citocinas individuales con anti-PD1, parecían agruparse con una diferencia de 2 a 3 veces entre sí.

Se muestra una tabla de síntesis de valores EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) en la Figura 2D.

Ejemplo 2

Como se muestra en la Figura 3, se evaluó el impacto de un anticuerpo anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativo, un anticuerpo anti-PD1-mutante-IL-15 ilustrativo y un anticuerpo anti-PD1 que incorpora tanto el pro-IL-18 ilustrativo como la IL-15 mutante mencionados anteriormente, sobre la liberación de IFNγ mediada por células T purificadas expuestas a una dosis subóptima de anti-CD3 (PeliCluster CD3, que es capaz de reticular CD3 y activar células T independientemente de la unión de FcγR) durante 72 horas. Para anti-PD1-pro-IL-18, el artículo de prueba ilustrativo fue Fuse694 (cuadrado negro). Para el anti-PD1-mutante-IL-15, el artículo de prueba ilustrativo fue Fuse696 (diamante negro), que incorporó un IL-15m2 en la botón u orificio C-terminal del anticuerpo LALA IgG1 humano anti-PD1, Fuse691 (cuadrado abierto, línea punteada). Por último, Fuse697 (triángulo negro), incorporó un pro-IL18 en el botón C-terminal y un IL-15m2 en el orificio C-terminal del Fuse691. La Figura 3 es un gráfico x-y no lineal de la concentración del artículo de prueba versus la liberación de IFNγ. El anticuerpo IgG1 humano, anti-HEL (círculo gris), se usó como control de isotipo y se asoció con la liberación de IFNγ de fondo. Se observó que Fuse691 (cuadrado abierto, línea punteada) induce una liberación leve de IFNγ en este sistema, lo que equivale a un valor máximo de aproximadamente 830 pg/ml. Dirigirse a pro-IL-18 solo en PD1 usando Fuse694 dio como resultado solo un aumento modesto en la liberación máxima de IFNγ observada en

relación con Fuse691 con un valor de aproximadamente 2000 pg/ml. Dirigirse a IL-15m2 solo a PD1 usando Fuse696 resultó en un aumento más pronunciado en la γ liberación máxima de IFN observada en relación con Fuse691 con un valor de aproximadamente 9.000 pg/ml. Fuse697 indujo unos valores máximos de γ liberación de IFN observados de aproximadamente 21.700 pg/ml, que es aproximadamente 11 veces mayor que el observado para Fuse694 y 2,5 veces mayor que el observado para Fuse696. Es importante destacar que la liberación máxima de IFNγ observada para Fuse697 fue mayor que la suma de los valores de liberación máxima de IFNγ asociados con Fuse694 más Fuse696, lo que indica que IL-15 e IL-18 actuaron de manera sinérgica cuando se coincorporaron en anti-PD1. Curiosamente, a diferencia de la liberación de EC50-IFNγ para la combinación de anti-PD1-pro-IL-18 y anti-PD1-mutante-IL15 en relación con Fuse691 y las fusiones de citocina individuales con anti-PD1, la liberación de EC50- IFNγ para Fuse697 obviamente se desplazó a la izquierda (más potente) al menos 30 veces en relación con Fuse691, Fuse694 o Fuse696. Se muestra una tabla de síntesis de valores EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 3

Como se muestra en la Figura 4, se evaluó la capacidad de un anticuerpo biespecífico NKG2D x ROR1 (bsAb) con o sin la incorporación de un mutante pro-IL18 e IL15 ilustrativo para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células NK y la liberación de IFNγ El bsAb NKG2D x ROR1 botón en ojal era IgG1 humana LALA (el bsAb parental sin citocinas incorporadas fue Fuse926) e incorporaba pro-IL18 (IL18mutAV escindible por granzima B) en el orificio N-terminal e IL15m9-1 en el orificio C-terminal (Fuse916). Las células NK enriquecidas se expandieron a partir de PBMC humanas (donante normal) y se usaron como células efectoras. Las células tumorales ROR1+ fueron

MDA-MB-231 que expresaban de manera estable luciferasa de luciérnaga y Egfp (MDA-GL). Las células NK se mezclaron con MDA-GL a una relación efector a diana (E:T) de 5:1 durante 48 horas. La eliminación de células tumorales se evaluó mediante la actividad de luciferasa y se midió la γ liberación de IFN en los sobrenadantes del cultivo vía ELISA. Las Figuras 4A y 4B son gráficos x-y no lineales de la destrucción de células tumorales versus la concentración del artículo de prueba y la liberación de IFNγ versus la concentración del artículo de prueba, respectivamente. En relación con Fuse926 (cuadrado negro), Fuse916 (triángulo negro) indujo ~ 50 % más de destrucción máxima y ~7 veces más liberación máxima de IFNγ. La potencia (definida como la eliminación de EC50 o la liberación de IFNγ de EC50) de Fuse916 también fue mejorada en relación con Fuse916 en los órdenes de 5 veces y >10 veces para la eliminación de células tumorales y la liberación de IFNγ, respectivamente. El Ab anti-HEL sirve como control de isotipo negativo y se usó Fuse923 (diamante negro), un bsAb γ9δ2-TCR x ROR1 que incorpora pro-IL18 e IL15m9-1 en la misma orientación como el artículo de prueba de incorporación de citocina no dirigida. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 4

Como se muestra en la Figura 5, se evaluó el impacto de dirigirse a una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 a NKG2D ilustrativo sobre la expansión de células NK en PBMC. Tanto la frecuencia como los números de células NK se midieron después de 12 días de incubación de PBMC de un donante humano sano con los artículos de prueba que se describen a continuación. Las células NK se definieron como células CD56+/ CD3-. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron Fuse 926 (diamante negro), que

consiste en un bsAb NKG2D x ROR1 y Fuse916 (triángulo negro), que consiste en el mismo bsAb pero también incorpora IL-15m9-1 y pro-IL18 (IL18mutAV escindible por granzima B). Se usó Fuse923 (cuadrado negro), una fusión de bsAb de citocinas similar a Fuse923 que se dirige a la región δ2 del TCR γ9δ2, como control no dirigido, y se usó anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo. Cabe destacar que todos los bsAb contenían la mutación LALA y, por lo tanto, no se unieron ni activaron el CD16 expresado en las células NK. Como tal, la expansión de las células NK se limitó al direccionamiento de las citocinas a NKG2D solo sin coligación de NKG2D y CD16, que se informó que mejoran la actividad de cada uno www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120678016. La Figura 5A y la Figura 5B son gráficos x-y de porcentajes de células NK y números de células NK medidos el día 12, respectivamente, ilustrados en función de una titulación de cada artículo de prueba. En relación con el Fuse926, 100 Nm de Fuse916 indujeron aproximadamente una expansión de 6 veces de las células NK.

Ejemplo 5

Como se muestra en la Figura 6, se evaluó el impacto de dirigirse a una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 a NKp46 ilustrativo sobre la expansión de células NK en PBMC. Tanto la frecuencia como los números de células NK se midieron después de 12 días de incubación de PBMC de un donante humano sano con los artículos de prueba que se describen a continuación. Las células NK se definieron como células CD56+/ CD3-. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron Fuse 943 (triángulo negro), que consiste en un Ab NKp46 monovalente que incorpora IL-15m9 y pro-IL18 (IL18mutAV escindible por granzima B). Fuse944 (cuadrado negro) se usó como control no dirigido en el que se omitió el aglutinante NKp46 del constructo. Fuse320 (diamante negro), un bsAb

NKp46 x EGFR que incorpora el mismo aglutinante de NKp46 pero ninguna citocina sirvió como control de citocinas objetivo/sin citocinas (nótese que no detectamos expresión de EGFR en PBMC; datos no mostrados) y anti-HEL (círculo gris) se usó como el control negativo de isotipo coincidente. Cabe destacar que todos los bsAb contenían la mutación LALA y, por lo tanto, no se unieron ni activaron el CD16 expresado en las células NK. Como tal, la expansión de las células NK se limitó al direccionamiento de las citocinas a NKp46 solo sin coligación de NKp46 y CD16, que se informó que mejoran la actividad de cada uno www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120678016. La Figura 6A y la Figura 6B son gráficos x-y de porcentajes de células NK y números de células NK medidos el día 12, respectivamente, ilustrados en función de una titulación de cada artículo de prueba. En relación con el Fuse320, 100 Nm de Fuse943 indujo aproximadamente una expansión de 5 veces de las células NK.

Ejemplo 6

Como se muestra en la Figura 7, se evaluó la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a γ9δ2 células T mediante una fusión de citocina con bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la expansión de γ9δ2 células T en PBMC humanas.

Tanto la frecuencia de γ9δ2 células como los números se midieron después de 12 días de incubación de PBMC de un donante humano sano con los artículos de prueba que se describen a continuación. Dado que ROR1 no se expresa en ninguna célula de PBMC (nótese que ROR1 se expresa en células pre-B en la médula ósea humana), la expansión observada se consideró independiente de la reticulación del TCR Vγ9Vδ2 mediante ROR1.

Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron fusiones de citocina a un bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 (Fuse966; diamante negro) que incorpora (1) IL-15m9-1

(Fuse968; cuadrado negro), (2) pro-IL18 (IL18mutAV escindible por granzima B) (Fuse967; triángulo inverso negro) y (3) IL-15m9-1 y pro-IL18. Fuse944 (triángulo abierto, línea punteada), se utilizó como el control no dirigido en el que se omitió del constructo el casete TCR Vγ9Vδ2 x ROR1. Se usó un anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo.

La Figura 7A y la Figura 7B son gráficos x-y de los porcentajes de γ9δ2 células T y los números de γ9δ2 células T medidos el día 12, respectivamente, ilustrados como una función de una titulación de cada artículo de prueba. En relación con el Fuse966, 100 Nm de Fuse923 indujeron aproximadamente una expansión de 12 veces de γ9δ2 células T.

Ejemplo 7

Como se muestra en la Figura 8, se evaluó la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a γ9δ2 células T mediante una fusión de citocina bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por γ9δ2 células T y la destrucción de células tumorales. El diseño del ensayo fue como tal: se mezclaron γ9δ2 células T enriquecidas/expandidas a partir de PBMC de un donante humano sano con la célula tumoral ROR1+, MDA-MB-231, que expresa de manera estable Egfp y lucerifasa de luciérnaga en una relación E:T de 5:1. Después de 48 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante la actividad de luciferasa (es decir, la viabilidad de las células tumorales) y se midió la γ liberación de IFN en el sobrenadante usando un protocolo ELISA estándar. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron fusiones de citocina a un bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 (Fuse966; triángulo inverso abierto, línea punteada) que incorpora (1) IL-15m9-1 (Fuse968; triángulo abierto, línea punteada), (2) pro-IL18 (IL18mutAV escindible por granzima B) (Fuse967; triángulo inverso negro) y (3) IL-15m9-1 y pro-IL18. Fuse944 (diamante negro), se usó como el control no

dirigido en el que se omitió del constructo el casete TCR Vγ9Vδ2 x ROR1. Se usó un anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 8A) o la liberación de IFNγ (Figura 8B). En relación con Fuse966, la incorporación de citocina(s) en el bsAb potenció tanto la destrucción de células tumorales como la liberación de IFNγ en el orden de rango de Fuse923>Fuse967>Fuse968>Fuse966 indicando que la combinación de IL-18 e IL-15 fue la más potente. La lectura diferencial entre los artículos de prueba fue más evidente para la liberación de IFNγ en comparación con la destrucción de células tumorales. Esto se debe probablemente a la elevada relación E:T de 5:1, en la que puede alcanzarse la máxima destrucción de células tumorales con un umbral de señalización de γ9δ2 células T más bajo que la liberación de IFNγ. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 8

Como se muestra en la Figura 9, se evaluó el impacto de dirigir una variante de IL-15 ilustrativa y una variante de IL18 ilustrativa a NKp30 más o menos NKp46 en la expansión de células NK de PBMC. Se midieron tanto la frecuencia como el número de células NK después de 21 días de incubación de PBMC de un donante humano sano con 100 Pm de los artículos de prueba que se describen a continuación. Las células NK se definieron como células CD56+/TCRαβ. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron Fuse 1147 (gris claro), que consiste en un anticuerpo biespecífico de botón en orificios con un brazo monovalente específico para NKp30 humano (Fab) y un brazo monovalente específico para ROR1 humano (VHH), ambos ubicados en el extremo N del botón (u orificio). El VHH específico para ROR1 se fusionó al extremo C de la LC específica de NKp30. El Fuse 1148 (gris oscuro) es idéntico al

Fuse1147, excepto que incluye un VHH específico de NKp46 en el extremo C del dominio CH3 (botón o agujero). El Fuse 1145 (puntos negros) es idéntico al Fuse1147 excepto que incluye una variante ilustrativa de IL-18 en el extremo N del orificio (o el botón si el fab específico de NKp30 está en el orificio) e IL-15m10-1 en el extremo C del orificio (o botón). El Fuse 1146 (rayas negras) es idéntico al Fuse1148 excepto que incluye una variante ilustrativa de IL-18 en el extremo N del orificio (o el botón si el fab específico de NKp30 está en el orificio) e IL-15m10-1 en el extremo N del orificio (o botón si el VHH específico de NKp46 está en el orificio). Por lo tanto, para simplificar, Fuse1147, Fuse118, Fuse1145 y Fuse1148 consisten en NKp30Xror1, NKp30Xror1xNKp46, NKp30Xror1-IL-18/IL-15 and NKp30Xror1xNKp46-IL-18/IL-15, respectivamente. En la Figura 9A se muestran gráficos de puntos citométricos de flujo de CD56 versus a TCRαβ. Se ha dibujado una caja alrededor de las células NK (células CD56+/TCRαβ) y la frecuencia de estas células se muestra a la izquierda de la caja. Los datos también se muestran gráficamente como un gráfico de barras en la Figura 9B. El anticuerpo específico anti-HEL (IgG1 humana LALA) se usó como el control de isotipo negativo. En relación con el control negativo y los reclutadores sin la inclusión de citocinas, Fuse1145 y Fuse1146 indujeron un aumento de la frecuencia de células NK en aproximadamente 8,5 veces y 13,7 veces, respectivamente. También medimos el número total de células NK asociadas al cultivo de PBMC con cada artículo de prueba (a 100 Pm). La expansión de pliegue de las células NK derivada de estos datos en relación con los observados para anti-HEL se muestra en la Figura 9C. No se observó expansión apreciable usando reclutadores sin la inclusión de citocinas. En contraste, Fuse1145 y Fuse1146 indujeron una expansión de aproximadamente 34 veces y 69 veces, respectivamente. Los datos indican que la adición de NKp46 dirigida a IL-18/IL-15 dirigida a NKp30 mejora la frecuencia y expansión de las células NK de las PBMC humanas.

Ejemplo 9

Como se muestra en la Figura 10, se evaluó la actividad agonista de VHH específico de γ9δ2 TCR fusionado al dominio Fc de IgG1 humana para inducir la lisis redirigida de células P815 transducidas de manera estable con Egfp y luciferasa de luciérnaga (P815) por γ9δ2 células T expandidas. El diseño del ensayo fue como tal: se mezclaron γ9δ2 células T enriquecidas/expandidas a partir de PBMC de un donante humano sano con la P815 en una relación E:T de 3:1. Después de 24 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante la actividad de luciferasa (es decir, la viabilidad de las células tumorales). Los gráficos x-y no lineales del porcentaje de destrucción en función de la concentración del artículo de prueba se muestran en las Figuras 10A-10B. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 10

Como se muestra en la Figura 11, se evaluó la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a γ9δ2 células T mediante una fusión de citocina bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por γ9δ2 células T y la destrucción de células tumorales. El diseño del ensayo fue como tal: Se mezclaron γ9δ2 células T enriquecidas/expandidas a partir de la PBMC de un donante humano sano con la célula tumoral ROR1+, Jurkat expresando de manera estable Egfp y ROR1 humano en una relación E:T de 3:1. Después de 72 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante fluorescencia de GFP (es decir, viabilidad de las células tumorales) y se midió la γ liberación de IFN en el sobrenadante usando un protocolo ELISA estándar. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron fusiones de citocina a un bsAb TCR Vγ9Vδ2 × ROR1 (Fuse1139; cuadrado negro) incorporando (1) IL-15m10-1

(Fuse1137; triángulo cerrado), (2) anti-IL18mutA (Fuse1138; triángulo inverso negro) y (3) IL-15m10-1 y pro IL18mutA (Fuse1136; círculo abierto, línea discontinua). Se usó un anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 11A) o la liberación de IFNγ (Figura 11B). En relación con Fuse1139, la incorporación de citocina(s) en el bsAb potenció tanto la destrucción de células tumorales como la liberación de IFNγ en el orden de rango de Fuse1136>Fuse1137>Fusee1138, lo que indica que la combinación de IL-18 e IL-15 fue la más potente. La lectura diferencial entre los artículos de prueba fue más evidente para la liberación de IFNγ en comparación con la destrucción de células tumorales. Esto se debe probablemente a la elevada relación E:T de 3:1, en la que puede alcanzarse la máxima destrucción de células tumorales con un umbral de señalización de γ9δ2 células T más bajo que la liberación de IFNγ. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 11

Como se muestra en la Figura 12, se evaluó la actividad agonista de la NKp46 humana (Figuras 12A-12B) y el VHH específico para NKp30 humano (Figura 12C) fusionado al dominio Fc de IgG1 humana para inducir lisis redirigida de células P815 transducidas de manera estable con Egfp y luciferasa de luciérnaga (P815) por γ9δ2 células T expandidas. El diseño del ensayo fue como tal: Se mezclaron células NK expandidas enriquecidos/expandidas a partir de las PBMC de un donante humano sano con el P815 en una relación E:T de 1:1 (Figura 12A). 2:1 (Figura 12B) y 3:1 (Figura 12C). Después de 24 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante la actividad de luciferasa (es decir, la viabilidad

de las células tumorales). Los gráficos x-y no lineales del porcentaje de destrucción en función de la concentración del artículo de prueba se muestran en las Figuras 12A-12C.

Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 12

Como se muestra en la Figura 13, se evaluó la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y/o una pro-IL18 ilustrativa dirigida a células NK humanas mediante una fusión de citocina con bsAb NKp46 × ROR1 para inducir la liberación de IFNγ mediada por células NK y la destrucción de células tumorales. El diseño del ensayo fue como tal: se mezclaron células NK enriquecidas/expandidas a partir de la PBMC de un donante humano sano con la célula tumoral ROR1+, Jurkat que expresa de manera estable Egfp y ROR1 humano en una relación E:T de 3:1. Después de 72 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante fluorescencia de GFP (es decir, viabilidad de las células tumorales) y se midió la liberación de IFNγ en el sobrenadante usando un protocolo ELISA estándar. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron fusiones de citocina a un bsAb NKp46 × ROR1 (Fuse1125; cuadrado negro) incorporando (1) IL-15m10-1 (Fuse1127; triángulo cerrado), (2) anti-IL18mutA (Fuse1126; triángulo inverso negro) y (3) IL-15m10-1 y pro IL18mutA (Fuse1124; círculo abierto, línea discontinua). Se usó un anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo. Se muestran gráficos x-y no lineales de una titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 13A) o liberación de IFNγ (Figura 13B). En relación con Fuse1125, la incorporación de citocina(s) en el bsAb potenció tanto la destrucción de células tumorales como la liberación de IFNγ en el orden de rango de Fuse1124>Fuse1127>Fusee1126, lo que indica que la

combinación de IL-18 e IL-15 fue la más potente. La lectura diferencial entre los artículos de prueba fue más evidente para la liberación de IFNγ en comparación con la destrucción de células tumorales. Es probable que esto se deba a la alta relación E:T de 3:1, en la que la máxima destrucción de células tumorales puede alcanzarse con un umbral de señalización de células NK más bajo que el de liberación de IFNγ. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 13

Como se muestra en la Figura 14, se evaluó la capacidad de una variante de IL-15 ilustrativa y una pro-IL18 ilustrativa dirigida a células NK humanas mediante una (1) fusión de citocina con bsAb NKp30 humano × ROR1 humano (Fuse1147 y Fuse1145) o (2) fusión de citocina con bsAb de ROR1 NKp30 × NKp46 (Fuse1148 y Fuse1146), para inducir la liberación de IFNγ mediada por células NK y la destrucción de células tumorales. El diseño del ensayo fue como tal: se mezclaron células NK enriquecidas/expandidas a partir de la PBMC de un donante humano sano con la célula tumoral ROR1+, Jurkat que expresa de manera estable Egfp y ROR1 humano en una relación E:T de 3:1. Después de 72 horas, se evaluó la citotoxicidad de las células tumorales mediante fluorescencia de GFP (es decir, viabilidad de las células tumorales) y se midió la liberación de IFNγ en el sobrenadante usando un protocolo ELISA estándar. Las proteínas de fusión de anticuerpos analizadas fueron un bsAb NKp30 × ROR1 (Fuse1147; cuadrado negro) un bsAb NKp30 × ROR1 fusionado a IL-15m10-1 y pro IL18mutA (Fuse1145; cuadrados abiertos, línea punteada), un bsAb NKp30 x NKp46 x ROR1 (Fuse1148; círculos negros) y un bsAb NKp30 x NKp46 x ROR1 fusionado a IL-15m10-1 y pro IL18mutA (Fuse1146; círculos abiertos, línea discontinua). Se usó un anti-HEL (círculo gris) como control negativo coincidente con el isotipo. Se muestran gráficos x-y no lineales de una

titulación de cada artículo de prueba en función de la destrucción de células tumorales (Figura 14) o la liberación de IFNγ (Figura 15). En relación con 1148, la incorporación de citocina(s) en el bsAb potenció tanto la destrucción de células tumorales como la liberación de IFNγ en el orden de rango de Fuse1145>Fuse1146>Fuse1147, lo que indica que (1) NKp30 x ROR1 fue más potente que NKp30 x NKp46 x ROR1 y la combinación de IL-18 e IL-15 mejoró la potencia. Se muestran tablas de síntesis de valores de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de cada gráfico x-y.

Ejemplo 14

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos usando medio Ficoll-Paque Plus. En breve, se colocaron suavemente 35 ml de sangre entera diluida (1 volumen de sangre entera vs. 1 volumen de PBS) sobre 15 ml de medio Ficoll-Paque Plus sin alterar la interfaz en un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugar durante 40 minutos a 400 × g a temperatura ambiente sin freno, se recolectó la capa regulada (capa de interfaz entre Ficoll y suero) y se diluyó en 5 volúmenes de PBS. Después de centrifugar durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente, las PBMC se resuspendieron en PBS y se lavaron una vez en PBS mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente. A continuación, las PBMC se resuspendieron en 5 ml de regulador de lisis ACK y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de glóbulos rojos. Después del período de incubación de 5 minutos, se añadieron 45 ml de PBS a las PBMC y se centrifugaron durante 15 minutos a 100 × g a temperatura ambiente. Por último, las PBMC se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina) para la configuración del ensayo de

citotoxicidad y liberación de IFN gamma. Para almacenar las PBMC para su uso posterior, las PBMC se granularon hacia abajo mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y después se resuspendieron en medio de congelación (90 % de FBS inactivado por calor y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO)) para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

Aislamiento y expansión de células NK

Las PBMC frescas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en regulador EasySep de StemCell a una densidad de 50 millones de células por ml en tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 50 ul de cóctel de aislamiento del kit de aislamiento de células NK de StemCell a 1 ml de suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después del período de incubación de 5 minutos, se añadieron 50 ul de RapidSpheres del kit de aislamiento de células NK a 1 ml de la mezcla de cóctel célula/anticuerpo. El volumen total de la mezcla célula/coctel/perlas se llevó hasta 25 o 50 ml con regulador EasySep y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en imán EASYSEP. Después del período de incubación de 10 minutos, la solución se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml manteniendo el tubo sobre el imán y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán EASYSEP. Se recolectó la solución con células NK purificadas. Las células NK recién purificadas se usaron para la expansión o se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Para expandir las células NK, se añadió 1x 500 µl de material de recubrimiento de expansión celular NK ImmunoCult™ del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a una placa de 24 pocillos tratada en cultivo no tisular y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Durante la incubación de 2 horas, las células NK recién aisladas se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión

de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 1 millón por ml. Después de la incubación de 2 horas, la placa se lavó dos veces con PBS y se añadieron 500 µl de suspensión de células NK (0,5 millones de células NK) a un pocillo de la placa recubierta de 24 pocillos. La placa se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 3 días y se añadieron 500 µl de medio de expansión celular ImmunoCult NK al pocillo con células NK. La placa se incubó adicionalmente durante otros 4 días. En el día 7, las células NK se recolectaron por centrífuga a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 0,2 millones por ml. Se añadió 1 ml de células NK recolectadas (0,2 millones de células NK) a un pocillo de nueva placa recubierta de 24 pocillos y se incubó durante 4 días a 37 °C con 5 % de CO2. En el día 11, las células NK se recolectaron nuevamente por centrifugación a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 0,2 millones por ml. Se añadió 1 ml de células NK recolectadas (0,2 millones de células NK) a un pocillo de nueva placa recubierta de 24 pocillos y se incubó durante otros 3 días a 37 °C con 5 % de CO2. Las células NK después de 14 días de expansión se recolectaron y se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Aislamiento de células T

Las PBMC frescas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en regulador EasySep de StemCell a la densidad de 50 millones de células por ml en tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 50 ul de cóctel de aislamiento del kit de aislamiento de células T de StemCell a 1 ml de suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación de 5 minutos, se añadieron 50 ul de RapidSpheres del kit de aislamiento de células T a 1 ml de la mezcla de cóctel célula/anticuerpo. El volumen total

de la mezcla célula/coctel/perlas se llevó hasta 25 o 50 ml con regulador EasySep y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en imán EASYSEP. Después de 10 minutos de incubación, la solución se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml manteniendo el tubo en el imán y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán EASYSEP. Se recolectó la solución con células T purificados. Las células T recién purificadas se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Expansión de células T Gamma 9 delta 2

Las PBMC se recuperaron a partir de nitrógeno líquido, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina) a la densidad de 0,5 millones de células por ml de medio. Se añadieron 5 UM IPP y 1000 U/ml de IL-2 (concentración final) a las PBMC y se incubó durante 7 días. Al final de la incubación de 7 días, se midió el porcentaje de células T gamma 9 delta 2 mediante citometría de flujo. las células T gamma 9 delta 2 después de 7 días de expansión se recogieron y se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

P815 ensayo de lisis redirigido

El día de la preparación de las placas de ensayo, se recolectan células P815 que expresan EgfP y luciferasa de luciérnaga y se realiza un recuento celular mediante exclusión con azul tripán en un contador de células y se ajusta la densidad de células viables a 2x10^5 células/ml en medio RPMI1640 completo con 10 % de FBS inactivado por calor, aminoácido no esencial, piruvato de sodio y pen/strep 1x. Añadir 50 ul de suspensión de células diana a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano, transparente y negro usando una pipeta multicanal para obtener una densidad de siembra de 10.000 células/pocillo. Preparar el artículo de prueba diluyéndolo en serie (dilución en serie de 3, 5 u 8 veces) en medio RPMI1640 completo a una concentración de 4x la concentración

final y añadir 50 ul de la preparación del artículo de prueba 4x a los pocillos designados. Después de incubar la placa durante 30 minutos a 37 °C con 5 % de CO_2, recolectar las células efectoras (células NK expandidas o células T gamma 9 delta 2 expandidas) para realizar un recuento celular mediante exclusión con azul tripán en un contador de células y ajustar las células efectoras a la densidad deseada. Añadir 100 ul de suspensión de células efectoras a la célula P815 EgfP Flu con artículos de prueba para llevar el volumen final a 200 ul, centrifugar brevemente la placa e incubar la placa durante el tiempo deseado a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final de la incubación, retirar las placas de la incubadora, girar durante 30s a 300 x g, y retirar 150 ml de sobrenadante usando una pipeta multicanal. Aclimatar la solución de ensayo de luciferasa ONE-Glo de Promega a temperatura ambiente antes de usar, agregar 50 ul de solución One-Glo a cada pocillo con células, incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y medir la intensidad de la bioluminiscencia (RLU). El porcentaje de destrucción de células diana en cada muestra se obtuvo usando el grupo de células diana solas como 0 % de destrucción y el grupo de PBMC solas como 100 % de destrucción [porcentaje de destrucción de la muestra = (RLU de célula diana sola – RLU de muestra)/(RLU de célula diana sola – RLU de PBMC solas)*100]. Después se obtuvieron EC50 de destrucción y Emáx mediante el uso de ajuste de curado de regresión no lineal de 4 parámetros incorporado en GRAPHPAD PRISM 8. **Ensayo de activación de células T cebadas con anticuerpos Pelicluster CD3**

Se recuperaron células T aisladas del nitrógeno líquido y se resuspendieron en medio de cultivo completo RPMI1640 (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina). La viabilidad de las células también se determinó mediante exclusión con azul tripán y la densidad de células T viables se ajustó a 1,33 millones de células/ml en medio de cultivo completo RPMI1640. Se añadieron 75 ul de 0,67 millones de

células/ml de suspensión de células T (100.000 células T) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos. El anticuerpo Pelicluster CD3 (clon de anticuerpo CD3 antihumano de ratón CLB-T3/4.E 1XE) se preparó en medio de cultivo completo RPMI1640 a una concentración de 4 veces la concentración final y se añadieron 75 ul del anticuerpo Pelicluster CD3 preparado a las células en el pocillo designado en la placa de 96 pocillos. Se prepararon proteínas FUSE y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio completo RPMI1640 de 200 NM a 2,56 PM. Después se añadieron 150 ul de proteínas FUSE preparadas en diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células T y se incubaron durante el período de tiempo dedicado (72 horas) a 37 °C con 5 % de CO2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 ×g para transferir el sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para el ensayo de liberación de IFN gamma.

Ensayo de citotoxicidad

El día anterior a la configuración del ensayo, se eliminaron los antibióticos selectivos de las células diana (células FLUC MDA-MB-231 EgfP). El día de la configuración del ensayo, las células diana se recolectaron mediante un breve tratamiento TrypLE y después se lavaron con medio de cultivo mediante centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las líneas celulares diana se resuspendieron en medio de cultivo para determinar la viabilidad celular mediante exclusión azul tripano en Cellometer. La densidad celular viable se ajustó a 50.000 células/ml en medios de cultivo. Se dispensaron cuidadosamente 100 ul de suspensión celular diana (5000 células diana) a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos usando una pipeta multicanal. Después se incubó la placa durante 4-5 horas en incubadora de cultivo tisular para asegurar que las células diana se hayan adherido al fondo de la placa de 96 pocillos.

Las células NK expandidas o las células T gamma 9 delta 2 se sedimentaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio de cultivo. También se determinó la viabilidad de las células mediante exclusión con azul tripán y la densidad de células NK o T gamma 9 delta 2 viables se ajustó a 0,25 millones de células/ml en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Después de 4-5 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente de placas de 96 pocillos con células diana. Se añadieron 100 ul de 0,25 millones de células/ml de suspensión de células NK o T gamma 9 delta 2 (25.000 células) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con célula diana, lo que daría como resultado una relación E:T de 5:1.

Las proteínas FUSE se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 NM a 2,56 PM. Después se añadieron 100 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células efectoras y células diana y se incubaron durante el período de tiempo dedicado (48 horas) a 37 °C con 5 % de CO2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 ×g para transferir 50 ml de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para el ensayo de liberación de IFN gamma. La solución de ensayo de luciferasa de ONE-Glo se llevó a temperatura ambiente. Después se añadieron 50 ul de solución One-Glo al pocillo designado y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se midió la bioluminiscencia (IFU) en un lector de placas con protocolo de bio-luminancia preestablecido. La destrucción de la célula diana se calculó usando la fórmula [Porcentaje de destrucción de la muestra de ensayo = (IFU de

muestra con PBMC y célula diana–- IFU de muestra de prueba)/(IFU de muestra con PBMC y célula diana–- IFU de muestra con PBMC sola)*100].

Detección de liberación gamma IFN

La liberación gamma de IFN a partir del ensayo de citotoxicidad se midió usando el kit de detección ELISA de IFN gamma humano. En breve, el anticuerpo de recubrimiento proporcionado en el kit se diluyó a la concentración sugerida siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. Se añadieron 100 ul de anticuerpo de recubrimiento diluido a la placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp. Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron entonces 4 veces con el Regulador de Lavado. Para bloquear la unión no específica y reducir el fondo, se añadieron 200 ml de diluyente de ensayo A 1×, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después de bloquear, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 ml/pocillo de patrones (preparados con medio de cultivo) o muestras a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (400 rpm). Después de la incubación de 2 horas con muestras o patrones, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de anticuerpo de detección para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 1 hora con anticuerpo de detección, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de avidina-HRP para incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas (400 rpm). Después de 30 minutos de incubación con avidina-HRP, las placas se lavaron 5 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB recién mezclada para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Después se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para

detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas y la concentración de IFN gamma en cada muestra se volvió a calcular usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferente concentración de patrones.

Ensayo de expansión de células NK o células T gamma delta

Las PBMC se recuperaron a partir de nitrógeno líquido, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina) a la densidad de 2 millones de células por ml de medio. Se añadieron 500 ul de 2 millones de células/ml de suspensión de PBMC al pocillo designado en la placa de 48 pocillos, lo que daría como resultado 1 millón de células por pocillo.

Las proteínas FUSE se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 100 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina que varía de 200 nM a 0,2 pM. Después se añadieron 500 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 48 pocillos con PBMC y se incubaron durante el período de tiempo dedicado (12 días) a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final del periodo de incubación se contó el número total de células en cada pozo y también se recogieron las células de cada pozo para verificar el porcentaje de células NK o células T gamma 9 delta 2 por citometría de flujo. El número de células NK o número de células T gamma 9 delta 2 se calculó multiplicando el porcentaje de células NK o células T gamma 9 delta 2 por el número total de células.

EJEMPLOS DE VARIANTES DE IL-15

Ejemplo 15

Como se muestra en la Figura 17, se evaluó la actividad funcional de una serie de variantes de IL-15 para activar las células indicadoras IL-2 HEK-Blue. En este sistema, la unión

de IL-2Rβ e IL-2Rβ por IL-15 induce la expresión y secreción de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), que se codifica en la corriente abajo de IL-2 HEK-Blue de un elemento promotor transcripcional STAT-5. Las Figuras 17A-17C son diagramas de dispersión x-y de liberación SEAP (OD a 630 nm) versus la concentración del artículo de prueba. A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las variantes de IL-15 se fusionaron al botón C-term de un botón en ojal en la versión de nivolumab. Nivolumab (FUSE691; círculos cerrados grises) sirvió como control negativo, mientras que IL-15 humana recombinante (cuadrados cerrados negros) sirvió como control positivo. IL-2 HEK Blue no expresa PD-1. Como tal, toda la actividad relacionada con IL-15 medida fue consecuencia de una actividad no dirigida o "trans". Encontramos que todas las variantes de IL-15 fueron atenuadas en relación con la IL-15 humana recombinante. La mayoría de las variantes formaron un grupo con una potencia (liberación SEAP EC50) entre aproximadamente 40 PM y 300 PM, lo que representa un grado de atenuación entre aproximadamente 11 veces y 80 veces. En la figura 17A, se identificaron dos variantes de IL-15 incorporadas en FUSE773 (triángulos cerrados) y FUSE774 (triángulos cerrados invertidos), respectivamente, como apreciablemente más atenuadas en relación con el grupo de variantes mencionado anteriormente. En relación con la IL-15 humana recombinante, FUSE773 y FUSE774 fueron aproximadamente 2000 y 4000 veces menos potentes, respectivamente. No se observó actividad apreciable del control negativo, FUSE691. En la Figura 17B, se identificaron cuatro variantes adicionales de IL-15 incorporadas en FUSE803 (hexágonos abiertos) y FUSE846 (triángulos cerrados) y FUSE847 (triángulos invertidos cerrados) como apreciablemente más atenuadas en relación con el grupo de variantes mencionado anteriormente en la Figura 17A. Se observó que FUSE848 (triángulos rellenos grises) no presentaba actividad funcional apreciable. En relación con la IL-15 humana recombinante,

FUSE803, FUSE846 y FUSE847 fueron aproximadamente 1500, 5000 y 52.000 veces menos potentes, respectivamente. No se observó actividad apreciable del control negativo, FUSE691.

En la Figura 17C, se identificaron dos variantes adicionales de IL-15 incorporadas en FUSE849 (estrellas cerradas) y FUSE853 (cuadrados abiertos), como apreciablemente más atenuadas en relación con el grupo de variantes mencionado anteriormente en la Figura 17A. Se observó que FUSE850 (triángulos rellenos grises) tenía poca o ninguna actividad funcional. En relación con la IL-15 humana recombinante, FUSE849 y FUSE853 fueron aproximadamente 55.000 y 800 veces menos potentes, respectivamente. No se observó actividad apreciable del control negativo, FUSE691. Debajo de cada diagrama de dispersión x-y se muestran tablas de síntesis de actividad máxima (Emáx), EC50 y AUC (área bajo la curva). En la Figura 17C, dos variantes adicionales de IL-15 incorporadas en FUSE849 (estrellas cerradas) y FUSE853 (cuadrados abiertos), se identificaron como apreciablemente más atenuadas en relación con el grupo de variantes mencionado anteriormente en la Figura 17A. Se observó que FUSE850 (triángulos rellenos grises) tenía poca o ninguna actividad funcional. En relación con la IL-15 humana recombinante, FUSE849 y FUSE853 fueron aproximadamente 55.000 y 800 veces menos potentes, respectivamente. No se observó actividad apreciable del control negativo, FUSE691. Debajo de cada diagrama de dispersión x-y se muestran tablas de síntesis de actividad máxima (Emáx), EC50 y AUC (área bajo la curva).

Ejemplo 16

Como se muestra en la Figura 18, se evaluó la capacidad de una serie de variantes de IL-15 para activar células T humanas purificadas en presencia de una baja concentración “subóptima” del clon de anticuerpo anti-CD3, CLB-T3/4.E, denominado

Pelicluster CD3. Este anticuerpo IgE de ratón puede entrecruzarse y activar CD3 humano en solución (es decir, no requiere inmovilización). La liberación de IFNγ después de 72 horas de cocultivo se usó como lectura de la activación de las células T. La Figura 18A y la Figura 18B son gráficos de dispersión x-y que ilustran la concentración de IFNγ en el sobrenadante de cultivo versus la concentración del artículo de prueba. A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las variantes de IL-15 se fusionaron al botón C-term de un botón en ojal en la versión de nivolumab. El anticuerpo específico de la lisozima del huevo de gallina (HEL) sirvió como control negativo (círculos cerrados negros). Nivolumab (FUSE691; círculos cerrados grises) sirvió como artículo de prueba que no incorporaba IL-15 para fines de comparación. La IL-15 humana recombinante (cuadrados cerrados negros) sirvió como control positivo. Se observó que el orden de rango de potencia para las variantes de IL-15 (fusionadas a nivolumab) era FUSE696 > FUSE765 (hexágono abierto) > FUSE773 (triángulo cerrado) > FUSE774 (triángulo invertido cerrado) y todos indujeron una mayor magnitud de liberación de IFNγ que FUSE691 (nivolumab). Esto indica que el direccionamiento de IL-15 a PD-1 mediante la unión de IL-15 a nivolumab aumenta la capacidad de nivolumab para activar las células T. El hecho de que FUSE773 y FUSE774 se atenuaran apreciablemente en relación con la IL-15 humana recombinante (disminución >30 veces de la potencia [liberación de IFNγ EC50] y hasta un 50 % de reducción en la liberación máxima de IFNγ) es coherente con los datos obtenidos usando HEK Blue IL-2 en la Figura 18. Se muestran tablas de síntesis debajo de cada diagrama de dispersión x-y de actividad máxima (Emáx), EC50 y AUC (área bajo la curva).

Ejemplo 17

Como se muestra en la Figura 19, se evaluó la capacidad de una serie de variantes de IL-15 para activar células T humanas purificadas en presencia de células dendríticas (DC)

alógenas. Es decir, se aislaron células T de un donante humano sano distinto de un segundo donante sano del cual se inmovilizaron DC de PBMC usando GM-CSF e IL-4. La liberación de IFNγ después de 96 horas de cocultivo se usó como lectura de la activación de las células T. La figura 16A es un diagrama de dispersión x-y que representa la concentración de IFN γ en el sobrenadante de cultivo versus la concentración del artículo de prueba. A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las variantes de IL-15 se fusionaron al botón C-term de un botón en ojal en la versión de nivolumab. El anticuerpo específico de la lisozima de huevo de gallina (HEL) sirvió como control negativo (círculos cerrados grises). Nivolumab (FUSE691; círculos cerrados grises) sirvió como artículo de prueba que no incorporaba IL-15 para fines de comparación. La IL-15 humana recombinante (cuadrados cerrados negros) sirvió como control positivo. Se observó que el orden de rango de potencia para las variantes de IL-15 (fusionadas a nivolumab) era FUSE696 (triángulo abierto) > FUSE691 (nivolumab). Esto indica que la orientación de IL-15 a PD-1 mediante la unión de IL-15 a nivolumab mejora la capacidad de nivolumab para activar las células T y es consistente con los datos obtenidos usando Pelicluster CD3 en la Figura 19A. Se muestra una tabla resumida debajo de cada diagrama de dispersión x-y de la actividad máxima (Emáx), EC50 y AUC (área bajo la curva).

Ejemplo 18

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos usando medio Ficoll-Paque Plus. En breve, 35 ml de sangre completa diluida (1 volumen de sangre completa vs 1 volumen de PBS) se superpuso suavemente sobre 15 ml de medio Ficoll-Paque Plus sin alterar la interfaz en un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugar durante 40 minutos a 400 × g a temperatura ambiente sin freno, se recolectó la capa regulada (capa de interfaz entre

Ficoll y suero) y se diluyó en 5 volúmenes de PBS. Después de centrifugar durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente, las PBMC se resuspendieron en PBS y se lavaron una vez en PBS mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente. A continuación, las PBMC se resuspendieron en 5 ml de regulador de lisis ACK y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de glóbulos rojos. Después del período de incubación de 5 minutos, se añadieron 45 ml de PBS a las PBMC y se centrifugaron durante 15 minutos a 100 × g a temperatura ambiente. Por último, las PBMC se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina) para la configuración del ensayo de citotoxicidad y liberación de IFN gamma. Para almacenar las PBMC para su uso posterior, las PBMC se granularon hacia abajo mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y después se resuspendieron en medio de congelación (90 % de FBS inactivado por calor y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO)) para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

Aislamiento de células T

Las PBMC frescas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en regulador EasySep de StemCell a la densidad de 50 millones de células por ml en tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 50 ul de cóctel de aislamiento del kit de aislamiento de células T de StemCell a 1 ml de suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación de 5 minutos, se añadieron 50 ul de RapidSpheres del kit de aislamiento de células T a 1 ml de la mezcla de cóctel célula/anticuerpo. El volumen total de la mezcla célula/coctel/perlas se llevó hasta 25 o 50 ml con regulador EasySep y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en imán EASYSEP. Después de 10 minutos de incubación, la solución se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml manteniendo el tubo en el imán y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán EASYSEP. Se recolectó

la solución con células T purificados. Las células T recién purificadas se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Generación de células dendríticas

Las PBMC frescas se resuspendieron en medio AIM V a la densidad de 5 millones por ml y se añadieron 40 ml de suspensión de PBMC a un matraz de cultivo celular estéril T-174. Los matraces se incubaron en una incubadora humidificada mantenida a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 2 horas. Después de 2 horas de incubación, las células no adherentes se retiraron golpeando firmemente el matraz y aspirando completamente el medio en el matraz. Se añadieron inmediatamente 40 ml de medio AIM-V a las células adherentes con 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml IL-4 a cada matraz de cultivo celular T-150 que contenía los monocitos adherentes. Los matraces se colocaron en una incubadora humidificada a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 7 días. Después del período de cultivo de 7 días, las DC se cosecharon, se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-2 con proteínas FUSE

Las células HEK-BLUE-IL-2 de InvivoGen se mantuvieron en medio de cultivo (medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 2 MM de L-glutamina, 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS, por sus siglas en inglés), 100 U/ML de penicilina, 100 µg/ML de estreptomicina, 100 µg/ML de normocina, 1 µg/ML de puromicina y 1× reactivo HEK-Blue CRL). Las células IL-2 HEK-BLUE™ se diseñan genéticamente a partir de la línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK293, por sus siglas en inglés) para expresar de manera estable genes que codifican el CD25 (también conocido como IL-2Rα), CD122 (IL-2Rβ) y CD132 (IL-2Rγ) y expresan un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por el transductor de señales y el activador de la transcripción 5 (STAT5), por lo tanto son útiles para la detección de IL-2 o IL-15 bioactivas mediante el monitoreo de la activación de las vías

STAT5 a través de la cuantificación en el sobrenadante del nivel de SEAP (que se produce tras la activación de STAT5) con una solución como la solución QUANTI-BLUE™.

El día de la configuración del experimento, las células HEK-BLUE-IL-2 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-2 desprendidas se resuspendieron en un medio de prueba precalentado (DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 2 MM de L-glutamina, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina) a una densidad de 3×10^5 células por ml. Para sembrar las células (50.000 células por pocillo), se añadieron 180 µl de células HEK-Blue-IL-2 resuspendidas a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos.

Para la prueba de actividad de la proteína FUSE, las proteínas FUSE se diluyeron en un medio de prueba (DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 2 MM de L-glutamina, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) de 1600 NM a 0,8 PM (10× de la concentración final) mediante dilución serial 8 veces. La IL-15 también se diluyó en el medio de prueba desde 10 NM hasta 0,3 PM (10× de la concentración final) mediante dilución serial 8 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-2, se añadieron 20 ML de proteínas IL-15 o FUSE preparadas a los pocillos designados con 50.000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con las proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Después del período de incubación de activación de 24 horas, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-2 que contenía la fosfatasa alcalina secretada a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución QUANTI-Blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 80 ml de la solución QUANTI-Blue preparada a la placa de 96

pocillos con 20 ml de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-2 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-2 se detectó midiendo la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro. **Ensayo de cocultivo de células T y células dendríticas (MLR)**

Se generaron células dendríticas a partir de monocitos en PBMC con 800 U/ml GM-CSF y 500 U/ml IL-4. Se mezclaron células T alógenas de PBMC con células dendríticas en la proporción de 10:1 en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se añadieron 100K células T con 10K células dendríticas en 150 ul de medio a los pocillos en placa de 96 pocillos. Las proteínas FUSE se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 NM a 2,56 PM. Después se añadieron 150 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células T y células dendríticas y se incubaron durante 72 horas a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 × g para transferir 250 ml de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para la detección de liberación de IFN gamma.

Ensayo de activación de células T cebadas con anticuerpos Pelicuster-CD3

Las células T se resuspendieron en medio RPMI1640 con 10 % de FBS, 1 % de penicilina/estreptomicina y 40 ng/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 humano, derivado del clon CLB T3/4.E en 1XE (pelicluster CD3) a una densidad de 0,667 millones por ml. Se añadieron 100K de células T en 150 ul de medio a los pocillos en una placa de 96 pocillos. Las proteínas FUSE o IL-15 se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de

penicilina/estreptomicina en el rango de 200 NM a 2,56 PM. Después se añadieron 150 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células T y se incubaron durante 72 horas a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 × g para transferir 250 ml de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para la detección de liberación de IFN gamma.

Detección de liberación gamma IFN

La liberación de IFN gamma a partir de diferentes ensayos se midió usando el kit de detección ELISA de IFN gamma humano. En breve, el anticuerpo de recubrimiento proporcionado en el kit se diluyó a la concentración sugerida siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. Se añadieron 100 ul de anticuerpo de recubrimiento diluido a la placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp. Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron entonces 4 veces con el Regulador de Lavado. Para bloquear la unión no específica y reducir el fondo, se añadieron 200 ml de diluyente de ensayo A 1×, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después de bloquear, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 ml/pocillo de estándares (preparados con medio de cultivo) o muestras a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (400 rpm). Después de la incubación de 2 horas con muestras o patrones, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de anticuerpo de detección para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 1 hora con anticuerpo de detección, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de

solución diluida de avidina-HRP para incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas (400 rpm). Después de 30 minutos de incubación con avidina-HRP, las placas se lavaron 5 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB recién mezclada para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Después se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas y la concentración de IFN gamma en cada muestra se volvió a calcular usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferente concentración de patrones.

EJEMPLOS DE IL-18

Ejemplo 29

La Figura 20 muestra ilustraciones ejemplares de proteínas de fusión pro-IL-18 (Figuras 20B-20C, 20E-20F, 20I-20J, 20L-20M) y proteínas de fusión de control (sin pro-IL-18; Figuras 20A, 20D, 20G-H, 20K). Todas las proteínas incorporan una estructura de IgG humana que es IgG1 homodimérica silvestre como en las Figuras 20D, 20G y 20J o que comprende un Fc de IgG1 heterodimérica de botón en ojal (KIH, por sus siglas en inglés) (Figuras 20A-20C, 20E-20F, 20H-20I, 20J-20M). A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los dominios Fc de IgG1 conservan la capacidad silvestre para unirse a Fc γ Rs y, por lo tanto, pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) mediada por efectores y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés). El pro-IL-18, cuando se incluye en la proteína de fusión se fusiona como (a) un casete singular al extremo C-terminal de la cadena de botón (u orificio) (Figuras 20B, 20E, 20I y 20L) o (b) como casetes singulares tanto en los extremos C-terminales del botón como en las cadenas de orificios (Figuras 20C, 20F, 20J y 1M). Los sitios de escisión, cuando están

presentes en el casete pro-IL-18, se indican como una forma de estrella. Un dominio de unión al antígeno asociado a tumores (TAA, por sus siglas en inglés), cuando está presente, se fusiona como un único casete al extremo N-terminal de una cadena de botón (u ojal) (Figuras 20A, 20B, 20C, 20K-20M), o ambas cadenas (Figuras 20D-20J) de la KIH. El dominio de unión a TAA puede ser un VHH (p. ej., el clon 9G8 específico de EGFR; Figuras 20A-20F) o un fab (p. ej., clon C225 específico de EGFR de cetuximab; Fig. 20G-20M).

En algunas modalidades, el extremo N-terminal del dominio CH1 de una proteína IgG1 heterodimérica de botón en ojales (KIH) se fusionó con el extremo C-terminal de un fab o VHH anti-EGFR. El N-terminal de la proteína KIH consistía en (a) un solo VHH a en el botón HC N-terminal (Figura 20A), (b) una sola fab en el botón HC N-terminal (Figura 20K) o (c) una fab en el botón HC N-terminal y el ojal HC (Figura 20H). En algunas modalidades, el extremo N-terminal del dominio CH1 de una proteína IgG1 homodimérica se fusionó con el extremo C-terminal de un fab o VHH. En algunas modalidades, el N-terminal de la proteína IgG1 consistió en (a) un VHH en ambos HC de N-terminal (Figura 20D) y (b) un fab en ambos HC de N-terminal (Figura 20G). En algunas modalidades, el N-terminal de un pro-IL-18mut2AV se fusionó con el C-terminal del dominio CH3 de cadena pesada (HC) con botón de una proteína IgG1 heterodimérica de botones en ojales (KIH). El N-terminal de las fusiones Fc consistía en (a) un clon VHH en el botón HC N-terminal (Figura 20B), (b) un único fab en el botón HC N-terminal (Figura 20L) o (c) un VHH en el botón HC N-terminal y en el ojal HC (Figura 20E) o (d) un fab en el botón HC N-terminal y en el ojal HC (Figura 20I). En todos los casos, un sitio de escisión, cuando estaba presente (p. ej., el sitio de escisión de Granzima B, IEQD), se insertó dentro del propéptido IL-18 en lugar del sitio de escisión endógeno de la Caspasa 1. En algunas modalidades, el N-terminal de pro-IL-18mut2AV se fusionó con el C-terminal del dominio CH3 del botón HC y el ojal HC de una proteína IgG1 heterodimérica de botones en ojales (KIH). El N-

terminal de las fusiones de Fc consistió en (a) un solo VHH en el botón HC N-terminal (Figura 20C) y (b) una sola fab en el botón HC N-terminal (Figura 20M). En todos los casos, se insertó un sitio de escisión, cuando estaba presente, dentro del propéptido IL-18. En algunas modalidades, el N-terminal de pro-IL-18mut2AV se fusionó con el C-terminal del dominio CH3 de la proteína IgG1 homodiméricos. El N-terminal de las fusiones de Fc consistió en (a) un VHH en ambos HC de N-terminal o (b) un fab en ambos HC de N-terminal (Figura 20M). En todos los casos, se insertó un sitio de escisión, cuando estaba presente, dentro del propéptido IL-18.

Ejemplo 20

Como se muestra en la Figura 21, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo) y FUSE686 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo) para inducir (1) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por PBMC de la línea celular EGFR+, MDA-MB-231 (Figura 21A) y (2) liberación de IFNγ mediada por PBMC (Figura 21B). Para FUSE686, pro-IL-18 se fusionó al C-terminal FUSE556. El pro-IL-18 incorpora un propéptido mutante aguas arriba de IL-18 para enmascarar/atenuar la actividad de IL-18. En la presente memoria demostramos que tal motivo de enmascaramiento de variante de propéptido redujo enormemente la actividad trans de la proteína, en algunos casos en >100.000 veces, en comparación con la IL-18 silvestre.

Para determinar la capacidad de la pro-IL-18 para aumentar la liberación de ADCC/ IFNγ dependiente de EGFR cuando se suministra tanto a EGFR (células tumorales) como a células CD16+ (células NK) como una proteína de fusión, mezclamos PBMC recién aisladas con EGFR+ MDA-MB-231 diseñado para expresar luciferasa de luciérnaga durante 48 horas en presencia de FUSE556 (círculos cerrados negros), FUSE686 (círculos abiertos negros, línea discontinua), o el anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina de control negativo (anti-HEL; círculos cerrados grises). La relación PBMC:diana de tumor fue

de 10:1. Sin embargo, dado que las células NK median la ADCC y se encuentran a una frecuencia media de aproximadamente 10 %, la relación efectiva NK: diana tumoral fue de aproximadamente 1:1. FUSE686 fue más potente (EC50-destrucción) que FUSE556 (>350 veces) e indujo una mayor destrucción máxima (~ 40 % más alta). Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. Con relación a la liberación de IFNγ FUSE686 fue más potente (liberación de EC50- IFNγ) que FUSE556 (>300 veces) e indujo una mayor liberación máxima de IFNγ (~3,5 veces mayor). Dado que anteriormente se encontró que la pro-IL-18 tenía poca o ninguna actividad cuando no estaba dirigida (trans-actividad), interpretamos los resultados como que indican que la pro-IL-18, cuando se dirige a CD16 a través de IgG1 silvestre, puede unirse al complejo IL-18R cuando se une muy cerca de él (es decir, CD16 en la misma célula). Tal actividad dirigida/relacionada con la proximidad se ha definido anteriormente como que ocurre en cis.

Ejemplo 21

Como se muestra en la Figura 22, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo; se dirige tanto a EGFR como a FcγR), y a la combinación (1:1, equivalencia molar) de FUSE566 y FUSE422 (IgG1-pro-IL-18; solo se dirige a FcγR) para inducir (1) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por PBMC de la línea celular EGFR+, MDA-MB-231 (Figura 22A) y (2) liberación de IFNγ mediada por PBMC (Figura 22B). Para FUSE422, la pro-IL-18 se fusionó al C-terminal del dominio Fc de IgG1. En la presente memoria se muestra que FUSE422 está > 100.000 veces atenuada en trans en comparación con IL-18 silvestre.

Para evaluar la capacidad de pro-IL-18 para aumentar la liberación de ADCC/IFNγ dependiente de EGFR inducida por FUSE566 cuando se suministra conjuntamente a células

CD16+ (células NK) como Fc-Pro-IL-18 (FUSE422), mezclamos PBMC recién aisladas con EGFR+ MDA-MB-231 diseñado para expresar luciferasa de luciérnaga durante 48 horas en presencia de FUSE556 (círculos cerrados negros), la combinación molar 1:1 de FUSE556 y FUSE422 (círculos abiertos negros, línea discontinua), solo FUSE422 (cajas abiertas negras; línea discontinua) o el anticuerpo específico de la lisozima de huevo de gallina de control negativo (anti-HEL; círculos cerrados grises). La relación PBMC:diana de tumor fue de 30:1. Sin embargo, dado que las células NK median la ADCC y se encuentran a una frecuencia media de aproximadamente 10 %, la relación efectiva NK: diana tumoral fue de aproximadamente 3:1.

La combinación de FUSE556 y FUSE422 fue más potente (EC50-destrucción) que FUSE556 (>250 veces) e indujo una mayor destrucción máxima (~ 100 % más alta). Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. Ni FUSE422 ni anti-HEL indujeron la destrucción mediada por PBMC apreciable (NK) de MDA-MB-231. FUSE422 indujo un pequeño grado de destrucción (< 5 % de destrucción máxima en relación con la combinación de FUSE556 y FUSE422). Esto probablemente se debió a la focalización de las células NK “alorreactivas” de tal manera que el pequeño grado de destrucción dependía de la “falta de uno mismo” y/o la expresión de ligandos para receptores de activación tal como NKG2D. De hecho, se ha informado que MDA-MB-231 expresa MIC-B, un ligando para NKG2D (ver, p. ej., onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.28174; www.nature.com/articles/bjc201779; link.springer.com/article/10.1007/s12192-014-0532-5)

Los resultados relacionados con la liberación de IFNγ fueron similares a la citotoxicidad excepto que FUSE422 no indujo liberación de citocinas sobre fondo o el anticuerpo anti-HEL de control negativo. La combinación de FUSE556 y FUSE422 fue más potente (EC50-destrucción) que FUSE556 (>150 veces) e indujo una mayor destrucción

máxima (~ 700 % más alta). Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba.

Tomados junto con los resultados de la Figura 21, nuestros datos indican que la pro-IL-18, cuando se dirige a CD16 mediante IgG1 silvestre, ya sea como una fusión Fc sola (sin capacidad ADCC intrínseca) o una fusión Fc dirigida a EGFR (se une tanto CD16 como EGFR para inducir ADCC), puede unirse y activar el complejo IL-18R en cis.

Ejemplo 22

Como se muestra en la Figura 23, se evaluó el impacto de dirigirse pro-IL-18 a PD1 en la activación de células T purificadas de un donante humano sano cuando se mezcla con DC de un segundo donante humano sano en una relación T:DC de 10:1. Como lectura de activación se usó la liberación de IFNγ a las 72 horas de cocultivo. Las DC se diferenciaron in vitro de PBMC usando GM-CSF e IL-4 durante 7 días. Se ensayaron las siguientes proteínas: IL-18 recombinante humana (control positivo; estrellas negras cerradas), FUSE691 (nivolumab; círculos cerrados negros), FUSE645 (EGFR dirigido a IgG1-Pro-IL-18; no dirigido en este sistema; círculos cerrados grises-línea discontinua) y FUSE694 (nivolumab-pro-IL-18; círculos abiertos negros-línea discontinua). De acuerdo con nuestro hallazgo usando la línea celular indicadora HEK-Blue-IL-18 como se describe en la presente memoria, la pro-IL-18 de activación trans usada en la FUSE645 no dirigida se atenuó enormemente en relación con la IL-18 recombinante humana tanto como un grado de potencia (~ 1000 veces diferencia en la liberación de EC50- IFNγ) como la liberación máxima de IFNγ (~ 10 veces). Dirigir pro-IL-18 a PD1 a través de la fusión de pro-IL-18 al C-terminal de nivolumab (FUSE694) dio como resultado un aumento de aproximadamente 2 veces y 20 veces en la potencia en relación con FUSE645 y FUSE691 (nivolumab), respectivamente. Es importante destacar que la liberación máxima de IFNγ

mediada por células T inducida por FUSE694 aumentó 7 veces y 3,5 veces en relación con FUSE645 y FUSE691 (nivolumab), respectivamente. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. Estos datos indican que aunque la pro-IL-18 es en gran medida no funcional cuando no está dirigida (es decir, actúa en trans), cuando se entrega a PD1 y por lo tanto se coloca muy cerca del complejo IL-18R expresado por las células T PD1+ aumenta la liberación de IFNγ, nuestra medida de la activación de las células T en este sistema. Como se describió anteriormente para la focalización de CD16, los datos apoyan la acción pro-IL-18 en cis cuando se dirige a células T que coexpresan PD1 y el complejo IL-18R. Dado que se ha informado que las células T PD1+ dentro de TIL constituyen una fracción importante de las células T específicas del tumor dentro de los tumores, la actividad cis dependiente de PD1 relacionada con la pro-IL-18 puede promover el potencial citotóxico, proliferación, supervivencia y formación de memoria de células T específicas del tumor sin la activación indiscriminada de otras células que puedan contribuir a la toxicidad sistémica.

Ejemplo 23

Como se muestra en la Figura 24, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), y FUSE516 (VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo) para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por PBMC (ADCC) de la línea celular EGFR+, MDA-MB-231. Para FUSE516, la pro-IL-18 incluyó el sitio de escisión de Granzima B, IEQD, dentro del propéptido de tal manera que además de la actividad relacionada con cis dirigida a CD16 de pro-IL-18, la exposición a Granzima B (liberada por las células NK que median ADCC) liberaría la forma madura activa (18 kDa) de IL-18. Las PBMC recién aisladas se mezclaron junto con MDA-MB-231 diseñado para expresar luciferasa de luciérnaga durante 48 horas en presencia de FUSE556 (círculos cerrados negros), FUSE516

(círculos abiertos negros, línea discontinua), FUSE442 (control IgG1-pro-IL-18 no dirigido; círculos cerrados grises) o el anticuerpo específico de la lisozima de huevo de gallina de control negativo (anti-HEL; círculos cerrados grises). El ensayo se repitió con PBMC de cuatro donantes humanos normales diferentes como se indica en las Figuras 24A-24D. La relación PBMC:diana de tumor fue de 30:1. Sin embargo, dado que las células NK median la ADCC y se encuentran a una frecuencia media de aproximadamente 10 %, la relación efectiva NK: diana tumoral fue de aproximadamente 3:1. Para todos los donantes, FUSE516 fue más potente (EC50-destrucción) que FUSE556 (variando de ~ 100 veces a >1000 veces) e indujo una mayor destrucción máxima (que oscila entre aproximadamente 30 % y 800 % más alta). Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba.

Ejemplo 24

Como se muestra en la Figura 25, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo; círculos cerrados negros) y FUSE516 (anti-EGFR VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18 de un solo brazo; círculos abiertos negros, línea discontinua) para inducir varias lecturas mediadas por PBMC recién aisladas en cocultivo con la línea celular EGFR+, MDA-MB-231 después de 48 horas de cocultivo a una E:T de 30:1. Esto corresponde a una relación efectiva de dianas NK: tumor de aproximadamente 3:1. FUSE442 (control IgG1-pro-IL-18 no dirigido; círculos cerrados grises) y el anti-HEL (círculos cerrados grises) se usaron como controles negativos. Las lecturas funcionales fueron los siguientes: (a) ADCC (FIG. 25A), liberación de IFNγ (Figura 25B), liberación de Granzima B (Figura 25C) y liberación/consumo de IL-18 (Figura 25D). Observamos potente destrucción mediada por PBMC y liberación de IFNγ inducida por FUSE516. Para ADCC, liberación de IFNγ y liberación de Granzima B, la potencia (destrucción de EC50, liberación de EC50-IFNγ liberación de EC50-granzima B,

respectivamente) asociada con FUSE516 fue >200 veces, >50 veces, ~50 veces mayor que FUSE556. La inducción máxima para cada lectura fue de aproximadamente 100 % (ADCC), 500 % (IFNγ) y 250 % (Granzima B) para FUSE516 vs. FUSE556. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. El control pro-IL-18 no dirigido, FUSE442, indujo una destrucción muy mínima de las células diana (destrucción de EC50 >25 nM y destrucción máxima <6 %), que era independiente de ADCC y probablemente relacionada con el reconocimiento de ligandos para el (los) receptor(es) de activación de NK que se sabe que se expresan en MDA-MB-231 tal como MICA/B (Shen et al., Cell Death and Disease. 2017) o menor grado de alorreactividad mediada por células T.

También medimos la magnitud de IL-18 liberada en el sobrenadante del ensayo descrito anteriormente. Aquí, la línea celular indicadora de IL-18, HEK-Blue-IL-18, se expuso a sobrenadantes de ensayo y se midió la actividad SEAP como un sustituto de la actividad de IL-18. La Figura 25D ilustra los resultados de tal manera que FUSE516 (círculos abiertos negros, línea discontinua) que incorpora un sitio de escisión Granzima B entre su dominio Fc e IL-18 pero no FUSE556 (círculos cerrados negros) liberó IL-18 de una manera dependiente de la dosis en cocultivo con PBMC y MDA-MB-231. Para estimar el grado de IL-18 consumido por las células NK durante el proceso ADCC, añadimos rhIL-18 al cocultivo PBMC/célula tumoral/FUSE556 (círculos cerrados grises). Aquí observamos una disminución dependiente de la dosis FUSE556 en IL-18 en el sobrenadante del ensayo. Dado que FUSE516 indujo una fuerte destrucción de células tumorales y liberación de IFNγ, interpretamos que los datos indican que las células NK expuestas a FUSE516 consumen más IL-18 que las expuestas a FUSE556. Como tal, es probable que se subestime la magnitud de IL-18 que se estima que será liberada por FUSE516 en la Figura 24D.

Ejemplo 25

Como se muestra en la Figura 26, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo), y variantes de pro-IL-18 fusionadas al extremo C de FUSE566 con diferentes sitios de escisión de proteasa entre el dominio Fc y pro-IL-18 para inducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por PBMC de la línea celular EGFR+, MDA-MB-231. Los diferentes sitios de proteasa ensayados en la Figura 26A fueron granzima A (FUSE658), granzima B (FUSE516), MMP2/9 (FUSE659), y la combinación de granzima A, granzima B y MMP2/9 (FUSE660). Se esperaría que la Granzima A y B fueran liberadas por las células NK que median ADCC mientras que MMP2 se ha reportado como expresada/secretada por MDA-MB-231 (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5661385). También se probó FUSE627 que contiene la mutación PGLALA en el dominio Fc para abolir el direccionamiento a FcγR (Figura 26B) y, por lo tanto, abrogar el puente entre las células FcγR+ NK y las células tumorales EGFR+, que es el impulsor de ADCC en el sistema reportado.

Para evaluar el impacto de los sitios de escisión de proteasas antes mencionados sobre la capacidad de la pro-IL-18 para aumentar la ADCC dependiente de EGFR, mezclamos PBMC recién aisladas con células EGFR+ MDA-MB-231 diseñadas para expresar luciferasa de luciérnaga durante 48 horas en presencia de cualquiera de FUSE556 (círculos cerrados negros; Figuras 26A-26B), FUSE658 (diamantes negros abiertos, línea discontinua; Figura 26A), FUSE516 (cajas abiertas negras; línea discontinua; Figuras 26A-26B), FUSE659 (triángulos abiertos negros; líneas discontinuas; Figura 26A), FUSE660 (estrellas negras cerradas, líneas discontinuas; Figura 26A) o el anticuerpo específico de la lisozima de huevo de gallina de control negativo (anti-HEL; cuadrados grises). La relación diana PBMC: tumor fue de 30:1 (Figura 26A) o 10:1 (Figura 26B). Dado que las células NK median ADCC y se

encuentran a una frecuencia media de aproximadamente 10 %, la relación efectiva NK: diana tumoral fue de aproximadamente 3:1 (Figura 26A) y 1:1 (Figura 26B).

Como se ve en la Figura 26A, encontramos que el orden de rango de potencia de destrucción en lo que se refiere al/a los sitio(s) de escisión fue (1) la combinación de granzima A, granzima B y MMP2/9 (FUSE660), que era aproximadamente 2 veces mayor que tanto (2) granzima B (FUSE516) y (3) MMP2/9 (FUSE659), mientras que era aproximadamente 3-veces mayor que (4) granzima A (FUSE658). El orden de rango en lo que se refiere a la destrucción máxima fue el mismo excepto que Granzima B (FUSE516) fue mayor que MMP2/9 (FUSE659). En cada caso, la diferencia en la destrucción máxima entre cada artículo de prueba fue de aproximadamente 10 %. Que la combinación de sitios de escisión para los tres de Granzima A, Granzima B y MMP2/9 fuera superior a cualquier sitio de escisión individual por sí solo es consistente con la actividad trans inducible de pro-IL-18. Para semicuantificar el grado de destrucción celular tumoral dependiente de IL-18 mediado en trans en ausencia de puente efector a tumor, comparamos FUSE516 con FUSE627 (Figura 26B). FUSE627 es idéntico a FUSE516 excepto que contiene la mutación PGLALA reportada para abrogar la unión de IgG1 a FcγR pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578889. Como tal, el dominio pro-IL-18 en FUSE627 no está dirigido a FcγR expresado en células NK y no actúa en cis. Además, FUSE627 no puede unir FcγR expresadas en células NK con EGFR expresado en MDA-MB-231. Cualquier actividad asociada con FUSE627 (triángulos invertidos abiertos grises) se interpretaría como derivada de la actividad trans de la IL-18 madura liberada de la pro-IL-18 o Granzima B liberada. Tal liberación de Granzima B probablemente resultaría de la interacción de células NK ‘‘alo-reactivas’’ con células tumorales MDA-MB-231 que (a) no expresan moléculas HLA a las que se educaron las células NK y/o (b) expresan MIC-B, un ligando

para el receptor de activación, NKG2D; www.nature.com/articles/bjc201779; link.springer.com/article/10.1007/s12192-014-0532-5). Entonces se esperaría que la liberación dependiente de la alorreactividad de la Granzima B libere IL-18 madura y, a su vez, aumente la destrucción mediada por NK de la diana alogénica MDA-MB-231

A menos que se especifique de cualquier otra manera, en el contexto de una proteína de fusión IL-18 descrita en esta invención, cualquier interacción entre IL-18 y su ligando, el complejo receptor de IL-18, que no dependa de una porción dirigida para facilitar la interacción entre IL-18 y su receptor en proximidad cercana, se considera una interacción trans; y en contraste, se considera que ocurre en cis cualquier interacción entre IL-18 dentro de una proteína de fusión IL-18 y su receptor que requiera la porción dirigida también dentro de la proteína de fusión para facilitar una interacción entre IL-18 y su receptor. En tal interacción basada en cis, la molécula dirigida (p. ej., PD-1) se expresa en la misma célula que el complejo IL-18R (p. ej., una célula NK). En términos generales, en biología celular, el término "cis" se refiere a la interacción entre dos moléculas tales como las proteínas expresadas en la misma célula. Por ejemplo la interacción entre B7-1 y PD-L1 en las células T es una interacción cis. Para las proteínas multiespecíficas, las que se unen a dos proteínas en la misma célula simultáneamente también se denominan que tienen una interacción cis. En biología celular, el término "trans" se refiere a la interacción entre dos moléculas tal como proteínas en diferentes células. Por ejemplo, la interacción entre la interacción prototípica del Receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) y su ligando, un complejo MHC-I/péptido, es una interacción trans. Para las proteínas multiespecíficas, aquellas que se unen a una proteína en una célula y una segunda proteína en una célula separada, es decir, formando un "puente" entre las dos células, se considerarían como ocurridas en trans. Además, se acepta que la interacción entre una proteína soluble y una proteína de superficie celular, aunque no forma un puente celular,

cae dentro de la definición de una interacción trans. En el panorama terapéutico, las proteínas solubles que interactúan naturalmente con su ligando en trans a menudo se diseñan para ser de una afinidad tan baja que ya no se unen a su ligando a menos que se acerquen a él a través de una porción dirigida que se une a otra proteína en la misma célula. Este escenario permite la actividad dirigida a células de la proteína soluble y se categoriza como una interacción cis.

Como se observó anteriormente, FUSE516 fue más potente (EC50-destrucción) que FUSE556 (~ 10 veces) e indujo una destrucción máxima mayor (~ 15 % más alta). En contraste, se observó que FUSE627 induce una destrucción muy débil consistente con el aumento de citotoxicidad alorreactiva "de fondo" que da como resultado la de pequeñas cantidades de Granzima B en el medio, que después puede liberar IL-18 completamente activa de FUSE627. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba.

Ejemplo 26

Como se muestra en la Figura 27, se evaluó la capacidad de FUSE556 (VHH 9G8-IgG1 anti-EGFR de un solo brazo; círculos cerrados negros) y FUSE516 (anti-EGFR VHH 9G8-IgG1-pro-IL-18 de un solo brazo; círculos abiertos negros, línea discontinua) para inducir dos lecturas (ADCC y liberación de IFNγ) mediadas por células NK expandidas en cocultivo con la línea celular EGFR+, MDA-MB-231 después de 48 horas de cocultivo en relaciones E:T de 1:1 y 1:5. También se probó una relación E:T de 5:1, y arrojó resultados similares a 1:1 y no se muestra. El anticuerpo anti-HEL (círculos cerrados grises) se utilizó como control negativo y no se observó actividad funcional con esta proteína. Las lecturas funcionales fueron los siguientes: (a) ADCC (Figuras 27A y 27B) y liberación de IFNγ (Figuras 27C y 27D). Las poblaciones

efectoras de células NK se expandieron a partir de PBMC aisladas de dos donantes sanos distintos. El dato que se muestra se calcula con base en el promedio de los dos donantes.

En ambas relaciones E:T, FUSE516 fue más potente que FUSE556. Para ADCC, (a) la diferencia de potencia entre FUSE516 y FUSE556 fue aproximadamente 60 veces y (b) la diferencia en destrucción máxima entre FUSE516 y FUSE556 osciló entre 30-50 %.

Para la liberación de IFNγ la diferencia en (a) potencia entre FUSE516 y FUSE556 osciló entre 40 veces y >130 veces y puede ser modestia inversamente relacionada con E:T y (b) la liberación máxima de IFNγ entre FUSE516 y FUSE556 osciló entre 250 % y 380 %. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. FUSE516 se representa como círculos abiertos y FUSE556 como cuadrados cerrados. En este análisis se incluyen los valores de EC50 para la destrucción y liberación de IFNγ obtenidos usando una relación E:T de 5:1. Estos datos generados usando células NK expandidas de >95 % de pureza (datos no mostrados) son muy similares a los observados con PBMC como células efectoras (ver la Figura 25), proporcionando así soporte de que las células efectoras dentro de las PBMC que median la destrucción de dianas tumorales y liberan IFNγ son células NK. La diferencia en la magnitud de la liberación de IFNγ entre FUSE516 y FUSE566 es impresionante y sugiere que FUSE516 puede promover una mayor actividad antitumoral no solo a través de ADCC sino también a través de la promoción de la inmunidad innata y adaptativa, incluida la presentación de antígenos tumorales y la destrucción de transeúntes.

Ejemplo 27

Como se muestra en la Figura 28, se evaluó la capacidad de FUSE555 (Fab C225-IgG1-pro-IL-18 anti-EGFR de doble brazo; círculos abiertos negros, línea discontinua) y cetuximab (cuadrados negros cerrados) para inducir dos lecturas (ADCC y liberación de IFNγ) mediadas por PBMC recién aisladas en cocultivo con la línea celular

EGFR+, MDA-MB-231 después de 40 horas de cocultivo en una relación E:T de 2:1. El anticuerpo anti-HEL (círculos cerrados grises) se utilizó como control negativo y no se observó actividad funcional con esta proteína. Las lecturas funcionales fueron los siguientes: (a) ADCC (Figura 28A) y liberación de IFNγ (Figura 28B). Las poblaciones efectoras de células NK se expandieron a partir de PBMC aisladas de dos donantes sanos distintos. El dato que se muestra se calcula con base en el promedio de los dos donantes.

Para ADCC, (a) la diferencia de potencia entre FUSE555 fue aproximadamente 3 veces más potente que Cetuximab y (b) la destrucción máxima inducida por FUSE555 fue aproximadamente 40 % mayor que Cetuximab.

Para la liberación de IFNγ (ver la Figura 28B), la diferencia en (a) potencia entre FUSE555 y cetuximab fue aproximadamente 3 veces y (b) la liberación máxima de IFNγ asociada con FUSE555 fue aproximadamente 200 % mayor en relación con cetuximab. FUSE555 se representa como círculos abiertos y Cetuximab como cuadrados cerrados. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. La diferencia en la magnitud de liberación de IFNγ entre FUSE555 y Cetuximab es altamente apreciable. Dado que el IFNγ puede afectar la actividad antitumoral al promover respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, potencialmente consideramos que FUSE555 es un terapéutico muy superior en comparación con Cetuximab. FUSE555 puede promover una mayor actividad antitumoral no solo a través de ADCC sino también a través de la promoción de la inmunidad innata y adaptativa, incluida la presentación de antígenos tumorales y la destrucción de transeúntes.

Ejemplo 28

Como se muestra en la Figura 29, se evaluó la capacidad de FUSE624 (anti-HER2 Fab IgG1-pro-IL-18 de doble brazo (círculos negros abiertos, línea discontinua) y trastuzumab (cuadrados cerrados negros) para inducir dos lecturas (ADCC y liberación de IFNγ) mediadas por PBMC recién aisladas en cocultivo con la línea celular HER2+, T47D después de 24 horas de cocultivo en una relación E:T 5:1. El anticuerpo anti-HEL (círculos cerrados grises) se utilizó como control negativo y no se observó actividad funcional con esta proteína. Las lecturas funcionales fueron los siguientes: (a) ADCC (Figura 29A) y liberaciónγ de IFN (Figura 29B).

Para ADCC, FUSE624 fue (a) aproximadamente 30 veces más potente que trastuzumab y (b) la destrucción máxima fue aproximadamente 2 veces mayor que trastuzumab.

Para la liberación de IFNγ (a) FUSE624 fue aproximadamente 10 veces más potente que trastuzumab y (b) la liberación máxima de IFNγ inducida por FUSE624 fue aproximadamente 16 veces mayor que trastuzumab. FUSE624 se representa como círculos abiertos y trastuzumab como cuadrados cerrados. Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de potencia y actividad máxima para los artículos de prueba. La diferencia en la magnitud de liberación de IFNγ entre FUSE624 y trastuzumab es muy impresionante. Dado que el IFNγ puede afectar la actividad antitumoral al promover respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, potencialmente consideramos que FUSE624 es un terapéutico muy superior en comparación con trastuzumab. FUSE624 puede promover una mayor actividad antitumoral no solo a través de ADCC sino también a través de la promoción de la inmunidad innata y adaptativa, incluida la presentación de antígenos tumorales y la destrucción de transeúntes.

Ejemplo 29

Como se muestra en la Figura 30, se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-PDL1 que incorpora una variante pro-IL-18amut2, diseñado de manera que no pueda ser escindido por granzima B, para inducir la liberación de IFNγ mediada por células T. En este contexto, cualquier mejora de la liberación de IFNγ en relación con el impacto del anti-PDL1 solo (atezolizumab) se interpreta como el resultado de (1) una interacción basada en cis entre pro-IL-18amut2 y el complejo IL-18R expresado en células T activadas con PD-L1+ y/o (2) pro-IL-18amut2 decoradas en células T activadas PD-L1+ que interactúan con complejos IL-18R en células T IL-18R+ vecinas. El sistema de ensayo usado consistió en células T humanas preactivadas durante 72 horas con perlas recubiertas con CD3/CD28 para regular positivamente la expresión de PDL1 (y PD1) mezcladas con MDA-MB-231 (ROR1+) expresando de manera estable luciferasa de luciérnaga y EgfP a una relación E:T de 10:1 y 10 pM de un bsAb ROR1 x CD3 (Fuse608). Fuse608 sirvió para crear una sinapsis artificial entre las células T y las células tumorales ROR1+ y entregar una señal subóptima a través del complejo TCR/CD3 que resultó en la liberación de IFN de fondoγ. Se calculó 10 pM como la concentración de Fuse608 para inducir 20 % de liberación máxima de IFNγ. Se añadió una titulación de los siguientes artículos de prueba al sistema de cocultivo de células T/células tumorales antes mencionado y se midió la liberación de IFNγ después de 48 horas: (1) atezolizumab (círculos cerrados negros), (2) Fuse882 (cuadrado abierto, línea discontinua) que consiste en un solo pro-IL-18amut2 no escindible fusionado a el botón C-terminal de un botón en ojales versión IgG1 humana de atezolizumab, (3) Fuse895 que consiste en un solo pro-IL-18amut2 no escindible fusionado al N-terminal botón de un botón en ojales versión IgG1 humana de atezolizumab monovalente mediante la cual el fab anti-PDL1 se fusionó al ojal N-terminal (círculos abiertos, línea discontinua) o (4) un anticuerpo anti-HEL (círculos grises) que servía como el isotipo coincidente de control negativo. Como

se muestra en el diagrama x-y no lineal que representa la concentración del artículo de prueba frente a la magnitud de liberación de IFNγ se observó una mejora altamente apreciable de la liberación de IFNγ con Fuse895 en relación con atezolizumab en los órdenes de aproximadamente 4 veces y 3 veces para la liberación máxima de IFNγ y la potencia (EC50) de liberación de IFNγ respectivamente. Una tabla de síntesis de EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) se muestra debajo de la trama x-y.

Ejemplo 30

Como se muestra en la Figura 31A-31B, se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-PD1, incorporando una de las dos variantes pro-IL-18 (pro-IL18amut2 o pro-IL18amut9), diseñado de manera que no pueda ser escindido por granzima B, para inducir la destrucción de células tumorales mediada por células T (Figura 31A) y la liberación de IFNγ (Figura 31B). En este contexto, cualquier mejora de la destrucción de células tumorales y la liberación de IFNγ en relación con el impacto del anti-PD1 solo se interpreta como el resultado de una interacción basada en cis entre pro-IL-18 y el complejo IL-18R expresado en células T activadas PD-1+. El sistema de ensayo usado consistió en células T humanas purificadas mezcladas con MDA-MB-231 (ROR1+) que expresan de manera estable luciferasa de luciérnaga y eGFP en una relación E:T de 10:1 y 10 pM de un bsAb ROR1 x CD3 (Fuse608). Como se describió anteriormente, Fuse608 sirvió para crear una sinapsis artificial entre las células T y las células tumorales ROR1+ y entregar una señal subóptima a través del complejo TCR/CD3.

Se añadió una titulación de artículos de prueba al sistema de cocultivo de células T/células tumorales antes mencionado. La destrucción de células tumorales y la liberación de IFNγ se midieron después de 72 horas. Los artículos de prueba evaluados fueron: (1) Anti-PD-1 con pro-IL-18amut2 incorporado en el botón de C-terminal (Fuse783; cuadrado cerrado), (2)

anti-PD-1 con pro-IL-18amut2 incorporado en el orificio de N-terminal (Fuse1042; triángulo inverso cerrado), (3) anti-PD-1 con pro-IL-18amut9 incorporado en el orificio de N-terminal (Fuse1044; triángulo cerrado), (4) anti-PD1 (Fuse1041; triángulo abierto, línea discontinua) y (5) Fuse1015 (triángulo inverso abierto, línea discontinua), que era equivalente a Fuse1042 excepto específico para PD-1 de ratón y, por lo tanto, sirvió como el control pro-IL-18amut2 no dirigido. Se usó un anticuerpo anti-HEL (círculo cerrado gris) como control negativo emparejado con isotipo. La Figura 31A es el diagrama x-y no lineal que ilustra la concentración del artículo de prueba versus la magnitud de la destrucción de células tumorales. En relación con el anti-PD-1 solo, se observó que los tres artículos de prueba que incorporan pro-IL-18 inducen entre 60-80 % más de destrucción (basada en Emáx), con el pro-IL-18amut9 el más potente. La Figura 31B es un diagrama x-y no lineal que ilustra la concentración del artículo de prueba versus la magnitud de liberación de IFNγ. En este contexto, los tres artículos de prueba que incorporaban pro-IL-18 indujeron una liberación de IFNγ más fuerte en relación con el anti-PD-1 solo que varió en actividad potenciada entre 8-11 veces (basado en Emáx) y al menos 3-10 veces (basado en EC50). Según se observó para la destrucción de células tumorales, el pro-IL-18amut9 fue el más potente.

Ejemplo 31

Como se muestra en la Figura 32, se evaluó la capacidad de varias variantes de IL-18 para inducir la liberación no dirigida basada en trans de SEAP a partir de HEK-Blue-IL-18. Como se indicó anteriormente, HEK-Blue-IL-18 expresa el complejo receptor de IL-18 humana y responde a la exposición a IL-18 mediante la liberación de SEAP debido a la integración de un transgén que codifica SEAP aguas abajo de un promotor mínimo AP1/NFκB. Se cultivaron HEK-Blue-IL-18 con una titulación de artículos de prueba durante 24 horas. Los artículos de prueba

examinados fueron las siguientes variantes de IL-18 fusionadas a una cadena principal de IgG1-LALA dirigida a PD-1 usando el parátopo de nivolumab: IL18mut2 (Fuse832; triángulo abierto, línea discontinua), IL18mut2R (Fuse1116; triángulo cerrado inverso), IL18mut13 (Fuse1109; cuadrado cerrado), IL18mut14 (Fuse1110; círculo abierto, línea discontinua), IL18mut15 (Fuse1111; cuadrado abierto, línea discontinua) e IL18mut16 (Fuse1112; círculo cerrado). Se usó TNFα (círculo gris cerrado) como control negativo y se usó IL-18 humana recombinante como compuesto de referencia (estrella gris). Basado en el diagrama x-y no lineal mostrado, el orden de rango de liberación SEAP inducida por IL-18 fue Fuse832>Fuse1116>Fuse1109>Fuse1111/Fuse1112>>>Fuse1110. La referencia de IL-18 recombinante humana exhibió actividad similar a Fuse832. Debajo del gráfico se muestra una tabla resumida de EC50 para los artículos de prueba.

Ejemplo 32

Como se muestra en la Figura 33A y 33B, se evaluó la capacidad de varias variantes de IL-18 dirigidas a PD-1 humana para inducir la liberación basada en cis de IFNγ de PBMC humanas derivadas de un donante humano sano (Figura 33A) o células T humanas (Figura 33B). Para la Figura 33A, las PBMC se trataron activadas con el anticuerpo específico CD3, pelicluster CD3, durante 48 horas para inducir la regulación positiva de la expresión de PD-1. Después del lavado, estas PBMC se cultivaron en una titulación de artículos de prueba en presencia de una concentración subóptima de pelicluster CD3 e IFNγ liberado en el sobrenadante evaluado después de 72 horas. Los artículos de prueba examinados fueron las siguientes variantes de IL-18 fusionadas a una cadena principal de IgG1-LALA dirigida a PD-1 usando el parátopo de nivolumab: IL18mut2 (Fuse1017; triángulo abierto inverso, línea discontinua), IL18mut2R (Fuse1116; triángulo

inverso cerrado), IL18mut13 (Fuse1109; cuadrado cerrado), IL18mut14 (Fuse1110; círculo abierto, línea discontinua), IL18mut15 (Fuse1111; cuadrado abierto, línea discontinua) e IL18mut16 (Fuse1112; círculo cerrado). Se usó el anticuerpo específico anti-HEL (círculo cerrado gris) como control emparejado de isotipo negativo y se añadió IL-18 humana recombinante como referencia no dirigida (estrella gris). Basado en la trama x-y no lineal mostrada, el orden de rango de liberación de IFNγ inducida por IL-18 fue Fuse1116 > Fuse1017 >Fuse1109>Fuse1111/Fuse1112>>>Fuse1110. La actividad dirigida PD-1 de Fuse1116 y Fuse1017 fueron ambas mayores que la referencia de IL-18 recombinante humana, mientras que Fuse1109, Fuse1112 y Fuse1112 fueron similares en actividad a la referencia de IL-18 recombinante humana y Fuse1110, basada en la $EC50_{IFN\gamma\text{-liberación}}$ fue >30 veces más débil que la referencia de IL-18 recombinante humana. Debajo de la gráfica se muestra una tabla resumida de EC50 y la actividad máxima para los artículos de prueba. Para la Figura 33B, las células T se mezclaron con MDA-MB-231 diseñado para expresar altos niveles de superficie celular de ROR1 humano a una E:T de 5:1 en una valoración de artículos de prueba en presencia de una concentración subóptima de un anticuerpo biespecífico ROR1 x CD3 equivalente al 20 % de actividad máxima (10 pM de Fuse608) e IFNγ liberado en el sobrenadante evaluado después de 72 horas. Los artículos de prueba examinados fueron las siguientes variantes de IL-18 fusionadas a una cadena principal de IgG1-LALA dirigida a PD-1 usando el parátopo de nivolumab: IL18mut2 (Fuse1017; triángulo abierto inverso, línea discontinua), IL18mut9 que contiene un propéptido mutante atenuante 10.000 veces en el N-terminal de la citocina madura (Fuse1044; triángulo inverso cerrado), IL18mut2 que contiene un propéptido mutante atenuante 10.000 veces en el N-terminal de la citocina madura (Fuse1042; cuadrado cerrado), IL18mut13 que contiene un polipéptido atenuante 100 veces en el extremo N de

la citocina madura (Fuse1177; círculo abierto, línea discontinua) y Fuse691 (nivolumab biosimilar; círculo cerrado negro). El anticuerpo específico anti-HEL (círculo cerrado gris) se usó como control emparejado de isotipo negativo. Basado en la trama x-y no lineal mostrada, el orden de rango de liberación de IFNγ inducida por IL-18 fue Fuse1017 >Fuse1044>Fuse1042/Fuse1177>>Fuse691. Debajo de la gráfica se muestra una tabla resumida de EC50 y la actividad máxima para los artículos de prueba.

Ejemplo 33

Como se muestra en la Figura 34A-34B, se evaluó la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral de un tumor de melanoma singeneico agresivo en un modelo de tumor de ratón totalmente inmunocompetente. A los ratones C57BL/6 se les inyectó por vía subcutánea 1x10^6 células tumorales B16-F10 en las que diseñamos ROR1 humano (B16-F10-R) en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron 75 mm^3, los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos de 5 ratones cada uno y el tratamiento se administró por vía intraperitoneal los días 0, 3 y 6 a una dosis de 15 mg/kg. Los artículos de prueba examinados fueron Fuse952 (círculo abierto; clon recombinante anti-mouse-PD1 RMP1.14 humano IgG1 (LALA), Fuse1113 (triángulo abierto, línea discontinua; RMP1.14 Fab de un solo brazo x IL-18mut2A LALA IgG1 humana en una configuración de botones en ojales, por lo que la variante Fab e IL-18 específica del ratón PD1 puede estar en el botón y el orificio N-terminal, respectivamente, o viceversa) y Fuse1176 (triángulo cerrado; clon recombinante anti-Mouse-PD1 RMP1.14 IgG1 humana LALA en el que IL-18mut2A se ha fusionado al N-terminal de la cadena ligera RMP1.14). PBS se usó como el tratamiento de control negativo. La Figura 34A es el gráfico x-y del volumen tumoral en mm^3 versus el tiempo en días. La Figura 34B es el gráfico x-y del peso

corporal en gramos versus el tiempo en días. Fuse1113 indujo aproximadamente 100 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y una tasa de respuesta completa de 60 %. Fuse1176 indujo aproximadamente un 75 % de TGI y una tasa de respuesta completa del 40 %. Se observó pérdida de peso transitoria entre los días 10 y 15 en los grupos que recibieron Fuse1113 y 1176. Esto se atribuyó a una respuesta ADA (anticuerpo antifármaco), que no es inesperada para un artículo de prueba completamente humano en un modelo de ratón totalmente inmunocompetente, que es xenogénico en relación con el artículo de prueba.

El día 5 siguiente al inicio del tratamiento, se escindieron los tumores (n=5 ratones por grupo), se generaron suspensiones de células individuales y se realizó citometría de flujo usando el protocolo descrito por Xu et al. (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38091375/). Como se muestra en la Figura 34C, se evaluó el número de diferentes subconjuntos de linfocitos por gramo de tumor a partir de ratones portadores de tumores tratados con PBS (gris claro), anti-PD1 (negro) y Fuse1113 (líneas horizontales). Los TIL se definieron como células CD45+ de ratón vivas. Dentro del subconjunto TIL, las células T se definieron como células CD3+, las células T CD8+ se definieron como células CD3+ CD8+, células de memoria efectoras T CD8+ (TEM; y células T CD8+ efectoras) se definieron como células CD3+ CD8+ CD62L-CD44+, las células T de memoria central CD8+ (TCM) CD3+ CD8+ CD62L+ CD44+, y las células T CD8+ sensibles a anti-PD-1 (células T CD8+ agotadas progenitoras) se definieron como células CD3+ CD8+ PD-1+ TIM3- TCF-1+. La Figura 34D representa la frecuencia de células mieloides totales (células CD11b+), macrófagos M2 (células CD11b+ F4-80+ CD11c-CD206+) y las proporciones de células T CD8+ a células supresoras derivadas de mieloide totales (MDSC; CD11b+ Ly6C+ Ly6G- [M-MDSC] y CD11b+ Ly6C-Mid Ly6G+ [G-MDSC]), células T CD8+ a macrófagos M2, células T CD8+ sensibles anti-PD-1 a MDSC, y células T CD8+ a células T CD4+. En relación con el

tratamiento con anti-PD-1 solo, el tratamiento con Fuse1113 da como resultado un aumento de aproximadamente 10 veces en las células T, aproximadamente un aumento de 20 veces en las células T CD8+, aproximadamente un aumento de 12 veces en las células TEM CD8+, aproximadamente un aumento de 13 veces en las células TCM CD8+ y aproximadamente un aumento de 20 veces en las células T CD8+ sensibles a anti-PD-1. Las células mieloides totales se redujeron en aproximadamente un 50 %, la relación de células T CD8+ a MDSC se incrementó aproximadamente 7 veces, las células T CD8+ a los macrófagos M2 se incrementó en aproximadamente 14 veces, las células T CD8+ a las células T CD4+ se incrementaron aproximadamente 6 veces y las células T CD8+ sensibles a anti-PD-1 a MDSC se incrementaron en aproximadamente 6 veces.

Ejemplo 34

Como se muestra en la Figura 35, se evaluó la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral en un tumor de cáncer colorrectal singénico en un modelo de tumor de ratón totalmente inmunocompetente. A los ratones Balb/c se les inyectó subcutáneamente células tumorales 3x10^6 CT26 en las que se diseñó la cadherina-17 humana (CT26-C) en el flanco derecho. Cuando los tumores alcanzaron 75-100 mm^3, los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos de 5 ratones cada uno y el tratamiento se administró por vía intraperitoneal los días 0, 4 y 8 a una dosis de 15 mg/kg. Los artículos de prueba examinados fueron Fuse952 (círculo abierto, línea discontinua; clon recombinante anti-mouse-PD1 RMP1.14 humano IgG1 (LALA), Fuse1113 (triángulo abierto, línea discontinua; RMP1.14 Fab de un solo brazo x IL-18mut2A LALA IgG1 humana en una configuración de botones en ojales, por lo que la variante Fab e IL-18 específica del ratón PD1 puede estar en el botón y el orificio N-terminal, respectivamente,

o viceversa) y una combinación de Fuse 1114 y Fuse952 (triángulo cerrado). Fuse1114 es idéntica a Fuse1113 se espera que esté dirigida a PD-1 humano, que no está presente en ratones Balb/c y, por lo tanto, sirvió como el control IL-18mut2A no dirigido. PBS se usó como el tratamiento de control negativo. La Figura 35A es el gráfico x-y del volumen tumoral en mm^3 versus el tiempo en días. La Figura 35B es el gráfico x-y del peso corporal en gramos versus el tiempo en días. Fuse1113 indujo aproximadamente una tasa de respuesta completa del 100 %. La combinación de Fuse1114 y Fuse952 no fue apreciablemente diferente de Fuse952 solo. No se observó una pérdida de peso apreciable en los cuatro grupos de ratones.

Ejemplo 35

Como se muestra en la Figura 36A-36B, se evaluó la capacidad de una variante de IL-18 ilustrativa dirigida a PD-1 de ratón para mediar la inhibición del crecimiento tumoral en un tumor de cáncer colorrectal de rápido crecimiento singeneico en un modelo de tumor de ratón completamente inmunocompetente. Los ratones C57BL/6 fueron inyectados subcutáneamente en el flanco derecho con 1x10^6 células tumorales de un clon de MC38 de rápido crecimiento denominado “MC38i”. Esta tasa de crecimiento de MC38i es aproximadamente el doble que la del modelo tumoral MC38 ampliamente usado. No fue diseñado. Cuando los tumores alcanzaron 75-100 mm^3, los ratones fueron aleatorizados en 4 grupos de 5 ratones cada uno y el tratamiento se administró por vía intraperitoneal los días 0, 4 y 8 a una dosis de 15 mg/kg. Los artículos de prueba examinados fueron Fuse952 (círculo abierto, línea discontinua; clon recombinante anti-mouse-PD1 RMP1.14 humano IgG1 (LALA), Fuse1113 (triángulo abierto, línea discontinua; RMP1.14 Fab de un solo brazo x IL-18mut2A LALA IgG1 humana en una configuración de botones en ojales, por lo que la variante Fab e IL-18 específica del ratón PD1 puede estar en el botón y el orificio N-terminal, respectivamente,

o viceversa) y una combinación de Fuse 1114 y Fuse952 (triángulo cerrado). Fuse1114 es idéntica a Fuse1113 excepto que está dirigida a PD-1 humano, que no está presente en ratones Balb/c y por lo tanto sirvió como el control IL-18mut2A no dirigido. PBS se usó como el tratamiento de control negativo. La Figura 36A es el gráfico x-y del volumen tumoral en mm^3 versus el tiempo en días. La Figura 36B es el gráfico x-y del peso corporal en gramos versus el tiempo en días. Fuse1113 indujo aproximadamente una tasa de respuesta completa del 60 %. La combinación de Fuse1114 y Fuse952 no fue apreciablemente diferente de Fuse952 solo. Se observó pérdida de peso transitoria entre los días 7 y 15 en el grupo que recibió Fuse1113. Esto se atribuyó a una respuesta ADA (anticuerpo antifármaco), que no es inesperada para un artículo de prueba completamente humano en un modelo de ratón totalmente inmunocompetente, que es xenogénico en relación con el artículo de prueba.

Ejemplo 36

Desarrollamos una variante primera en su clase de IL-18 denominada “HT18” fusionada a un anticuerpo anti-PD-1 (ApD1-HT18cis). HT18 está 10.000 veces atenuado, pero conserva casi toda la actividad de la citocina nativa cuando se suministra a las células PD-1+.

HT18 no se unió a IL-18BP ni a IL-18Rα en trans pero puede unirse fuertemente al complejo IL-18Rα/β. Dirigirse a HT18 a PD-1 la liberación de citocinas proinflamatorias mediada por células T aumentadas inducida por PD-1 in vitro.

Se observó una fuerte eficacia con ApD1-HT18cis en múltiples modelos de tumores agresivos de ratón, incluyendo una tasa de respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés) que varía de 60 %-100 % sin pérdida de peso u otras señales/síntomas de toxicidad

Se observó memoria inmunitaria y evidencia que respalda la diseminación de epítopos en ambos modelos tumorales de ratón que inducen mielopoiesis de emergencia tanto débil como fuerte

El TGI se asoció con un aumento de aproximadamente 6 veces en los números TIL en relación con el punto de referencia del anticuerpo PD-1 con aumentos significativos en las células T CD8+, células T efectoras y de memoria central, reducción de macrófagos asociados a tumores (TAM, por sus siglas en inglés) y sesgo hacia una celularidad antitumoral proinflamatoria.

Algunos de estos hallazgos se muestran en las Figuras 37-41.

Ejemplo 37

Como se muestra en las Figuras 42A y 42B, se evaluó el impacto de anticuerpos anti-PD1-pro-IL-18 ilustrativos que contienen diferentes variantes de IL-18 sobre la liberación de IFNγ mediada por PBMC activadas con PeliCluster CD3 durante 48 horas, lavadas y reexpuestas a una concentración 10 veces menor de PeliCluster CD3 durante 48 horas adicionales. Las Figuras 1A y 1B son gráficos x-y no lineales de la concentración del artículo de prueba versus la liberación de IFNγ. El anticuerpo IgG1 humano, anti-HEL (círculo gris), se usó como control de isotipo y se asoció con la liberación de IFN de fondo. γ

Para la Figura 42A y la Figura 42B, se probaron PBMC de dos donantes humanos sanos. Se usó el Fuse 599 (IL-18m9A-Fc) como punto de referencia no dirigido con actividad similar a la IL-18 silvestre (círculos grises abiertos, línea discontinua). Fuse1109 (cuadrados negros) y Fuse1177 (diamantes negros) consistieron en IL-18m13A dirigido contra PD-1 sin y con un atenuador N-terminal 100 veces, respectivamente. El Fuse 1229 (triángulos negros orientados hacia abajo) y el Fuse 1179 (triángulos negros orientados hacia

arriba) consistían en IL-18 m13.1A e IL-18m16A dirigidos contra PD-1, ambos conteniendo un atenuador N-terminal de 100 veces. En relación con Fuse599, Fuse1109 se atenuó aproximadamente 100 veces (EC50), mientras que Fuse1177, Fuse1229 y Fuse1179 se atenuaron entre más de 3000 (donante 2) y más de 1000 veces (donante 1) (EC50). En relación con Fuse599, el Emáx para Fuse1177, Fuse1229 y Fuse1179 también se redujo en >60 %. El anticuerpo IgG1 humano, anti-HEL (círculo gris), se usó como control de isotipo y se asoció con la liberación de IFNγ de fondo. Se muestra una tabla de síntesis de valores EC50, Emáx y AUC (área bajo la curva) debajo de los gráficos x-y.

Ejemplo 38

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos usando medio Ficoll-Paque Plus. En breve, 35 ml de sangre completa diluida (1 volumen de sangre completa vs 1 volumen de PBS) se superpuso suavemente sobre 15 ml de medio Ficoll-Paque Plus sin alterar la interfaz en un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugar durante 40 minutos a 400 × g a temperatura ambiente sin freno, se recolectó la capa regulada (capa de interfaz entre Ficoll y suero) y se diluyó en 5 volúmenes de PBS. Después de centrifugar durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente, las PBMC se resuspendieron en PBS y se lavaron una vez en PBS mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente. A continuación, las PBMC se resuspendieron en 5 ml de regulador de lisis ACK y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de glóbulos rojos. Después del período de incubación de 5 minutos, se añadieron 45 ml de PBS a las PBMC y se centrifugaron durante 15 minutos a 100 × g a temperatura ambiente. Por último, las PBMC

se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor y 1 % de penicilina/estreptomicina) para la configuración del ensayo de citotoxicidad y liberación de IFN gamma. Para almacenar las PBMC para su uso posterior, las PBMC se granularon hacia abajo mediante centrifugación durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y después se resuspendieron en medio de congelación (90 % de FBS inactivado por calor y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO)) para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

Aislamiento y expansión de células NK

Las PBMC frescas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en regulador EasySep de StemCell a una densidad de 50 millones de células por ml en tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 50 ul de cóctel de aislamiento del kit de aislamiento de células NK de StemCell a 1 ml de suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después del período de incubación de 5 minutos, se añadieron 50 ul de RapidSpheres del kit de aislamiento de células NK a 1 ml de la mezcla de cóctel célula/anticuerpo. El volumen total de la mezcla célula/coctel/perlas se llevó hasta 25 o 50 ml con regulador EasySep y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en imán EASYSEP. Después del período de incubación de 10 minutos, la solución se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml manteniendo el tubo en el imán y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en imán EASYSEP. Se recolectó la solución con células NK purificadas. Las células NK recién purificadas se usaron para la expansión o se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Para expandir las células NK, se añadió 1x 500 µl de material de recubrimiento de expansión celular NK ImmunoCult™ del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a una placa de 24 pocillos tratada en cultivo no tisular y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Durante la incubación de 2 horas, las células NK recién aisladas se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión

de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 1 millón por ml. Después de la incubación de 2 horas, la placa se lavó dos veces con PBS y se añadieron 500 µl de suspensión de células NK (0,5 millones de células NK) a un pocillo de la placa recubierta de 24 pocillos. La placa se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 3 días y se añadieron 500 µl de medio de expansión celular ImmunoCult NK al pocillo con células NK. La placa se incubó adicionalmente durante otros 4 días. En el día 7, las células NK se recolectaron por centrífuga a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 0,2 millones por ml. Se añadió 1 ml de células NK recolectadas (0,2 millones de células NK) a un pocillo de nueva placa recubierta de 24 pocillos y se incubó durante 4 días a 37 °C con 5 % de CO2. En el día 11, las células NK se recolectaron nuevamente por centrifugación a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de expansión de células NK ImmunoCult del kit de expansión de células NK ImmunoCult de StemCell a la densidad de 0,2 millones por ml. Se añadió 1 ml de células NK recolectadas (0,2 millones de células NK) a un pocillo de nueva placa recubierta de 24 pocillos y se incubó durante otros 3 días a 37 °C con 5 % de CO2. Las células NK después de 14 días de expansión se recolectaron y se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Ensayo de citotoxicidad

El día antes de la configuración del ensayo, se retiraron antibióticos selectivos de la célula diana (células FLUC EgfP MDA-MB-231 o células FLUC EgfP T-47D). El día de la configuración del ensayo, las células diana se recolectaron mediante un breve tratamiento TrypLE y después se lavaron con medio de cultivo mediante centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las líneas celulares diana se resuspendieron en medio de cultivo para determinar la viabilidad celular mediante

exclusión azul tripano en Cellometer. La densidad celular viable se ajustó a 50.000 células/ml en medios de cultivo. Se dispensaron cuidadosamente 100 ul de suspensión celular diana (5000 células diana) a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos usando una pipeta multicanal. Después se incubó la placa durante 4-5 horas en incubadora de cultivo tisular para asegurar que las células diana se hayan adherido al fondo de la placa de 96 pocillos.

Para el ensayo de citotoxicidad usando células NK o PBMC como células efectoras, se granularon células NK o PBMC por centrifugadora durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio de cultivo. También se determinó la viabilidad de las células vía exclusión azul tripano y la densidad viable de NK o PBMC se ajustó a 3 millones de células/ml en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Después de 4-5 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente de placas de 96 pocillos con células diana. Se añadieron 50 ul de 3 millones de células/ml de suspensión de NK o PBMC (150.000 células) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con célula diana, lo que daría como resultado la relación E:T de 30:1. Para dar como resultado la relación E:T de 10:1, 5:1, 2:1 o 1:1, 3 millones de células/ml de NK o PBMC se diluyeron adicionalmente con medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en 3, 6, 15 o 30 veces. A continuación, se añadieron 50 ul de células NK diluidas o suspensión de PBMC a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con célula diana.

Para el ensayo de citotoxicidad usando células T activadas como células efectoras, se pretrataron células T aisladas con dinoperlas CD3/CD28 humanas (2 ul por millón de células T) durante 72 horas. Después de 72 horas de activación, se retiraron las dinaperlas CD3/CD28 de las células T activadas en el imán. A continuación, las células T activadas se

peletizaron hacia abajo mediante centrífuga durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio de cultivo. También se determinó la viabilidad de las células T vía exclusión azul tripano y la densidad de células T viables se ajustó a 2 millones de células/ml en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Después de 4-5 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente de placas de 96 pocillos con células diana. Se añadieron 25 ul de 2 millones de células/ml de suspensión de células T activadas (50.000 células) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con célula diana, lo que daría como resultado la relación E:T de 10:1. Mientras tanto, Fuse-608 se preparó en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina a la concentración de 40 pM. Se añadieron 25 ul de Fuse-608 preparado de 40 PM al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con células diana y células T activadas.

Las proteínas FUSE se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 nM a 2,56 pM. Después se añadieron 50 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con PBMC y células diana y se incubaron durante el período de tiempo dedicado (24, 48 o 72 horas) a 37 °C con 5 % de CO2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 ×g para transferir 50 ml de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo V usando una pipeta multicanal para liberación gamma de IFN, liberación de granzima B o ensayo de activación celular HEK-BLUE-IL-18. La solución de ensayo de luciferasa de ONE-Glo se llevó a temperatura ambiente. Después se añadieron 50 ul de solución One-Glo al pocillo designado con células y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se midió la bioluminiscencia (IFU) en un lector de placas con protocolo de bio-luminancia preestablecido. La destrucción de la célula diana se calculó usando la fórmula [Porcentaje de destrucción de la

muestra de ensayo = (IFU de muestra con PBMC y célula diana–-IFU de muestra de prueba)/(IFU de muestra con PBMC y célula diana–-IFU de muestra con PBMC sola)*100].

Aislamiento de células T

Las PBMC frescas se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en regulador EasySep de StemCell a la densidad de 50 millones de células por ml en tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 50 ul de cóctel de aislamiento del kit de aislamiento de células T de StemCell a 1 ml de suspensión celular y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación de 5 minutos, se añadieron 50 ul de RapidSpheres del kit de aislamiento de células T a 1 ml de la mezcla de cóctel célula/anticuerpo. El volumen total de la mezcla célula/coctel/perlas se llevó hasta 25 o 50 ml con regulador EasySep y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en imán EASYSEP. Después de 10 minutos de incubación, la solución se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml manteniendo el tubo en el imán y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en el imán EASYSEP. Se recolectó la solución con células T purificados. Las células T recién purificadas se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Generación de células dendríticas

Las PBMC frescas se resuspendieron en medio AIM V a la densidad de 5 millones por ml y se añadieron 40 ml de suspensión de PBMC a un matraz de cultivo celular estéril T-174. Los matraces se incubaron en una incubadora humidificada mantenida a 37 °C y 5 % de CO_2 durante 2 horas. Después de 2 horas de incubación, las células no adherentes se retiraron golpeando firmemente el matraz y aspirando completamente el medio en el matraz. Se añadieron inmediatamente 40 ml de medio AIM-V a las células adherentes con 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml IL-4 a cada matraz de cultivo celular T-150 que contenía los monocitos adherentes. Los matraces se colocaron en una incubadora humidificada a

37 °C y 5 % de CO2 durante 7 días. Después del período de cultivo de 7 días, las DC se cosecharon, se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con proteínas FUSE escindidas B de granzima humana o sobrenadante del ensayo de citotoxicidad

Las células HEK-BLUE-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo (medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mm, 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de normocina y 1× reactivo de selección HEK-Blue). Las células IL-18 HEK-BLUE™ se diseñan genéticamente a partir de la línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK293) para expresar de manera estable genes que codifican el receptor de IL-18 (IL-18R) y la proteína accesoria del receptor de IL-18 (IL-18RAP) y expresar un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF- KB /AP-1, por lo tanto son útiles para la detección de IL-18 bioactiva mediante el monitoreo de la activación de las vías NF-KB y AP-1 mediante cuantificación en el sobrenadante del nivel SEAP (que se produce después de la activación de NF-KB) con una solución tal como solución QUANTI-BLUE™. Además, las respuestas a TNF-α e IL-1β humanos se han bloqueado en las células HEK-BLUE™ IL-18, por lo que las células HEK-BLUE™ IL-18 son sensibles específicamente a IL-18.

El día de la configuración del experimento, las células HEK-BLUE-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en un medio de prueba precalentado (DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 2 MM de L-glutamina, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomicina) a una densidad de 3×10^5 células por ml. Para

sembrar las células (50.000 células por pocillo), se añadieron 180 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos.

Para la escisión de proteína FUSE con granzima B humana, la progranzima B humana se activó con enteroquinasa (EK, por sus siglas en inglés) incubando 2 µg de progranzima B humana con 20 ng de EK en 1× PBS durante 90 minutos a 37 °C. Para escindir la proteína FUSE, se incubaron 20 µg de proteína FUSE con 2 µg de granzima B humana activada por EK en regulador de ensayo (HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, 0,1 % de CHAPS, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol) durante 10 minutos a 37 °C. Después del período de incubación de 10 minutos, las proteínas FUSE escindidas se diluyeron en medio de prueba (DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mM, FBS inactivado por calor al 10 % (v/v), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) de 12.500.000 pg/ml a 160 pg/ml (10× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en medio de ensayo de 4000 pg/ml a 1,28 pg/ml (10x de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 20 µl de IL-18 preparadas o proteínas FUSE escindidas a los pocillos designados con 50.000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Para verificar la actividad del sobrenadante a partir del estudio de citotoxicidad en la inducción de la activación de la célula HEK-Blue-IL-18, se añadieron 20 µl de sobrenadante del estudio de citotoxicidad a pocillos designados que contenían 50.000 células en la placa de 96 pocillos y después mezclaron suavemente las células con sobrenadante. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas.

Después del período de incubación de activación de 24 horas, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 que contenía la fosfatasa alcalina

secretada a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución QUANTI-Blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 80 ml de la solución QUANTI-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 ml de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la absorbancia a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de cocultivo de células T y células dendríticas (MLR)

Se generaron células dendríticas a partir de monocitos en PBMC con 800 U/ml GM-CSF y 500 U/ml IL-4. Se mezclaron células T alógenas de PBMC con células dendríticas en la proporción de 10:1 en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se añadieron 100K células T con 10K células dendríticas en 150 ul de medio a los pocillos en placa de 96 pocillos. Las proteínas FUSE se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 NM a 2,56 PM. Después se añadieron 150 ul de proteínas FUSE preparadas a diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células T y células dendríticas y se incubaron durante el período de tiempo dedicado (48, 72, 96 o 144 horas) a 37 °C con 5 % de CO2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 × g para transferir 250 ml de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para la detección de liberación de IFN gamma.

Detección de liberación gamma IFN

La liberación gamma de IFN a partir del ensayo de citotoxicidad se midió usando el kit de detección ELISA de IFN gamma humano. En breve, el anticuerpo de recubrimiento proporcionado en el kit se diluyó a la concentración sugerida siguiendo el protocolo

proporcionado por el fabricante del kit. Se añadieron 100 ul de anticuerpo de recubrimiento diluido a la placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp. Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron entonces 4 veces con el Regulador de Lavado. Para bloquear la unión no específica y reducir el fondo, se añadieron 200 ml de diluyente de ensayo A 1×, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después de bloquear, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 ml/pocillo de estándares (preparados con medio de cultivo) o muestras a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (400 rpm). Después de la incubación de 2 horas con muestras o patrones, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de anticuerpo de detección para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 1 hora con anticuerpo de detección, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de avidina-HRP para incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas (400 rpm). Después de 30 minutos de incubación con avidina-HRP, las placas se lavaron 5 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB recién mezclada para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Después se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas y la concentración de IFN gamma en cada muestra se volvió a calcular usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferente concentración de patrones.

Detección de liberación de Granzyme B

La liberación de Granzima B del ensayo de citotoxicidad se midió usando el kit de detección ELISA de granzima B humana. En breve, el anticuerpo de recubrimiento

proporcionado en el kit se diluyó a la concentración sugerida siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. Se añadieron 100 ul de anticuerpo de recubrimiento diluido a la placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp. Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, las placas se lavaron 3 veces con regulador de lavado. Para bloquear la unión no específica y reducir el fondo, se añadieron 200 ml de diluyente de ensayo A 1×, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después de bloquear, las placas se lavaron 3 veces con el regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 ml/pocillo de patrones (preparados con medio de cultivo) o muestras a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 2 horas con muestras o patrones, las placas se lavaron 3 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 ml de solución diluida de anticuerpo de detección para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 1 hora con anticuerpo de detección, las placas se lavaron 3 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de avidina-HRP para incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas (400 rpm). Después de 30 minutos de incubación con avidina-HRP, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB recién mezclada para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Después se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas y la concentración de granzima B en cada muestra se volvió a calcular usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferente concentración de patrones.

Ejemplo 39

El N-terminal de pro-IL-18 se fusionó con el C-terminal de un dominio IgG1 CH3 para diseñar una variante de IL-18 expresable en células de mamíferos. La Pro-IL-18 se fusionó a el botón de un botón en la proteína IgG1 heterodiméricas del ojal. Se realizó una modificación adicional a pro-IL-18 para reducir la agregación de la molécula de tal manera que cada residuo de cisteína tanto en el propéptido como en la IL-18 madura se sustituyó con serina ("IL-18AS", como en FUSE-480), alanina ("IL-18AA", como en FUSE-481), o valina ("IL-18AV", como en FUSE-442). Las ilustraciones de las tres variantes se muestran en el panel A de la Figura 43.

La transfección transitoria en el sistema ExpiCHO resultó en títulos de 191, 214 y 198 mg/l, para FUSE-480, FUSE-481 y FUSE-442, respectivamente. Se planteó la hipótesis de que estas proteínas de fusión Fc-pro-IL-18 albergaban una versión "enmascarada" de IL-18, donde la actividad biológica de la IL-18 fusionada se reduciría hasta que se escidiera el propéptido. Para evaluar la escisión del propéptido, se insertó un sitio de escisión específico para la enteroquinasa (EK) dentro del propéptido ("pp") aguas arriba de la secuencia de IL-18 madura en la localización del sitio endógeno Caspasa 1. Se eligió EK debido a su robusta actividad proteasa y actividad en solución salina regulada con fosfato. Para evaluar la actividad biológica de las proteínas de fusión Fc-pro-IL-18 antes y después del tratamiento con EK, se usó un sistema indicador. Aquí, se usaron células HEK-Blue-IL-18 para cuantificar la actividad de IL-18. Las células IL-18 Blue HEK-están hechas de HEK-293 diseñadas para expresar el complejo receptor de IL-18 humana (IL-18Rα/β) y un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) NF-κb/AP-1 inducible. Las células también están diseñadas para no responder al TNF-α e IL-1β humanos. Tras la exposición a lL-18, la IL-18 Blue HEK-produce SEAP de manera dependiente de la dosis, que puede cuantificarse mediante un ensayo colorimétrico. Observamos que en comparación con la IL-18 madura humana recombinante, los tres mutantes indujeron una menor actividad biológica mayor que 1000 veces y hasta 100.000

veces. Tras el desenmascaramiento (escisión enzimática) mediante tratamiento con EK, la actividad biológica de la proteína liberada del mutante sustituido con alanina (FUSE-480) y el mutante sustituido con valina (FUSE-442) no fue sustancialmente diferente de la IL-18 madura humana recombinante. Después de la liberación del mutante serina con EK (Fig. 43B), sin embargo, aunque la actividad biológica se restauró >30.000 veces, fue ~50 veces menos potente que la IL-18 madura humana recombinante. La potencia se midió como la concentración del artículo de prueba que indujo tener producción máxima de SEAP (EC50-SEAP).

Como se muestra en la Figura 44, el pro-IL-18mut2 se fusionó al botón de un botón en ojal en la proteína IgG1 heterodiméricas. IL-18mut2 incorpora cuatro sustituciones de aminoácidos hipotetizadas para reducir la unión a IL-18BP mientras se mantiene la unión silvestre al complejo receptor de IL-18. Se realizó una modificación adicional a pro-IL-18mut2 para reducir la agregación de la molécula de tal manera que cada residuo de cisteína tanto en el propéptido como en la IL-18mut2 madura se sustituyó con serina (18mut2AS), alanina (IL-18mut2AA) o valina (IL-18mut2AV). Las ilustraciones de las tres variantes se muestran en el panel A de la Figura 44. Al igual que en la Figura 43, la actividad biológica se evaluó usando HEK-Blue. En comparación con la IL-18 madura humana recombinante, los tres mutantes indujeron una menor actividad biológica de al menos 100.000 veces. Tras el desenmascaramiento (escisión enzimática) mediante tratamiento con EK, la actividad biológica de la proteína liberada del mutante sustituido con alanina (FUSE-423) y el mutante sustituido con valina (FUSE-424) no fue sustancialmente diferente de la IL-18 madura humana recombinante. Sin embargo, después de la liberación de la serina mutante con (FUSE422), aunque la actividad biológica se restableció en aproximadamente 100.000 veces, fue aproximadamente 100 veces menos potente que la

IL-18 madura humana recombinante. La potencia se midió como la concentración del artículo de prueba que indujo tener producción máxima de SEAP (EC50-SEAP).

Como se muestra en la Figura 45, se examinó el impacto de un propéptido en el enmascaramiento de la actividad biológica de IL-18AV en el contexto de las variantes de fusiones de Fc que incorporan IL-18AV en el C-terminal de la Fc con (panel A, FUSE-442; Fc-eKpp-IL-18AV) o sin (panel B, FUSE-505; Fc-EK-IL-18AV) el propéptido. Para la fusión en la que se eliminó el propéptido, el sitio de escisión EK que reemplazó al sitio Caspasa 1 se movió a una posición directamente entre el dominio CH2 del botón y la IL-18AV madura sin la adición de un enlazador flexible. Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18AV como lectura, expusimos estas células a una titulación de FUSE-442 o FUSE-505 con o sin tratamiento con EK. La actividad biológica, medida como la EC50-SEAP, de FUSE-442 y -505 se atenuó en comparación con la IL-18AV recombinante humana en los órdenes de ~150 veces y ~15.000 veces, respectivamente (panel C) de tal manera que la incorporación del propéptido contribuyó a una atenuación adicional de ~100 veces en comparación con la fusión Fc sola. El tratamiento con EK, diseñado para escisión del fragmento IL-18AV de FUSE-505 y FUSE-442 condujo a la restauración de la actividad biológica. En el caso de FUSE-442, el tratamiento con EK resultó en una actividad biológica que no fue sustancialmente diferente de la IL-18AV madura humana recombinante. Sin embargo, para FUSE-505 aunque la actividad biológica se restableció después del tratamiento con EK, la potencia permaneció reducida en ~30 veces en comparación con la IL-18AV madura humana recombinante. El EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D. Dado que FUSE-505 y FUSE-442 ambas albergan el mismo IL-18AV, la diferencia en la actividad después del desenmascaramiento con EK no pudo explicarse por ninguna diferencia en la variante de IL-18AV. En cambio, observamos que EK era mucho menos eficiente en la

liberación de IL-18AV que FUSE-505 (eficiencia de escisión de <10 %) que FUSE-4442 (eficiencia de escisión de >95 %). Por lo tanto, la actividad biológica reducida observada a partir de FUSE-505 escindida por EK vs. 442 escindida por EK fue el resultado de que la primera liberó menos IL-18AV en comparación con la segunda. Se plantea la hipótesis de que la falta de un enlazador flexible entre el dominio CH3 del botón e IL-18AV en FUSE-505 dio como resultado un sitio de escisión EK en su mayoría inaccesible. En contraste, el propéptido incorporado en FUSE-442 permitió un acceso suficiente de EK a su sitio de escisión para una liberación eficiente de IL-18AV. Los datos indican fuertemente que el en el contexto de una proteína de fusión Fc IL-18AV, el propéptido no es requerido sino que contribuye al enmascaramiento de la actividad biológica de IL-18AV. En ausencia del propéptido, el enmascaramiento es probablemente la consecuencia del impedimento estérico mediado por la proteína fusionada al N-terminal de IL-18AV

Como se muestra en la Figura 46, al igual que en la Figura 45 con IL-18AV, se examinó el impacto de un propéptido en el enmascaramiento de la actividad biológica de IL-18mut2AV en el contexto de las variantes de fusiones de Fc que incorporan IL-18aVmut2 en el C-terminal de la Fc con (panel A de la Figura 46, FUSE-424; Fc-eKpp-IL-18mut2AV) o sin (panel B, FUSE-441; Fc-EK-IL-18mut2AV) el propéptido. La actividad biológica de FUSE-441 y FUSE424 fueron altamente atenuadas en comparación con la IL-18 recombinante humana en los órdenes de >100.000 veces (panel C). El tratamiento con EK condujo al restablecimiento de la actividad biológica. En el caso de FUSE-424, el tratamiento con EK resultó en una actividad biológica que no fue sustancialmente diferente de la IL-18 madura humana recombinante. Sin embargo, para FUSE-441 aunque la gran mayoría de la actividad biológica se restableció después del tratamiento con EK, la potencia permaneció reducida en ~ 10 veces en comparación con la IL-18 madura humana

recombinante. El EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D. Dado que FUSE-441 y FUSE-442 ambos albergan la misma IL-18mut2AV, la diferencia en la actividad después del desenmascaramiento con EK no pudo explicarse por ninguna diferencia en la variante de IL-18. En cambio, observamos que EK era mucho menos eficiente en la liberación de IL-18mut2AV de FUSE-441 (eficiencia de escisión de <20 %) que FUSE-424 (eficiencia de escisión de >95 %). Por lo tanto, que la actividad biológica reducida observada a partir de FUSE-441 escindida por EK vs. FUSE-424 escindida por EK fue posiblemente el resultado de que la primera liberó menos IL-18mut2AV en comparación con la segunda. Se plantea la hipótesis de que la falta de un enlazador flexible entre el dominio CH3 del botón e IL-18mut2AV en FUSE-441 dio como resultado un sitio de escisión EK en su mayoría inaccesible. Por ejemplo, un enlazador flexible puede ser el propéptido; o el propéptido se comporta como un enlazador flexible. En contraste, el propéptido incorporado en FUSE-424 permitió un acceso suficiente de EK a su sitio de escisión para una liberación eficiente de IL-18mut2AV. Los datos indican fuertemente que el en el contexto de una proteína de fusión IL-18mut2AV Fc, el propéptido no es necesario para enmascarar la actividad biológica de IL-18mut2AV sino que en cambio la consecuencia de un impedimento estérico mediado por la proteína fusionada al N-terminal de IL-18mut2AV. Como tal, se plantea la hipótesis de que cualquier proteína N-terminal de tamaño suficiente (p. ej., aproximadamente 4 kDa o más grande, p. ej., el propéptido es de aproximadamente 4 kDa, Fc es de aproximadamente 28 kDa como monómero, HSA es aproximadamente 66 kDa, VHH es aproximadamente 14 kDa) sería capaz de enmascarar la actividad biológica de IL-18mut2AV; y que un sitio de escisión de EK que contiene un enlazador de tamaño suficiente (p. ej., 25 aminoácidos o más) para permitir el acceso a EK, cuando se incorpora entre la máscara de proteína Fc u otra máscara de proteína N-terminal e IL-18mut2AV,

sustituiría al propéptido que contiene EK. Además, si tal proteína de enmascaramiento N-terminal o fragmento de esta se diseñara mediante ingeniería genética o se transportara naturalmente a través del Retículo Endoplásmico (ER), esto daría como resultado rendimientos de expresión a partir de la transfección transitoria de células de mamíferos tales como Expi-CHO aceptables para el desarrollo terapéutico.

Como se muestra en la Figura 1547, se examinó el impacto de fusionar la fusión de propéptido-IL-18AV al C-terminal de IgG1 silvestre (FUSE-507, panel A) e IgG4 silvestre (FUSE-509, panel B). En ambos formatos, una molécula de la fusión propéptido-IL-18AV se une a cada dominio Fc-CH3, dando como resultado dos moléculas de la fusión propéptido-IL-18AV por homodímero IgG1 o IgG4. Como se describió anteriormente, se insertó un sitio de escisión específico para EK entre el propéptido y la secuencia de IL-18 madura en la ubicación del sitio endógeno Caspasa-I. Para evaluar la actividad biológica de las proteínas de fusión Fc-pro-IL-18 antes y después del tratamiento con EK, se usó el sistema indicador celular HEK-Blue-IL-18. Usando este sistema como lectura, expusimos las células HEK-Blue-IL-18 a una titulación de FUSE-507 (IgG1fc-EKpp-IL-18AV) o FUSE-509 (IgG4fc-EKpp-IL-18AV) con o sin tratamiento con EK. La actividad biológica, medida como la EC50-SEAP, de FUSE-507 y FUSE-509 fueron altamente atenuadas en comparación con la IL-18 recombinante humana en los órdenes de >10.000 veces (panel C). El tratamiento con EK, diseñado para escisión del fragmento IL-18AV de FUSE-507 y FUSE-509 condujo a la restauración de la actividad biológica que fue aproximadamente 2 veces mayor que hrIL-18. Esta diferencia fue probablemente el resultado de la liberación de dos moléculas de IL-18AV por fusión IgG1 o IgG4 dando como resultado una relación molar de aproximadamente 2:1 de IL-18AV a hrIL-18 cuando las proteínas de fusión IgG1 o IgG4 fueron completamente escindidas por EK. El EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel D. También generamos versiones de FUSE-507 y FUSE-509 sin el

propéptido; IgG1Fc-EK-IL-18AV y IgG4Fc-EK-IL-18AV, respectivamente. Éstos no se expresaban bien, probablemente debido a la propensión de IL-18 a formar homodímeros y la ausencia de un enlazador flexible entre el dominio CH3 de IgG1 o IgG4 e IL-18AV madura (datos no mostrados). Los datos indican que el en el contexto de una fusión propéptido-IL-182AV, es posible obtener tanto la expresión superior a 135 mg/l como el enmascaramiento/atenuación de la actividad biológica de IL-18AV tan alta o mayor que 100.000 veces (comparar la Figura 47 con la Figura 43 y 45) si IL-18AV se fusiona al extremo C de IgG1 o IgG4 silvestre (dos moléculas de IL-18AV) o un botón de IgG1 en el heterodímero del orificio (una molécula de IL-18AV). Los formatos que utilizan IgG1 o IgG4 silvestre indican la asignación para la fusión directa plug and play de las fusiones de propéptido-IL-18, sus variantes y fragmentos de estos a una serie de anticuerpos monoclonales incluyendo los comercializados tales como Avelumab (anti-PDL1), Cetuximab (anti-EGFR), Trastuzumab (anti-HER2/neu), etc.

Como se muestra en la Figura 48, para abordar la universalidad del enmascaramiento de IL-18 y sus variantes por un polipéptido fusionado al extremo N de la forma madura de IL-18, se examina la capacidad de una proteína N-terminal (máscara) distinta del dominio Fc de IgG para atenuar la actividad biológica de IL-18-AV con o sin el propéptido. El N-terminal de IL-18AV con (panel A, FUSE-501) o sin (panel B, FUSE-503) el propéptido se fusionó al C-terminal de la albúmina sérica humana (HSA). Para la fusión en la que se eliminó el propéptido, el sitio de escisión EK que reemplazó al sitio de la Caspasa 1 se movió a una posición directamente entre el C-terminal de HSA y la IL-18AV madura sin la adición de un enlazador flexible. Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, expusimos estas células a una titulación de FUSE-501 (HSA-EKpp-IL-18AV) o FUSE-503 (HSA-EK-IL-18AV) con o sin tratamiento con EK. La actividad biológica, medida como el EC50-SEAP de FUSE-501 (panel C) fue altamente atenuada en comparación con la IL-18 recombinante humana en el

orden de ~35.000 veces. FUSE-503 (panel D), que no contiene el propéptido, también se atenuó en el orden de ~3.500 veces. El tratamiento con EK, diseñado para escisión del fragmento IL-18AV de FUSE-501 y FUSE-503 condujo a la restauración de la actividad biológica. En el caso de FUSE-501, el tratamiento con EK resultó en una actividad biológica que no fue sustancialmente diferente de la IL-18 madura humana recombinante. Sin embargo, para FUSE-503, aunque la actividad biológica se incrementó con el tratamiento con EK, permaneció ~ 40 veces más débil que la IL-18 recombinante humana. El EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E. Dado que FUSE-501 y FUSE-503 ambos albergan la misma IL-18AV, la diferencia en la actividad después del desenmascaramiento con EK no pudo explicarse por ninguna diferencia en la variante de IL-18. En cambio, observamos que EK era mucho menos eficiente en la liberación de IL-18AV que FUSE-503 (eficiencia de escisión de <20 %) que FUSE-501 (eficiencia de escisión de >95 %). Por lo tanto, la actividad biológica reducida observada a partir de FUSE-503 escindida por EK vs. -501 escindida por EK fue el resultado de que la primera liberó menos IL-18AV en comparación con la segunda. Se plantea la hipótesis de que la falta de un enlazador flexible entre el C-terminal de HSA e IL-18AV en FUSE-503 resultó en un sitio de escisión de EK en su mayoría inaccesible. En contraste, el propéptido incorporado en FUSE-501 permitió un acceso suficiente de EK a su sitio de escisión para una liberación eficiente de IL-18AV. Tomados junto con los datos obtenidos de las fusiones Fc, los resultados indican fuertemente que el en el contexto de una proteína de fusión HSA-IL-18AV, el propéptido no es necesario para enmascarar la actividad biológica de IL-18AV pero puede contribuir a una mayor atenuación cuando está presente en las proteínas de fusión HSA-IL-18. Tanto para FUSE-501 como para -503, el enmascaramiento parece ser la consecuencia del impedimento estérico mediado por la proteína fusionada al N-terminal de IL-18AV. Como tal, estos datos proporcionan un apoyo adicional de que cualquier proteína N-terminal de tamaño suficiente sería capaz de

enmascarar la actividad biológica de IL-18AV y que un sitio de escisión EK que contiene enlazador de tamaño suficiente para permitir el acceso a EK, cuando se incorpora entre la máscara de Fc, HSA u otra proteína N-terminal e IL-18AV, sustituiría al propéptido que contiene EK. Además, si tal proteína de enmascaramiento N-terminal o fragmento de esta se diseñara mediante ingeniería genética o se transportara naturalmente a través del Retículo Endoplásmico (ER), esto daría como resultado rendimientos de expresión a partir de la transfección transitoria de células de mamíferos tales como Expi-CHO aceptables para el desarrollo terapéutico.

Como se muestra en la Figura 49, para abordar la universalidad del enmascaramiento de IL-18 y sus variantes por un polipéptido fusionado al extremo N de la forma madura de IL-18, se examina la capacidad de una proteína N-terminal (máscara) distinta del dominio Fc de IgG para atenuar la actividad biológica de IL-18-mut2AV con o sin el propéptido. El N-terminal de IL-18mut2AV con (panel A, FUSE-502) o sin (panel B, FUSE-504) el propéptido se fusionó al C-terminal de la albúmina sérica humana (HSA). Para la fusión en la que se eliminó el propéptido, el sitio de escisión EK que reemplazó al sitio de la Caspasa 1 se movió a una posición directamente entre el C-terminal de HSA y la IL-18AV madura sin la adición de un enlazador flexible. Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, expusimos estas células a una titulación de FUSE-502 (HSA-EKpp-IL-18mu2AV) o FUSE-504 (HSA-EK-IL-18mut2AV) con o sin tratamiento con EK. La actividad biológica, medida como el EC50-SEAP, de FUSE-502 (panel C) y FUSE-504 (panel D) fueron altamente atenuadas en comparación con la IL-18 recombinante humana en los órdenes de al menos ~30.000 veces y ~50.000 veces, respectivamente. El tratamiento con EK, diseñado para escisión del fragmento IL-18mut2AV de FUSE-504 y FUSE-502 condujo a la restauración de la actividad biológica. En el caso de FUSE-502, el tratamiento con EK dio como resultado una actividad biológica que no fue sustancialmente diferente de la IL-18 madura humana recombinante (panel C). Para FUSE-

504, aunque la gran mayoría de la actividad biológica se restableció después del tratamiento con EK, la potencia permaneció reducida en ~ 3 veces en comparación con la IL-18 madura humana recombinante (panel D). El EC50-SEAP para cada compuesto se muestra en el panel E. Dado que FUSE-504 y FUSE-502 ambas albergan la misma IL-18mut2AV, la diferencia en la actividad después del desenmascaramiento con EK no pudo explicarse por ninguna diferencia en la variante de IL-18. En cambio, observamos que EK era mucho menos eficiente en la liberación de IL-18mut2AV de FUSE-504 (eficiencia de escisión de <20 %) que FUSE-502 (eficiencia de escisión de >95 %). Por lo tanto, la actividad biológica reducida observada a partir de FUSE-504 escindida por EK vs. FUSE-502 escindida por EK fue el resultado de que menos IL-18mut2AV fue liberada por el primero en comparación con el segundo. Se plantea la hipótesis de que la falta de un enlazador flexible entre el C-terminal de HAS e IL-18mut2AV en FUSE-504 dio como resultado un sitio de escisión de EK en su mayoría inaccesible. En contraste, el propéptido incorporado en FUSE-502 permitió un acceso suficiente de EK a su sitio de escisión para una liberación eficiente de IL-18mut2AV. Tomados junto con los datos obtenidos de las fusiones Fc, los resultados indican fuertemente que en el contexto de una proteína de fusión HSA-IL-18mut2AV, el propéptido no es necesario para enmascarar la actividad biológica de IL-18mut2AV sino que es la consecuencia de un impedimento estérico mediado por la proteína fusionada al N-terminal de IL-18mut2AV. Como tal, estos datos proporcionan un apoyo adicional de que cualquier proteína N-terminal de tamaño suficiente sería capaz de enmascarar la actividad biológica de IL-18mut2AV y que un sitio de escisión de EK que contiene enlazador de tamaño suficiente para permitir el acceso a EK, cuando se incorpora entre la máscara de Fc, HAS u otra proteína N-terminal e IL-18mut2AV, sustituiría al propéptido que contiene EK. Además, si tal proteína de enmascaramiento N-terminal o fragmento de esta se diseñara mediante ingeniería genética o se transportara naturalmente a través del Retículo Endoplásmico

(ER), esto daría como resultado rendimientos de expresión a partir de la transfección transitoria de células de mamíferos tales como Expi-CHO aceptables para el desarrollo terapéutico.

Como se muestra en la Figura 50, se examina el impacto del propéptido sobre la actividad biológica de un solo IL-18AV fusionado al extremo N de IgG1 Fc. Los paneles A y B son ilustraciones ejemplares de IL-18AV fusionada en el botón de un botón en el dominio IgG1-Fc del ojal con el propéptido (FUSE-499; Fc-pp-IL-18AV; panel A) o sin el propéptido (FUSE-500; Fc-IL-18AV; panel B). En este caso, se usó un propéptido silvestre en el que todos los residuos de cisteína se sustituyeron por valina pero se mantuvo el sitio Caspasa 1. Para permitir la translocación de ambos constructos al retículo endoplásmico (ER) de células de mamíferos y por tanto la expresión/secreción, el péptido señal de la cadena Ig Kappa (líder IgK) se codificaba aguas arriba del propéptido de FUSE-499 o la IL-18AV de FUSE-500. Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, se examina la capacidad de nuestro propéptido C→V (AV) para enmascarar IL-18AV (FUSE-499) y la capacidad de la caspasa 1 para desenmascarar/restaurar la actividad biológica. La actividad biológica, medida como el EC50-SEAP, de FUSE499 fue altamente atenuada en comparación con la IL-18 recombinante humana en el orden de >50.000 veces (panel C). En contraste, en ausencia del propéptido en FUSE-500, no hubo reducción en la actividad biológica en comparación con la IL-18 recombinante humana, lo que indica que en ausencia de un propéptido (u otro polipéptido) unido al N-terminal de la IL-18 madura, la proteína de fusión IL-18-Fc es completamente funcional. Es importante destacar que el desenmascaramiento de FUSE-499 con Caspasa 1 dio como resultado la restauración de la actividad biológica que no fue apreciablemente diferente de la IL-18 recombinante humana. El tratamiento de FUSE-500, que no contenía un dominio de enmascaramiento ni sitio de escisión de Caspasa 1, con Caspasa 1 sirvió como control negativo y de hecho no tuvo efecto sobre la actividad biológica. Estos

datos indican que en la configuración por la cual IL-18AV se une al N-terminal de una IgG, se requiere el propéptido para la atenuación. Tomado junto con nuestros datos previos de que un dominio CH3 o HSA atenuó la actividad biológica de IL-18AV e IL-18mut2AV al fusionarse al extremo N de cada variante de IL-18 sin la presencia de un propéptido, se plantea la hipótesis de que cualquier polipéptido de tamaño suficiente fusionado al N-terminal de la IL-18 madura y/o sus variantes y fragmentos de esta sería capaz de enmascarar la actividad biológica de IL-18. Si bien el polipéptido más pequeño ensayado fue el propéptido (~6 kDa), polipéptidos tan pequeños como 2 kDa también serían de tamaño suficiente. En diversas modalidades, el polipéptido corto o proteína es de aproximadamente 2 kDa o no mayor que 250 kDa. Como ejemplos adicionales, el polipéptido o proteína corto tiene aproximadamente 2-5 kDa, aproximadamente 6-10kDa, aproximadamente 11-20 kDa, aproximadamente 21-30 kDa, aproximadamente 31-40 kDa, aproximadamente 41-50 kDa, aproximadamente 51-75 kDa, aproximadamente 76-100 kDa, aproximadamente 101-125 kDa, aproximadamente 126-150 kDa, aproximadamente 151-175 kDa, aproximadamente 176-200 kDa, aproximadamente 201-225 kDa, o aproximadamente 256-250 kDa. Como ejemplos adicionales, el polipéptido corto tiene 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o enlazadores flexibles o aminoácidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos. En diversas modalidades, el polipéptido corto tiene 1, 2, 3 o 4 aminoácidos, o enlazadores flexibles o cadena de aminoácidos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o 35 aminoácidos. Ejemplos adicionales. Los polipéptidos pequeños capaces de enmascarar la actividad biológica de las variantes de IL-18 e IL-18 incluyen, pero no se limitan a, un dímero de dos aminoácidos, un trímero de tres aminoácidos, un 4-mero de cuatro aminoácidos, un 5-mero de cinco aminoácidos, o un péptido seleccionado del grupo que consiste en T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (sec. con núm. de ident.: 235), y $(GGGGX_\lambda$ (sec. con núm. de ident.: 236))$_n$ en

donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o un entero mayor que 5. En algunas modalidades, el enlazador de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de (GGGGS (sec. con núm. de ident.: 237))n donde n es un entero entre 1 y 5, por lo tanto un enlazador de aminoácidos de 25 aminoácidos o más corto en longitud. Ejemplos adicionales incluyen (X_λGGGG (sec. con núm. de ident.: 317))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λGGG (sec. con núm. de ident.: 318))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λGG (sec. con núm. de ident.: 319))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX_λG (sec. con núm. de ident.: 320))$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X_λGGG)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λGG)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n = 1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λG)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGGX_λ)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5. Ejemplos aun adicionales incluyen (X_λGG)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GX_λG)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n = 1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GGX_λ)$_n$ en donde X_λ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades. Ejemplos aun adicionales incluyen (XλG)n en donde Xλ es Q, A, E o S y n=1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5, (GXλ)$_n$ en donde Xλ es Q, A, E o S y n = 1-5 o en algunas modalidades, un entero mayor que 5.

Además, el propéptido en FUSE-499 no se transporta naturalmente a través del ER, sino que se diseñó para hacerlo mediante la adición de una secuencia líder IgK aguas arriba. Esto indica que cualquier polipéptido de tamaño suficiente fusionado al N-terminal de la IL-18 madura y/o sus variantes y fragmentos de esta se esperaría que atenúe

la actividad biológica de IL-18. Es decir, el polipéptido N-terminal podría translocarse naturalmente en el retículo endoplásmico (ER) o puede ser diseñado para hacerlo. En ambos casos, el transporte a través del ER es importante para obtener rendimientos de expresión a partir de la transfección transitoria de células de mamíferos tales como Expi-CHO aceptables para el desarrollo terapéutico.

Como se muestra en las Figuras 51A-51I, se examina si proteasas distintas de la prueba de concepto EK podrían usarse para desenmascarar/activar pro-IL-18. Como tal, elegimos (a) la metaloproteinasa de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), MMP2, reportada como sobreexpresada preferentemente en el microambiente tumoral y (b) Granzima B, que es liberada por linfocitos citotóxicos incluyendo células NK y células T CD8+ y por lo tanto puede acumularse en tumores inflamados. Para MMP2, se reemplaza el sitio de escisión EK dentro del propéptido (pp) de FUSE-442 (Fc-EKpp-IL-18AV) con (a) la secuencia de escisión MMP2/9 (GPLGVR (sec. con núm. de ident.: 89)) para generar FUSE-486 (Fc-MMP2pp-IL-18AV) y (b) la secuencia de escisión MMP9/2 (VHMPLGFLGP (sec. con núm. de ident.: 90)) para generar FUSE-487 (Fc-MMP2/9pp-IL-18AV). (Desnoyers et al., *Sci Transl Med*. 2013 Oct 16;5(207):207ra144.) En cada caso, la MMP a la izquierda de la barra inclinada hacia adelante escinde preferentemente la secuencia peptídico antes mencionada. Para la granzima B, se sustituyó el sitio de escisión EK dentro del propéptido (pp) tanto de FUSE-442 (Fc-EKpp-IL-18AV) como de FUSE-424 (Fc-EKpp-IL-18mut2AV) con un sitio de escisión prototípico para granzima B (IEQD (sec. con núm. de ident.: 88)); por lo tanto, generando FUSE-485 (Fc-GzmBpp-IL-18AV) y FUSE-462 (Fc-GzmBpp-IL-18mut2AV). FUSE-486, FUSE-487, FUSE-485 y FUSE-462 se ilustran en las Figuras 51A y 51D. Usando el ensayo de células indicadoras HEK-Blue-IL-18 como lectura, se expuso estas células a una titulación de (a) FUSE-486 o FUSE-487 (19B) con o sin tratamiento con MMP2 humana recombinante

o (b) FUSE-485 o FUSE-462 con o sin granzima B humana recombinante (FUSE-485 y FUSE-462) (ver la Figura 51D). La actividad biológica, medida como el EC50-SEAP, de las fusiones de profármacos MMP, FUSE486 y FUSE487, se atenuó en gran medida en los órdenes de hasta aproximadamente 5000 veces en comparación con rhIL8. Después del tratamiento de FUSE-486 con MMP2, la actividad biológica del fragmento de IL-18AV desenmascarado se restableció a dentro de 3 veces la de rhIL-18. A continuación, se añade un sitio de escisión Granzima B inmediatamente C-terminal al sitio MMP en FUSE486 para crear FUSE587 (triángulo negro). Como se ve en la Figura 51C, FUSE587 estaba aproximadamente 3.000 veces atenuada en relación con la IL-18 humana recombinante.

Curiosamente, observamos que la escisión de FUSE587 con MMP2 liberada y la variante de IL-18AV que aún estaba aproximadamente 100 veces atenuada en relación con la IL-18 recombinante. En contraste, la escisión con Granzima B liberó una variante de IL-18AV con actividad similar a la IL-18 recombinante. La escisión con Granzima B da como resultado la liberación de IL-18AV madura sin ningún residuo N-terminal que constituya un voladizo, mientras que los voladizos de polipéptido N-terminal de 11 y 15 aminoácidos permanecen después de la escisión de FUSE486 y FUSE587, respectivamente, con MMP2. Especulamos que estos voladizos podrían estar atenuando la actividad de IL-18AV, aunque en menor grado que el propéptido variante de tamaño completo. Este fenómeno se investigó adicionalmente en la Figura 43 y la Figura 45.

FUSE-485 y FUSE-462 también fueron altamente atenuadas en comparación con la IL-18 recombinante humana en los órdenes de >15.000 veces (19E y 19F). El tratamiento con Granzima B humana recombinante (rhGb), diseñado para escindir el fragmento IL-18AV y el fragmento IL-18mut2AV de FUSE-485 y FUSE-462, respectivamente, condujo a la restauración de la actividad biológica. En ambos casos, las variantes de IL-18 enmascaradas presentaron

una atenuación casi idéntica y la actividad biológica restaurada fue aproximadamente 2 veces más débil que la IL-18 madura humana recombinante. Además, no observamos una diferencia apreciable entre la actividad de la IL-18AV desenmascarado e IL-18mut2AV.

Las tablas de síntesis de las potencias (EC50-SEAP) para cada uno de los artículos de prueba se muestran a continuación en las Figuras 51A-51B y en la Figura 51F.

A continuación, se examina si nuestro hallazgo pudiera formar la base para una plataforma de IL-18 enmascarada ‘plug and play’ para dirigir variantes pro-IL-18 a proteínas de la superficie celular que incluyen, pero no se limita a, antígenos asociados a tumores (TAA). Como tal, usamos Cetuximab como nuestra proteína dirigida TAA de prueba de concepto para la fusión pro-IL-18. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal dirigido al EGFR que se usa comercialmente para el tratamiento de múltiples indicaciones de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal y de cabeza y cuello. Primero, fusionamos una pp-IL-18AV escindible Granzima B en el C-terminal del dominio Fc de Cetuximab. Encontramos esa fusión de pp-Gb-IL-18AV sobre el dominio CH3 de Cetuximab, que forma un homodímero natural, expresado pobremente. Esto se debió presumiblemente a la presencia de dos fab debido a que un botón en formato IgG1 de orificio en la que ppGb-IL-18AV se fusionaba con el botón C-terminal (u ojal) y la fab específica de EGR se fusionaba a el botón N-terminal (u ojal) bien expresada. FUSE-517 (Cetuximab_ KiH_ppGb-IL-18-AV), como se ilustra en el panel G consiste en el fab de Cetuximab fusionado al N-terminal del botón Fc y ppGb-IL-18AV fusionado al C-terminal del botón Fc. Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, expusimos estas células a una titulación de FUSE-517 (19H) con o sin tratamiento con rhGb. En relación con rhIL-18, FUSE-517 fue altamente atenuada en el orden de >250.000 veces. El tratamiento de FUSE-517 con rhGb, diseñado para escisión de IL-18AV, condujo a la restauración de la actividad biológica dentro de 2 veces la de rhIL-18.

La Figura 51I es tablas resumidas de potencias (EC50-SEAP) relacionadas con los datos mostrados en la Figura 51H. En general, los datos indican fuertemente que tanto la MMP2 como la granzima B son capaces de desenmascarar/activar IL-18AV (e IL-18mut2AV con Granzima B) en el contexto de una máscara pp fusionada entre un dominio CH3 de IgG y el fragmento madura de IL-18AV. Dada nuestra capacidad para usar con éxito otros polipéptidos que se translocan a través del ER como máscaras cuando se fusionan al N-terminal de múltiples variantes de IL-18, nuestra observación sugiere fuertemente que las proteínas de fusión enmascaradas de IL-18, sus variantes o fragmentos de estas pueden ser diseñadas para ser activadas selectivamente por proteasas encontradas en tumores/tumores inflamados incluyendo MMP y Granzimas. Como se muestra en la Figura 52, se examinó la susceptibilidad de variantes selectas de IL-18 a la atenuación de la actividad biológica por su antagonista natural, IL-18 BP. El panel A de la Figura 52 es una ilustración de las proteínas de fusión IL-18 examinadas. Es decir, FUSE-442 (Fc-EKpp-IL-18AV) y FUSE-424 (Fc-EKpp-IL-18mut2AV). Ambas variantes contienen las mismas sustituciones de cisteína a valina, sin embargo, FUSE-424 alberga una IL-18AV madura (denominado IL-18mut2AV) aguas abajo del polipéptido (pp) que incluye las siguientes mutaciones: M87K, K89G, M696L y M149V. Estos cuatro residuos dentro del fragmento madura de 18 kDa de IL-18 se describieron previamente como importantes para la aglutinación/enmascaramiento de IL-18 silvestre. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que la sustitución de estos residuos reduciría la unión de IL-18 BP de tal manera que IL-18AVmut2 mantendría la actividad biológica en presencia de IL-18BP, que a menudo está sobrerrepresentada en relación con IL-18 en el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés). Al igual que en ejemplos anteriores, se usó HEK Blue IL-18 para evaluar la actividad biológica a través de SEAP impulsado por MYD88 y la potencia reportada como EC50-SEAP. FUSE-442 (Fc-EKpp-IL-18AV) y FUSE-424 (Fc-

EKpp-IL-18mut2AV) se trataron con EK para liberar IL-18AV o IL-18mut2AV maduras, respectivamente. A continuación, cada producto de escisión se titula de 1 pg/ml a 1 pg/ml en medio solo o en medios que contenían 1,25 pg/ml de IL-18-BP recombinante humana (hrIL-18-BP). Se usó IL-18 recombinante humana (hrIL-18) como molécula de referencia para la inhibición silvestre de la actividad del indicador HEK Blue IL-18 mediada por rhIL-18BP. Los paneles B (rhIL-18), D (FUSE-442) y F (FUSE-424) son gráficos x-y no lineales de liberación SEAP (actividad de indicadora IL-18R) en el eje y versus la concentración del artículo de prueba en el eje x en presencia o ausencia de IL-18BP. Una síntesis de las potencias biológicas (EC50-SEAP) relevantes para cada gráfico se muestra como paneles C, E y G (debajo de cada gráfica x-y). Como está bien documentado, observamos una fuerte atenuación de rhIL-18 por rhIL-18BP en el orden de al menos 300-1000 veces. Para la IL-18AV liberada de FUSE442, observamos una atenuación de aproximadamente 100 a 150 veces de la actividad biológica (es decir, ~3-6 veces menos que rhIL-18) lo que sugiere que la afinidad aparente de IL-18AV por IL-18BP es más débil que la de rhIL-18 para IL-18BP. Es importante destacar que el producto de escisión de FUSE424, IL-18mut2AV, parecía resistente a la atenuación biológica por rhIL-18BP. Como se ve en el panel F, no observamos ninguna diferencia apreciable en la actividad biológica entre IL-18mut2AV liberada de FUSE424 y la misma molécula expuesta a rhIL-18BP. Estos datos sugieren fuertemente que IL-18mut2AV se une con una afinidad aparente mucho más débil a rhIL-18BP en comparación con IL-18AV o rhIL-18. Como tal, se puede predecir que una versión enmascarada de IL-18mut2AV diseñada para ser liberada por proteasas presentes en el TME que incluyen, pero no se limita a, MMP2, 9 y 14 y/o proteasas liberadas en tumores inflamados que incluyen pero no se limitan a las Granzimas A, B y M, funcione en presencia

de IL-18BP para promover la actividad antitumoral a través de múltiples vías que incluyen, pero sin limitación, la actividad Th1 y Tc1 mediada por IFNγ.

Como se muestra en la Figura 53, se examina el impacto del tamaño de polipéptidos fusionados al extremo N de IL-18 madura sobre la actividad biológica de un solo IL-18AV fusionado al extremo N de IgG1 Fc. Los paneles A son ilustraciones ejemplares de IL-18AV fusionadas en el botón de un botón en el dominio IgG1-Fc del ojal con polipéptidos de diferente tamaño que van desde una variante de propéptido (FUSE-499; descrito en la Figura 50) a 35 aminoácidos (FUSE756) a 15 aminoácidos (FUSE757 y FUSE758). Para permitir la translocación de todas las construcciones al retículo endoplásmico (ER) de células de mamífero y por tanto la expresión/secreción, el péptido señal de la cadena Ig Kappa (líder IgK) se codificaba aguas arriba de los polipéptidos (y se escindió la peptidasa señal en el ER). Los polipéptidos de FUSE756 y FUSE757 están conformados por una serie de residuos de glicina y serina, mientras que el de FUSE758 es la secuencia del voladizo generado por la escisión mediada por MMP2 del sitio de escisión de MMP, KPLGLQARVVGGGG (sec. con núm. de ident.: 568). En estos tres casos, el extremo C de los polipéptidos N-terminales también incorporó el sitio granzima B, IEQD (sec. con núm. de ident.: 88). Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, se examina la capacidad de los polipéptidos de diferentes tamaños para atenuar/enmascarar IL-18AV-Fc (FUSE500; cuadrados cerrados) o rhIL-18 (equis negras “X”). Todos los polipéptidos fusionados al N-terminal de IL-18AV madura redujeron la actividad biológica, medida como EC50-SEAP, en al menos 100 veces. FUSE499 (triángulos cerrados) fue el más atenuada (>10.000 veces). FUSE757 (diamantes cerrados) y 758 (triángulo inverso abierto), ambos de los cuales incluían 11 polipéptidos de aminoácidos fusionados al N-terminal de IL-18AV madura, fueron aproximadamente 250 veces menos activos biológicamente en relación con FUSE500 o rhIL-18. FUSE756 (triángulos abiertos),

que contenía un polipéptido de 31 aminoácidos polipéptidos fusionados al N-terminal de IL-18AV madura era aproximadamente 1000 veces menos activo biológicamente en relación con FUSE500 o rhIL-18. Así, todos los polipéptidos ensayados y proteínas más grandes incluyendo HSA y fragmentos de IgG de ejemplos anteriores, fusionados al N-terminal de IL-18AV madura, independientemente de su tamaño o constitución de aminoácidos, atenuaron la actividad biológica de la IL-18 madura. El grado de atenuación parece correlacionarse positivamente con el tamaño del polipéptido/proteína fusionada al N-terminal de IL-18.

Ejemplo 40

Técnicas y Procedimientos

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con IL-18 o proteínas FUSE

Las células HEK-BLUE™-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo (medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de Normocina y 1× reactivo de selección HEK-Blue). Las células IL-18 HEK-BLUE™ se diseñan a partir de la línea celular del riñón embrionario humano 293 (HEK293) para expresar de manera estable genes que codifican el receptor de IL-18 (IL-18R) y la proteína accesoria del receptor de IL-18 (IL-18RAP) y expresar un gen indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) inducible por NF-Kb/AP-1, por lo que son útiles para la detección de IL-18 bioactiva mediante el monitoreo de la activación de las vías NF-Kb y AP-1 mediante cuantificación en el sobrenadante del nivel SEAP (que se produce después de la activación de NF-Kb) con una solución tal como QUANTI- Solución BLUE™. Además, las respuestas a TNF-α e IL-1β humanos se han bloqueado en las células HEK- BLUE™ IL-18, por lo que las células HEK- BLUE™ IL-18 son sensibles específicamente a IL-18.

El día de la configuración del experimento, las células HEK-BLUE-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en medio de ensayo precalentado (DMEM con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mM, 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) a la densidad de 5×10^5 células por ml. Para sembrar las células (50000 células por pocillo), se añadieron 100 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en una placa de 96 pocillos.

Para la preparación de proteínas, las proteínas FUSE se diluyeron en medio de prueba de 500000 pg/ml a 6,4 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en medio de prueba de 800 pg/ml a 1,28 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 100 µl de proteínas IL-18 o FUSE preparadas a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos, y después las proteínas se mezclaron suavemente con las células. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Después de 24 horas de activación, las células HEK-Blue-IL-18 liberaron fosfatasa alcalina secretada en el sobrenadante. Se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, se preparó la solución Quanti-Blue de Invivogen añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 180 µl de solución Quanti-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la OD a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con proteínas FUSE escindidas con enteroquinasa (EK)

Las células HEK-Blue-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo. El día de la configuración del experimento, las células HEK-Blue-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en medio de ensayo precalentado a la densidad de 5×10^6 células por ml. Para sembrar las células (50000 células por pocillo), se añadieron 100 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en una placa de 96 pocillos.

Para la escisión proteica FUSE, se mezclaron 4 µg de proteína FUSE con 80 ng de enzima EK y 2 µl de 10× PBS en un tubo. Se añadió agua estéril al tubo para llevar el volumen de reacción total a 20 µl. Después, el tubo se incubó a 25 °C durante 40 minutos. Después de 40 minutos de incubación, las proteínas FUSE escidieron en medio de ensayo de 500000 pg/ml a 6,4 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en medio de prueba de 800 pg/ml a 1,28 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 100 µl de IL-18 preparadas o proteínas FUSE escindidas a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas.

Después de la activación de 24 horas, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 con fosfatasa alcalina secretada a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución Quanti-blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 180 µl de solución Quanti-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 ul de sobrenadante de cultivo celular

HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la OD a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con proteínas FUSE escindidas con metaloproteinasa de matriz (MMP)

Las células HEK-Blue-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo. El día de la configuración del experimento, las células HEK-Blue-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en medio de ensayo precalentado a la densidad de 5×10^6 células por ml. Para sembrar las células (50000 células por pocillo), se añadieron 100 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en una placa de 96 pocillos.

Para la escisión de la proteína FUSE, se mezcló 1 µg de proteína FUSE con 280 ng de enzima MMP2 o MMP9 y 2,8 µl de regulador de ensayo 10× (Tris 500 mM, CaCl2 100 mM, NaCl 1500 mM, 0,5 % (p/v) de Brij-35, pH 7,5),) en un tubo. Se añadió agua estéril al tubo para llevar el volumen de reacción total a 28 µl. Después, el tubo se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después de 2 horas de incubación, las proteínas FUSE escidieron en medio de ensayo de 500000 pg/ml a 6,4 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en medio de prueba de 800 pg/ml a 1,28 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 100 µl de IL-18 preparadas o proteínas FUSE escindidas a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas.

Después de la activación de 24 horas, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 con fosfatasa alcalina secretada a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución Quanti-blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 180 µl de solución Quanti-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la OD a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con proteínas FUSE escindidas con caspasa I

Las células HEK-Blue-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo. El día de la configuración del experimento, las células HEK-Blue-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en medio de ensayo precalentado a la densidad de 5×10^5 células por ml. Para sembrar las células (50000 células por pocillo), se añadieron 100 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en una placa de 96 pocillos.

Para la escisión de la proteína FUSE, se mezclaron 14 µg de proteína FUSE con 0,5 unidades de enzima Caspasa I y 2,8 µl de regulador de ensayo 10× **(**Hepes 500 mM, pH 7,2, NaCl 500 mM, 1 % de Chaps, 100 mM EDTA, 50 % de glicerol y DTT 100 mM) en un tubo. Se añadió agua estéril al tubo para llevar el volumen de reacción total a 28 µl. Después, el tubo se incubó a 37 °C durante 2 horas. Después de 2 horas de incubación, las proteínas FUSE escidieron en medio de ensayo de 500000 pg/ml a 6,4 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en

medio de prueba de 800 pg/ml a 1,28 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 100 µl de IL-18 preparadas o proteínas FUSE escindidas a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Después de la activación de 24 horas, se transfirieron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 con fosfatasa alcalina secretada a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución Quanti-blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 180 µl de solución Quanti-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la OD a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de activación celular HEK-Blue-IL-18 con proteínas FUSE escindidas con granzima B

Las células HEK-Blue-IL-18 de Invivogen se mantuvieron en medio de cultivo. El día de la configuración del experimento, las células HEK-Blue-IL-18 se enjuagaron suavemente dos veces con solución salina regulada con fosfato precalentada (PBS) y después se separaron en PBS tocando el matraz. Las células HEK-Blue-IL-18 desprendidas se resuspendieron en medio de ensayo precalentado a la densidad de 5×10^5 células por ml. Para sembrar las células (50000 células por pocillo), se añadieron 100 µl de células HEK-Blue-IL-18 resuspendidas a los pocillos designados en una placa de 96 pocillos.

La granzima B humana activa madura se generó por escisión de la progranzima B humana usando la enzima EK. En breve, se mezclaron 4 µg de progranzima

B humana con 40 ng de enzima EK y 2 µL de 10× PBS en un tubo. Se añadió agua estéril al tubo para llevar el volumen de reacción total a 20 µl. Después, el tubo se incubó a 25 °C durante 40 minutos. Después de 40 minutos de incubación, se usó la granzima B humana activada para escindir las proteínas FUSE. En breve, se mezclaron 10 µg de proteínas fusibles con 1 ug de granzima B humana activada en regulador de ensayo (HEPES 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, 0,1 % de CHAPS, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol) y se incubaron durante cierto tiempo indicado en cada experimento a 37 C.

Las proteínas fusionadas escindidas con Granzima B se diluyeron después en medio de ensayo de 500000 pg/ml a 6,4 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18 también se diluyó en medio de prueba de 800 pg/ml a 1,28 pg/ml (2× de concentración final) por dilución serial 5 veces. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se añadieron 100 µl de IL-18 preparadas o proteínas FUSE escindidas a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos y después se mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 24 horas.

Las proteínas FUSE no escindidas o escindidas se prepararon en medio de prueba de 1000000 pg/ml a 12,8 pg/ml (4× de concentración final) por dilución serial 5 veces. La IL-18BP se diluyó en medio de ensayo a la concentración de 5.000.000 pg/ml (4× de concentración final) por. Para tratar las células HEK-Blue-IL-18, se mezclaron 50 µL de proteínas FUSE preparadas no escindidas o escindidas y 50 µl de IL-18BP preparadas, se incubaron durante 1 hora, y después se añadieron a los pocillos designados con 50000 células en la placa de 96 pocillos y después mezclaron suavemente las células con proteínas. Después, la placa de 96 pocillos se incubó a 37 °C con 5 % de CO2 durante 24 horas. Dado que nuestras proteínas de fusión han atenuado la unión al complejo IL-18R, concebimos que

también tendrán una unión reducida a IL-18BP, en comparación con las proteínas FUSE escindidas, porque tanto IL-18R como IL-18BP compiten por la unión a IL-18. Las recientes estructuras cristalinas de complejos binarios y ternarios de hIL-18 con sus receptores han demostrado que IL-18BP compite directamente con el dominio D3 de hIL-18Rα por unirse a hIL-18, solapando el sitio de unión de hIL-18 II previamente identificado (Krumm, et al., *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2015 Jun 1; 71(Pt 6): 710–717).

Después de 24 horas de activación, 20 ul de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 con fosfatasa alcalina secretada se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos. Mientras tanto, la solución Quanti-blue se preparó añadiendo 1 ml de reactivo QB y 1 ml de regulador QB a 98 ml de agua estéril. Después se añadieron 180 µl de solución Quanti-Blue preparada a la placa de 96 pocillos con 20 µl de sobrenadante de cultivo celular HEK-Blue-IL-18 y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El nivel de fosfatasa alcalina secretada relacionada con la activación celular HEK-Blue-IL-18 se detectó midiendo la OD a 630 nm usando un espectrofotómetro.

Ensayo de unión por interferometría de bicapa

Las proteínas de recubrimiento se prepararon en 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 con la concentración final de 15 ug/ml. También se prepararon proteínas de captura, y se diluyeron en serie (dilución 4 veces que varía de 400 nM a 1,6 nM) en 1×PBS con 0,02 % de Tween-20. Los biosensores se prehumedecieron en 200 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 durante 10 minutos. Mientras tanto, el sistema Octet BLI (ForteBio) se precalentó durante 30 minutos y el caudal se ajustó a 1000 rpm. Los biosensores (Capture biosensor) se empaparon en 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 durante 60 segundos a 30 C para obtener una lectura inicial de línea base. Después de la lectura basal de 60 segundos, los biosensores se expusieron a proteínas de recubrimiento durante 300 segundos a 30 °C para la asociación entre

el anticuerpo y los biosensores (acoplamiento de proteínas de recubrimiento con biosensor). Los biosensores con proteínas de recubrimiento se expusieron entonces a proteínas de captura en 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 a 30 °C durante 300 segundos para la reacción de asociación entre las proteínas de recubrimiento y las proteínas de captura (curva de asociación). Después de una reacción de asociación de 300 segundos entre proteínas de recubrimiento y proteínas de captura, los biosensores con proteínas de recubrimiento y proteínas de captura se expusieron entonces a 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 a 30 C durante 300 segundos para la reacción de disociación entre proteínas de recubrimiento y proteínas de captura (curva de disociación). Para la unión a IL18BP, cada mutante de IL18 se recubrió sobre puntas del biosensor AHC y se sondeó con IL-18BP recombinante marcado con His a concentraciones que oscilaban entre 400 nM y 1,6 nM. Para la unión a IL18Rα, se recubrió IL18Rα marcado con His en puntas de biosensor de níquel y se sondeó con recombinante cada mutante de IL18 a concentraciones que oscilaban entre 400 nM y 1,6 nM. La afinidad de unión se calculó mediante el algoritmo de ajuste de datos incorporado.

Ejemplo 41

Como se muestra en la Figura 54, diseñamos once mutantes de IL-18 humana (se muestra IL-18AV) y medimos su capacidad para unir IL-18BP humana recombinante e IL-18RA humana recombinante (también denominado IL-18Rα). Todos los artículos de prueba se generaron como proteínas de fusión Fc con la variante de IL-18 fusionada al extremo N de la Fc (ver la Figura 43A). Las ubicaciones y subestaciones de aminoácidos asociadas con cada variante se representan en la Figura 54.

Para evaluar la unión a IL18BP humana o IL18R humanaα, se generaron gráficos de unión cinética vía Interferometría Bio-Capa (BLI) usando un sistema Octeto (ForteBio). Para

la unión a IL18BP, cada mutante de IL18 se recubrió sobre puntas de biosensor AHC y se sondeó con IL-18BP recombinante con His marcado a concentraciones que oscilaban entre 400 nM y 1,6 nM (Figura 54B). Para la unión a IL18Rα, se recubrió la IL18Rα etiquetada con His en puntas de biosensor de níquel y se sondeó con cada mutante IL18 recombinante a concentraciones que oscilaban entre 400 nM y 1,6 nM (Figura 54D). Las tablas de síntesis para la unión a IL-18BP e IL18-RA (afinidad de unión (KD), tasa de activación (k-on) y tasa de desactivación (k-dis)) se muestran en las Figuras 54C y 54E, respectivamente.

Los once mutantes IL-18 unidos a IL18BP con afinidad más débil que FUSE500 (IL-18-AV-Fc humana silvestre). Se asociaron cinco mutantes sin unión apreciable. Estos son FUSE545, FUSE599, FUSE600, FUSE601 y FUSE602.

En contraste, los once mutantes mantuvieron una unión apreciable a IL18RA. Las afinidades variaron de 11 nM a 30 nM, que fue solo entre 1,5 y 4 veces más débil que la afinidad de FUSE500 por IL-18RA (7,4 nM).

Ejemplo 42

Como se muestra en la siguiente tabla, tabulamos las afinidades de unión de once variantes mutantes de IL-18 humana (IL-18AV mostrada) a IL18BP humana e IL18R humanaα. Cada proteína IL-18 se generó como una proteína de fusión Fc mediante lo cual la variante de IL-18 se fusionó al N-terminal de la Fc (ver la Figura 53A).

Proteína	**Mutante**	**IL-BP Kd (nM)**	**IL-18Rα Kd (nM)**
IL18		4E-10***	2E-08****
FUSE500	AV de silvestre	7,28E-10*	7,4E-09**
FUSE 545	mut2	-	1,9E-08
FUSE 546	mut3	1,4E-07	1,8E-08
FUSE 547	mut4	4,0E-08	2,6E-08
FUSE 583	mut5	3,2E-09	1,2E-08

FUSE 584	mut6	4,0E-08	2,5E-08
FUSE 585	mut7	1,5E-07	2,0E-08
FUSE 586	mut8	2,6E-09	1,6E-08
FUSE 599	mut9	-	3,0E-08
FUSE 600	mut10	-	1,8E-08
FUSE 601	mut11	-	2,1E-08
FUSE 602	mut12	-	1,1E-08

*media de 11 mediciones, ** media de 9 mediciones

***www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.97.3.1190

****arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar3295

Ejemplo 43

Como se muestra en la Figura 55, se examina el impacto del tamaño de polipéptidos fusionados al N-terminal de IL-18 madura sobre la actividad biológica de un solo IL-18AV fusionado al N-terminal de IgG1 Fc.

Un único aminoácido N-terminal (FUSE874; triángulos abiertos hacia abajo) y polipéptidos de diferentes tamaños que van desde cinco aminoácidos (FUSE875) hasta la variante propeptídico de FUSE-499 (triángulos cerrados hacia arriba; ver la Figura 53 para la descripción) se investigaron. Se utilizó FUSE500 como control completamente activo sin un polipéptido N-terminal.

Para permitir la translocación de todas las construcciones al retículo endoplásmico (ER) de células de mamífero y por tanto la expresión/secreción, el péptido señal de la cadena Ig Kappa (líder IgK) se codificaba aguas arriba de los polipéptidos (y se escindió la peptidasa señal en el ER).

Los polipéptidos de FUSE875 (5 residuos; estrellas cerradas), FUSE876 (10 residuos; diamantes abiertos), FUSE757 (15 residuos; círculos abiertos), FUSE756 (35

residuos; triángulos cerrados hacia abajo) están conformados por una serie de residuos de glicina y serina. El polipéptido N-terminal asociado con FUSE758 (triángulos abiertos hacia arriba) es la secuencia del voladizo generado por la escisión MMP2 de FUSE486 (ver la Figura 51). Para FUSE756, FUSE757 y FUSE758, los cuatro aminoácidos finales del péptido N-terminal consistieron en el sitio de escisión de granzima B, IEQD (sec. con núm. de ident.: 88) (ver la Figura 53).

Usando el ensayo de célula indicadora HEK-Blue IL-18 como lectura, se examina la capacidad de los polipéptidos de diferentes tamaños para atenuar/enmascarar IL-18AV-Fc (FUSE500; cuadrados cerrados) o rhIL-18 (cruces negras “X”). Todos los polipéptidos y el único aminoácido (serina) fusionado al N-terminal de IL-18AV madura redujeron la actividad biológica, medida como EC50-SEAP, en al menos 10 veces.

El grado de atenuación aumentó a medida que aumentaba el tamaño del polipéptido, de tal manera que el orden de rango de atenuación se observó como FUSE499>FUSE756, FUSE757, FUSE758>FUSE876, FUSE875>FUSE874. Una tabla resumida de potencias (EC50-SEAP) se muestra debajo del gráfico x-y no lineal.

Ejemplo 44

Como se muestra en la Figura 56A-56H, se examina el impacto de la sustitución del residuo de cisteína en los residuos propéptido y cisteína en la IL18 madura, que se fusionaron juntos para formar el casete variante pro-IL-18, sobre la actividad biológica de cada variante usando el sistema de ensayo HEK Blue IL18. A menos que se indique de cualquier otra manera, las proteínas se generaron de tal manera que la variante del propéptido-IL-18 se fusionó al botón u orificio C-terminal de un botón en orificios IgG1 Fc humana como se ha ilustrado previamente en la Figura 43A con un sitio de escisión de granzima B añadido entre

la variante propéptido y la variante de IL18 madura. Las tres variantes evaluadas en la Figura 43 contenían sustituciones de serina (FUSE480), sustituciones de alanina (FUSE481) o sustituciones de valina (FUSE442) en todos los residuos de cisteína en pro-IL-18. Las variantes maduras de IL-18 liberadas de FUSE442 y FUSE481 fueron aproximadamente tan activas como la IL-18 humana recombinante, mientras que la IL18 madura liberada de FUSE480 (sustituida con serina) estaba aproximadamente 100 veces atenuada frente a la IL-18 humana recombinante (véanse las Figuras 43B-43D).

Para este ejemplo, la variante de pro-IL-18 en la que todas las cisteínas se sustituyeron por valina incluía un VHH específico de EGFR N-terminal (FUSE516; triángulo cerrado) y la variante de pro-IL-18 en la que todas las cisteínas fueron sustituidas por serina incluía un Fab específico PD-1 N-terminal (FUSE694; diamante cerrado). Al igual que en la Figura 43, se evaluó la actividad biológica de los artículos de prueba pro-IL18 usando HEK Blue IL18. Cada uno se probó como una proteína intacta no tratada o después de la exposición a Granzima B humana recombinante.

La Figura 56A muestra los resultados con FUSE516 (triángulo cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídica se reemplaza por valina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por valina. FUSE516 intacta está aproximadamente 1000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE516 (triángulo abierto) por Granzima B es aproximadamente tan activa como la IL18 humana recombinante.

La Figura 56B muestra los resultados con FUSE694 (diamante cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídica se reemplaza por serina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por serinas. FUSE694 intacta es mayor que 10.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que

la variante de IL18 madura liberada de FUSE694 (diamante abierto) por Granzima B es aproximadamente 60 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56C muestra los resultados con FUSE887 (triángulo inverso cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídico es reemplazado por treonina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por serinas. FUSE887 intacta es mayor que 10.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE887 por Granzima B (triángulo inverso abierto) es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56D muestra los resultados con FUSE888 (triángulo cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídico es reemplazado por glutamina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por serinas. FUSE888 intacta es mayor que 10.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE888 (triángulo abierto) por Granzima B es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56E muestra los resultados con FUSE889 (cuadrado cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídico se reemplaza por ácido aspártico y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por alaninas. FUSE889 intacta es mayor aproximadamente 10.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE889 por Granzima B (cuadrado abierto) es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56F muestra los resultados con FUSE890 (triángulo inverso cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídica es reemplazado por fenilalanina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por alaninas. FUSE890 intacta está aproximadamente 10.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y

que la variante de IL18 madura liberada de FUSE890 por Granzima B (triángulo inverso abierto) es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56G muestra los resultados con FUSE891 (triángulo cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídico se reemplaza por isoleucina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por valinas. FUSE891 intacta está aproximadamente 3.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE891 (triángulo abierto) por Granzima B es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

La Figura 56H muestra los resultados con FUSE892 (triángulo inverso cerrado), en el que el residuo de cisteína en su variante propeptídico es reemplazado por histidina y todas las cisteínas en su variante de IL18 madura son reemplazadas por valinas. FUSE892 intacta es mayor aproximadamente 3.000 veces atenuada en relación con la IL18 humana recombinante y que la variante de IL18 madura liberada de FUSE892 (triángulo inverso abierto) por Granzima B es aproximadamente 100 veces menos activa que la IL18 humana recombinante.

A la derecha de cada diagrama x-y no lineal se muestran tablas resumidas de potencia (EC50-SEAP).

Ejemplo 45

Como se muestra en la Figura 57A-57B, se examina el impacto de dirigir pro-IL18 a una proximidad cercana de su complejo receptor (es decir, ‘‘actividad cis’’). Las variantes pro-IL-18 analizadas fueron (a) aquella en la que todos los residuos de cisteína se sustituyeron por serinas (pro-IL18AS, FUSE782 y FUSE827) y (b) aquella en la que todas las cisteínas se sustituyeron por valinas (pro-IL18AV, FUSE783 y FUSE785). Los pro-IL18AS o pro-IL18AV se fusionaron a el botón u ojal N-terminal de un botón específica PD1 en los

ojales del anticuerpo (FUSE782 y FUSE783). El fab para estas proteínas de fusión se derivó de nivolumab. Para probar si dirigir las variantes pro-IL18 a PD1 decoradas en la misma célula que expresó el complejo IL-18R (efecto cis) mejoró la actividad biológica en comparación con las células que no estaban decoradas con PD-1 (efecto trans), (1) usamos HEK Blue IL18 como nuestro sistema indicador positivo del complejo IL18R, y (2) o bien usamos la célula sin modificación o decoramos la línea celular con el ectodominio de PD-1 usando un anticuerpo específico que contiene un fab específico CD46 (clon YS5) en el orificio N-terminal y el ectodominio PD-1 en el botón de N-terminal (FUSE986). Se eligió CD46 por su expresión reportada la línea celular HEK 293 parental (jitc.bmj.com/content/6/1/55), la cual confirmamos en HEK Blue IL18 (no mostrado). También generamos pro-IL18AS (FUSE827) y pro-IL18AV (FUSE775) que eran funcionales no dirigidas en este y solo podían funcionar en trans. FUSE827 no contenía dominio de direccionamiento (es decir, Fc solamente) y FUSE775 reemplazó el fab específico PD-1 por un VHH específico de EGFR, 9G8, cuyo ligando (EGFR) no se expresó en HEK Blue IL18 (datos no mostrados). La Figura 57A y la Figura 57B son gráficos x-y no lineales de la actividad biológica de IL18 versus la concentración de cada artículo de prueba usando HEK Blue IL18 (Figura 57A) y HEK Blue IL18 decorado con PD-1 (Figura 57B). Como se observó anteriormente para pro-IL18AS y pro-IL18AV, las sustituciones de serina dan como resultado una mayor atenuación que las sustituciones de valina. Como tal, cuando HEK Blue IL18 (Figura 57A; actividad trans solamente), se trató con (a) los mutantes de valina FUSE783 (triángulo inverso abierto) o FUSE775 (triángulo cerrado), observamos aproximadamente una atenuación de 1000 veces en relación con IL18 humana recombinante y (b) los mutantes serinos FUSE782 (triángulo abierto) y FUSE827 (triángulo inverso cerrado), observamos aproximadamente mayor que una atenuación de 100.000 veces en relación con la IL18 humana recombinante.

Con respecto a la actividad cis (Figura 57B usando HEK Blue IL18 decorado con PD-1), se observa una mayor actividad biológica de las versiones de pro-IL18AS dirigidas por PD-1 (FUSE782; aproximadamente 100 veces en relación con FUSE827 no dirigida) y pro-IL18AV (FUSE783; aproximadamente 30 veces en relación con FUSE775 no dirigida).

Se usó FUSE691 (nivolumab) como anticuerpo de control negativo tanto en la Figura 57A como en la Figura 57B. No se observó actividad biológica a partir de este artículo de prueba. No se observó diferencia apreciable en las actividades biológicas de IL18 humana recombinante o los artículos de prueba no dirigidos (FUSE775 y FUSE827), lo que permite la comparación a través de la Figura 57A y la Figura 57B. En este contexto, las versiones dirigidas a PD-1 de pro-IL18AS (FUSE782) y pro-IL18AV (FUSE783) fueron aproximadamente 100 y 30 veces más activas cuando se expusieron a la IL-18 Blue HEK decorada con PD-1 que la HEK Blue L18 no decorada.

Debajo de cada gráfica se muestran tablas resumidas de la potencia de cada variante pro-IL18.

Ejemplo 46

Como se muestra en la Figura 58, el panel A ilustra un TCE biespecífico ilustrativo en el formato 11A a través del cual un Fab específico para CD3 se fusiona al extremo N de una cadena de botón de un supercóntigo IgG1 Fc heterodimérico de botón en ojal (KIH) y dos VHH anti-TAA se fusionan en tándem con el extremo N de una cadena de orificios del supercóntigo KIH. El panel B es un TCE biespecífico ilustrativo en formato 13cA a través del cual un Fab específico de CD3 se fusiona en una de sus dos cadenas polipeptídicas al extremo N de la cadena de botón de un supercóntigo KIH, un primer VHH específico de TAA se fusiona al extremo N de una cadena de orificios y un segundo VHH específico de TAA se fusiona al

extremo C de la cadena ligera del Fab específico de CD3. El panel C es un TCE biespecífico ilustrativo en formato Ac13 a través del cual un Fab específico de CD3 se fusiona en una de sus cadenas polipeptídicas al extremo N de la cadena de orificio de un supercóntigo KIH, un primer VHH específico de TAA se fusiona al extremo N de una cadena de botón y un segundo VHH específico de TAA se fusiona al extremo C de la cadena ligera del Fab específico de CD3. El formato Ac13 en el panel B es una imagen espejo de 13cA ilustrada en el panel B. Los paneles D y E representan los TCE biespecíficos de control usados para los ejemplos a continuación en los formatos 12A (panel D) y 1A (panel E), respectivamente. En ambos casos, el Fab específico para CD3 se fusiona en una de sus dos cadenas polipeptídicas al extremo N de la cadena de botón de un supercóntigo KIH y un scFV específico de TAA bien descrito se fusiona al extremo N de la cadena de orificio (formatos 1A y 12A) o tanto al extremo N como al extremo C de la cadena de orificios (formato 12A). En algunas modalidades, el Fab específico para CD3 puede ser una variante del clon del anticuerpo 1F3, hu-1F3.

Como se muestra en la Figura 59, se presentan tablas de los rendimientos de proteínas de las transfecciones transitorias de células CHO de los TCE ilustrativos (Figura 59A) y sus temperaturas de fusión (Figura 59B).

Como se muestra en la Figura 60, se estudió la aparente afinidad de unión (EC_{50}) de TCE para células T que expresan CD3 de primates humanos y no humanos (NHP, Cynomolgus). Se examinó la magnitud en la que los TCE específicos para ROR1 se unieron a los CD3 expresados en la superficie celular (se muestran TCE seleccionados, FUSE-393 y FUSE-394). Los gráficos en los paneles A a D son gráficos x-y no lineales que ilustran las afinidades de unión aparentes (unión a EC50) de FUSE-393 (formato 11A que incorpora el VHH 5A1 específico para ROR1) y FUSE-394 (formato 13cA que incorpora el VHH 5A1 específico para ROR1), para CD3 humano en células T Jurkat (panel A), CD3 humano en

células T Jurkat de eliminación CD3 (panel B)), NHP CD3 en células pan-T cynomolgus (panel D), y CD3 humano en células T aisladas de PBMC humanas (panel C). El brazo de unión Fab específico para CD3 se presume responsable de la unión observada. Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. La unión se midió mediante citometría de flujo a diversas concentraciones de artículos de prueba utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente específico para el dominio Fc de IgG1. La afinidad aparente calculada para cada sujeto de prueba con base en los datos se muestra debajo de cada gráfica. Se observó una diferencia de menos de 2 veces en la afinidad de unión aparente para el CD3 humano y el de cynomolgus para FUSE-393 y FUSE-394; y no se observó una unión no específica apreciable. La unión a CD3 de ratón no se probó debido a que el clon anti-CD3, 1F3-3, incorporado al TCE es una variante humanizada del clon SP34, que se derivó en ratón y está bien descrito como que no presenta unión al CD3 de ratón.

Como se muestra en la Figura 61, se estudió la afinidad de unión aparente (EC_{50}) de los TCE para ROR1 a diferentes densidades de superficie celular de la célula tumoral diana. Los paneles A-D son gráficos x-y no lineales que ilustran las afinidades de unión aparentes (unión EC_{50}) de FUSE-394 (es decir, la afinidad aparente derivada del VHH específico para ROR1 en el formato 13cA que incorpora el VHH específico para ROR1 que tiene la secuencia 5A1) y FUSE-393 (formato 11A que incorpora el VHH específico para ROR1, 5A1) para ROR1 humano expresado a diferentes densidades en la superficie variantes de células MDA-MB-231 diseñadas genéticamente. Las densidades de la superficie celular son las siguientes: aproximadamente 2.000.000 de moléculas por célula (panel A), aproximadamente 500.000 moléculas por célula (panel B), aproximadamente 35.000 moléculas por célula (panel C), y aproximadamente 17.000 moléculas por célula (panel D). Además, también se generó una línea celular MDA-MB-231 eliminada para

ROR1 usando CRISPR/Cas9, que sirvió como control para la unión no específica (panel E). Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. La unión se midió mediante citometría de flujo a diversas concentraciones de artículos de prueba utilizando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente específico para el dominio Fc de IgG1. Debajo de cada gráfica se muestra la afinidad aparente calculada en base a los datos para cada artículo de prueba. Se encontró que FUSE-394 se unía a ROR1 con una afinidad de unión aparente mayor que FUSE-393, que varió de aproximadamente 4 veces a menos de 2 veces mayor dependiendo de la densidad de la superficie celular de ROR1. En general, la aparente afinidad tanto para FUSE-393 como para FUSE-394 se correlacionó positivamente con la densidad de superficie celular de ROR1. Para FUSE-394, la afinidad aparente varió de aproximadamente 100 nM a una densidad de superficie celular baja a aproximadamente 5 nM a una densidad de superficie celular alta. Para FUSE-393, la afinidad aparente varió de aproximadamente 300 nM a una densidad de superficie celular baja a aproximadamente 15 nM a una densidad de superficie celular alta. No se observó unión no específica apreciable ni para el control específico de HEL con células ROR1+ MDA-MB-231 ni para las TCE con células eliminadas MDA-MB-231 ROR1. No se observó unión al ROR1 de ratón usando la célula 4T1 de ratón diseñada genéticamente para expresar de manera estable el ROR1 del ratón (datos no mostrados). Qi et al. (véase www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29844189/) informó anteriormente que el dominio específico de ROR1 dirigido por un anticuerpo biespecífico CD3 x ROR1 o TCE puede afectar su potencia. Esto incluye la EC50 de liberación de citocinas proinflamatorias y la EC50 de la destrucción de las células tumorales que expresan ROR1 (pero no necesariamente la destrucción máxima). Los autores demostraron que cuanto más cerca está el epítopo del aglutinante ROR1 del TCE a la membrana celular, más potente es el

TCE. El ectodominio ROR1 consiste en tres dominios. El dominio Kringle próximo a la membrana, el dominio Ig distal a la membrana y el dominio Frizzled en el medio. Por lo tanto, los autores demostraron que el aglutinante específico del dominio Kringle, R11, cuando se formatea como un anticuerpo biespecífico CD3 es más potente que un aglutinante específico para la región entre el dominio Ig y Frizzled. Es importante destacar que Gohil demostró que el mismo aglutinante ROR1 (hF(1x1)) cuando se formateaba como un (scFv)2 o BiTe (sinapsis corta) pero no un anticuerpo biespecífico simétrico (sinapsis más grande), mediaba la destrucción de células tumorales ROR1+ (véase www.discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10042372/1/GOHIL_SH_DEPOSIT.pdf). Se cree que esta relación entre el tamaño y la potencia sináptica es el resultado de la magnitud de la señal transmitida mediante el complejo TCR/CD3, por lo que cuanto más corto sea el puente o sinapsis entre la célula T y el tumor objetivo, más fuerte será la señal de activación. Esto está mediado, al menos en parte, por un mayor compromiso de moléculas de adhesión exclusión de grandes moléculas inhibidoras como CD45 de la sinapsis más pequeña. La fuerte señal de activación, sin embargo, está asociada con una advertencia importante. Es decir, que aunque la intensidad de la señal necesaria para inducir la destrucción es menor que la requerida para la liberación de citocinas (véase www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2334336100), las sinapsis muy cortas no pueden aprovechar este fenómeno para inducir una fuerte destrucción de células tumorales con una liberación de citocinas modulada o ajustada para reducir el riesgo de toxicidades mediadas por citocinas, tal como el síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés) y la neurotoxicidad. Sin querer limitarse por cualquier teoría particular, se cree que si bien la unión al dominio Kringle o Frizzled puede maximizar la potencia de destrucción, puede ser posible administrar una dosis mayor para lograr una destrucción

máxima similar al dirigirse al dominio Ig distal a la membrana. Las Figuras 61F-61H son histogramas citométricos de flujo superpuestos de unión de artículos de prueba ilustrativos a células HEK-293 (control negativo; Figura 61F), células HEK-293 transfectadas con ROR1 humano de longitud completa (Figura 61G) y células HEK-293 transfectadas con el dominio Ig ROR1 unido a la superficie celular mediante el enlazador GPI de CD59 (Figura 61H). Se ensayó la unión de 2A11 (línea negra), 5A1 (línea gris oscuro) y VHH8 (línea gris media) en formato TCE 12A. El Ab específico de ROR1 comercial reportado para unirse al dominio ROR1-Ig 2A2 (línea gris claro), sirvió como control positivo y anti-HEL (línea negra punteada) sirvió como control negativo. Para visualizar mejor la unión de cada artículo de prueba a las tres líneas celulares, graficamos MFI en el eje Y para cada artículo de prueba para células HEK-293 (control negativo; Figura 61I), células HEK-293 transfectadas con ROR1 humano de longitud completa (Figura 61J) y células HEK-293 transfectadas con el dominio Ig ROR1 unido a la superficie celular mediante el enlazador GPI de CD59 (Figura 61K). Se encontró que los VHH 2A11 y 5A1 específicos para ROR1 se unieron al dominio Ig de ROR1 pero los VHH8 específicos para ROR1 no lo hacían.

Como se muestra en las Figuras 62A-62D, se evaluaron las afinidades de unión (KD) de los TCE para ROR1. Examinamos la magnitud por la cual varios TCE y mutantes de estos se unen a ROR1 recombinante. Las gráficas de unión cinética se generaron mediante interferometría de biocapa (BLI) usando un sistema Octeto. Para cada TCE, las puntas del biosensor se recubrieron con proteínas FUSE a 15 µg/ml y se sondearon con ROR1 etiquetado con His recombinante en concentraciones que varían de 100 pM y 10 µM. Los TCE parentales analizados fueron FUSE-211 (formato 11A que incorpora 2A11, un VHH específico para ROR1), FUSE-393 (formato 11A que incorpora 5A1, un VHH específico para ROR1), y FUSE-394 (formato 13cA que incorpora 5A1, un VHH específico para ROR1), que

se muestran en las Figuras 62A-62C, respectivamente. La afinidad de unión (KD), la tasa de activación (k-on) y la tasa de desactivación (k-dis) se resumen para ROR1 en la Figura 62D.

Se examinó además el impacto de mutar los residuos de cisteína localizados en CDR1 y CDR3 de 2A11 VHH y 5A1 VHH. Como tal, los VHH 2A11 y 5A1 parentales se expresaron como proteínas de fusión VHH-humano-Fc, FUSE-112 y FUSE-179, respectivamente. Para el mutante 2A11 (FUSE-453) y el mutante 5A1 (FUSE-454), los residuos de cisteína tanto en CDR1 como en CDR3 se mutaron a valinas, de manera que 2A11-CDR1 se cambió de GSTYSANC (sec. con núm. de ident.: 325) (FUSE-112) a GSTYSANV (sec. con núm. de ident.: 569) (FUSE-453), 2A11-CDR3 se cambió de AYGGSRCVYNY (sec. con núm. de ident.: 327) (FUSE-112) a AYGGSRVVYNY (sec. con núm. de ident.: 570) (FUSE-453), 5A1-CDR1 se cambió de GYTNRLKC (sec. con núm. de ident.: 328) (FUSE-179) a GYTNRLKV (sec. con núm. de ident.: 571) (FUSE-454) y 5A1-CDR3 se cambió de DVRPDGTTCHYN (sec. con núm. de ident.: 572) (FUSE-179) a DVRPDGTTVHYN (sec. con núm. de ident.: 573) (FUSE-454). La afinidad de unión (KD), la tasa de activación (k-on) y la tasa de desactivación (k-dis) se resumen para ROR1 en las Figuras 62G y 62J. Las curvas de unión para FUSE-112, FUSE-453, FUSE-179 y FUSE-454 se muestran en las Figuras 62E, 62F, 62H y 62I, respectivamente donde la Figura 62E versus 62F compara 2A11 parental con el mutante 2A11 y la Figura 62H versus 62I compara 5A1 parental con el mutante 5A1. Tanto FUSE-112 como FUSE-179 se unían a ROR1 con KD de aproximadamente 4 nM, mientras que la unión de FUSE-453 y FUSE-454 a ROR1 fue tan débil que no se pudo calcular una KD confiable o estuvo por debajo del límite de cálculo (BLC, por sus siglas en inglés). Se estimó que la afinidad de FUSE-453 y FUSE-454 por ROR1 es >100 veces menor que FUSE-112 y FUSE-454,

respectivamente. Como tal, los residuos de cisteína dentro de CDR1 y CDR3 de VHH 2A11 y 5A1 son críticos para los parátopos específicos para ROR1.

Como se muestra en las Figuras 63A-6H, los gráficos x-y no lineales ilustran la liberación de IFNγ y la actividad citotóxica (es decir, la destrucción de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231) dependientes de ROR1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana inducidas por las proteínas de fusión FUSE-211 (formato 11A que incorpora 2A11, un VHH específico para ROR1), FUSE-394 (formato 13cA que incorpora 5A1, un VHH específico para ROR1), y FUSE-393 (formato 11A que incorpora 5A1, un VHH específico para ROR1). En las Figuras 63I y 63J, la liberación de IFNγ y la citotoxicidad del TCE antes mencionado se comparan con un TCE altamente potente, FUSE-277 (formato 12A que incorpora R11, un scFv específico para ROR1) y la relación de citotoxicidad a liberación de citocinas (IFNγ) medida como la "relación de desacoplamiento". Se examinó la capacidad de los TCE antes mencionados para inducir la destrucción de células diana $ROR1^+$, MDA-MB-231. Los resultados de tres donantes de PBMC ejemplares se muestran en las figuras 63A, 63B y 63C. La Figura 63D muestra la potencia de destrucción definida como la EC_{50} de muerte. Se examinó además la capacidad de varios TCE para inducir la liberación de IFNγ mediada por PBMC en presencia de células diana $ROR1^+$, MDA-MB-231. Los resultados de tres donantes de PBMC ejemplares se muestran en las figuras 63E, 63F y 63G. La Figura 63H muestra la potencia de liberación de citocina definida como el EC_{50} - IFNγ. Para ambas lecturas se usó como control de isotipo negativo un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL). Para medir la potencia citotóxica y la liberación de IFNγ, se cocultivaron durante 48 horas las PBMC humanas recién aisladas con células tumorales $ROR1^-$ MDA-MB-231 humanas diseñadas genéticamente para expresar de manera estable luciferasa de luciérnaga y GFP. Se recogió el sobrenadante y se midió IFNγ

mediante ELISA. La actividad luminiscente inducida por luciferasa de luciérnaga en presencia de su sustrato, D-Luciferina, se usó como medida de viabilidad celular ROR1^{+} MDA-MB-231. Se observó potencia citotóxica dependiente de ROR1 en el rango pM para FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 a través de tres conjuntos de PBMC aisladas de diferentes sujetos donantes de control sanos. FUSE-394 fue el más potente seguido de FUSE-393 y FUSE-211, los dos últimos de los cuales no fueron apreciablemente diferentes. También observamos la liberación de IFNγ dependiente de ROR1. De nuevo, FUSE-394 fue el más potente seguido de FUSE-393 y FUSE-211. Se calcularon los valores para la liberación de IFNγ para FUSE-211 a 100 nM basados en la curva. Para todos los TCE antes mencionados, la liberación de IFNγ fue más débil, tanto en EC50 como en liberación máxima, de lo que se esperaría de un TCE tradicional, tal como un activador de células T biespecífico (BiTE, por sus siglas en inglés) o una molécula de redireccionamiento de doble afinidad (DART, por sus siglas en inglés). Tanto los BITE como los DART contienen pequeños enlazadores entre su aglutinante CD3 y el aglutinante del antígeno diana. Como tal, la sinapsis o puente formado entre las células T y las células tumorales es generalmente corto, a menos que ocurra la circunstancia muy rara de que el antígeno objetivo sea muy grande y el epítopo esté muy distal a la membrana. Esto da como resultado una señal de activación más fuerte mediante el complejo TCR/CD3, que se ha planteado la hipótesis de que ocurre debido a que más moléculas de adhesión están comprometidas, y CD45, una fosfatasa inhibidora clave, queda excluida de la sinapsis célula T/tumor. En contraste, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 incorporan VHH específico para ROR1 que se une al dominio de Ig ROR1 distal de membrana y geometrías seleccionadas para una alta eficacia de destrucción (p. ej., destrucción máxima) pero una liberación de citocinas proinflamatorias reducida (IFNγ usada como ejemplo, ya que la neutralización temprana de IFNγ puede reducir los síntomas del CRS (véase, p. ej.,

www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8370401/)) para disminuir el riesgo de toxicidad. Es de destacar que la expresión de IFNγ después de la activación de células T se correlaciona con la de IL-2, TNFα e IL-6 es bien aceptada. El TNFα y la IL-6 también están estrechamente vinculados al CRS. La IL-2 también se ha relacionado con la toxicidad y podría tener implicaciones en la actividad Treg, que expresa constitutivamente el receptor de IL-2 de alta afinidad, CD25. Por lo tanto, se compara la liberación de IFNγ mediada por PBMC dependiente de ROR1 y la citotoxicidad de MDA-MB-231 asociada con FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 con un TCE que une a CD3 con el dominio Kringle próximo a la membrana de ROR1. Este último TCE, FUSE-277, se une a ROR1 mediante el clon específico de ROR1 bien descrito, R11. El gráfico x-y no lineal que ilustra la destrucción de MDA-MB-231 por el promedio de tres PBMC donantes se muestra en la Figura 63I. El gráfico x-y no lineal que ilustra la liberación de IFNγ mediada por PBMC dependiente de MDA-MB-231 ROR1 (media de tres donantes) se muestra en la Figura 63J. Para la citotoxicidad mediada por PBMC (Figura 63I), se observa que la potencia ($EC50_{DESTRUCCIÓN}$) de FUSE-277 fue aproximadamente 2 pM, o 40-50 veces mayor que FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Es importante destacar que la eficacia de destrucción de FUSE-277 fue solo entre 6-10 % mayor que la observada para FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394, lo que indica que este último TCE podría dosificarse con una eficacia casi equivalente. Además, la naturaleza extremadamente potente de FUSE-277 puede dificultar la identificación de una dosis suficientemente baja en la clínica para prevenir el síndrome de lisis tumoral cuando la carga tumoral es alta. En la liberación de IFNγ mediada por PBMC (Figura. 63J), se observa que la potencia ($EC50_{IFNγ}$) de FUSE-277 fue de aproximadamente 5 pM, en promedio aproximadamente 1000 veces mayor que FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Quizás más crítico es que la liberación máxima de IFNγ inducida por FUSE-277 fue en promedio aproximadamente 3 veces mayor

que la observada para FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Estos datos sugieren que se podrían dosificar FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 con una eficacia de destrucción similar a la de FUSE-277 con un riesgo reducido de CRS. Es interesante señalar que, si bien se observó que FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 alcanzaban una eficacia de destrucción máxima a aproximadamente 1 nM, los niveles de IFNγ aumentaron lentamente desde cerca del valor inicial a 1 nM hasta entre 2,5-5 ng/ml a 20 nM. Esta brecha representa un rango de aproximadamente 20.000 pM, o "ventana terapéutica in vitro", en la que la dosis de FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 se puede titular para lograr una dosis que incorpore tanto maximizar la destrucción como una dosis segura/efectiva de la citocina proinflamatoria, importante para inflamar el tumor y facilitar la destrucción de células espectadoras (ver la Figura 70). Por lo tanto, los datos sugieren que puede ser posible dosificar FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 para maximizar la eficacia pero titular la liberación de citocinas para lograr la inflamación del tumor con un riesgo reducido de CRS. En contraste, no se observó tal "ventana terapéutica in vitro" con FUSE-277. Para cuantificar aun más el grado en el que cada TCE desacopló la citotoxicidad de la liberación de citocinas (IFNγ), se midió la magnitud de la destrucción como el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) para la citotoxicidad de la Figura 63I y la magnitud de la liberación de IFNγ como el área bajo la curva (AUC) para IFNγ de la Figura 63J. A continuación se asignó a cada TCE una "relación de desacoplamiento", definida como la magnitud de la destrucción dividida por la magnitud de la liberación de IFNγ (normalizada para FUSE-277, para la cual no se observó una "ventana terapéutica in vitro") (Figura 63K). Las relaciones de desacoplamiento para FUSE-277, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 fueron 1 (sin desacoplamiento), 4,4, 5,4 y 4,3, respectivamente. Se deseaba confirmar que la citotoxicidad de células tumorales inducida por TCE y la liberación de IFNγ observada usando PBMC como efectores estaba mediada

por células T. Como tal, se realizó el mismo ensayo que se muestra en las Figuras 63I y 63J pero se sustituyeron las células Pan-T purificadas por PBMC. Las Figuras 63L y 63M son gráficos x-y no lineales de destrucción específica o liberación de IFNγ versus la concentración del artículo de prueba, respectivamente. Ambos ensayos se realizaron durante 24 horas y a diferencia de las PBMC que estaban recién aisladas, las células Pan-T se crioconservaron. En ambos casos, se comparó FUSE-394 con el TCE de control sin desacoplamiento, FUSE-277. Se usó el anti-HEL como control negativo, por lo que no se observó actividad específica. En la Figura 63O se muestra una síntesis de potencias (EC50) para la citotoxicidad dependiente de ROR1 y la liberación de IFNγ. De manera similar a lo observado con PBMC, FUSE-277 fue aproximadamente 15 veces más potente ($EC50_{DESTRUCCIÓN}$) que FUSE-394, pero ambos alcanzaron lecturas de eficacia similares (máxima destrucción) y la potencia de FUSE-394 se mantuvo en el rango bajo de tres dígitos pM (Figura 63L). Se considera que tal potencia es más propicia para el manejo del síndrome de lisis tumoral. En contraste con la citotoxicidad de las células tumorales dependiente de ROR1, se observó una potencia aproximadamente 200 veces menor relacionada con la liberación de IFNγ mediada por células T inducida por FUSE-394 en comparación con FUSE-277. Es importante destacar que la liberación máxima de IFNγ asociada con FUSE-394 se estabilizó en aproximadamente 30 % que la de FUSE-277 (Figura 63M) y la “ventana terapéutica in vitro” calculada para FUSE-394 fue de aproximadamente 20.000 pM. Esto dio como resultado una relación de desacoplamiento para FUSE-394 que fue entre 4-5 veces mayor que la de FUSE-277 (Figura 63N). Aunque la comparación se realizó entre PBMC y Pan-T, es interesante notar que reducir el período de tiempo del ensayo de 48 horas (PBMC) a 24 horas (células T) condujo a solo una caída de aproximadamente 25 % en la destrucción máxima, pero a una caída de 4-5 veces en la liberación máxima de IFNγ. Para obtener más información sobre la cinética

de la citotoxicidad y la liberación de citocinas inducidas por (a) un TCE sin desacoplamiento (FUSE-277) y (b) TCE ilustrativos que desacoplan la citotoxicidad de la liberación de citocinas (FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394), se realizaron ensayos de citotoxicidad dependiente de la diana (TDCC, por sus siglas en inglés) y ensayos de liberación de citocinas dependiente del objetivo (TDCR, por sus siglas en inglés) durante 24 horas, 48 horas y 72 horas. Se usó MDA-MB-231 como la célula tumoral que expresa ROR1, PBMC como células efectoras e IFNγ como la citocina proinflamatoria ilustrativa. Como se observa en las Figuras 63P, 63R y 63T, FUSE-277 fue aproximadamente 50-100 veces más potente (EC50 de destrucción) que FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394, pero la destrucción máxima (eficacia) inducida por los TCE desacoplados pudo alcanzar valores no apreciablemente diferentes de FUSE-277. La potencia de destrucción inducida por FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 estaba dentro de 2-3 veces entre sí. Como era de esperar, la destrucción máxima mediada por todos los artículos de prueba aumentó con el tiempo con valores de aproximadamente 70 %, 85 % y 95 % a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. A diferencia de la destrucción dependiente de ROR1, la liberación máxima de citocinas inducida por FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 fue consistentemente aproximadamente 3 veces menor que FUSE-277 en cada punto temporal (Figuras 63Q, 63S y 63U). La potencia (EC50-IFNγ) asociada con los tres TCE desacoplados fue hasta 10.000 veces más débil que FUSE-277, la “ventana terapéutica in vitro” varió de 10.000 a 20.000 pM y las relaciones de desacoplamiento (Figura 63V) variaron de valores de aproximadamente 4 (FUSE-211 y 394) a entre 4,5-5 (FUSE-393). Si bien no hubo una diferencia significativa en las relaciones de desacoplamiento en diferentes puntos de tiempo, se desarrolló una tendencia tal que la relación de desacoplamiento a las 24 horas (el punto de tiempo clave de seguridad) parecía ser la más alta. Como se observó con la citotoxicidad, la potencia asociada a la liberación de citocinas varió solo entre 2-3 veces entre

FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Lo más importante es que los valores absolutos de liberación máxima de IFNγ a las 24 horas para los tres TCE desacoplados no superaron los 1,5 ng/ml y pudieron ajustarse entre aproximadamente 200 pg/ml y 1,5 ng/ml manteniendo al mismo tiempo la máxima capacidad de destrucción. Matthys y colegas (véase www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8370401/) informaron que la neutralización temprana, pero no tardía, del lFNγ fue capaz de reducir los síntomas del CRS. De hecho, los niveles de rebote de IFNγ en puntos de tiempo posteriores que excedieron el tratamiento con solución salina no contribuyeron a tales síntomas. Esto sugiere que iniciar el tratamiento de un paciente con una dosis de FUSE-211, FUSE-393 o FUSE-394 que induce la máxima eliminación pero un IFNγ mínimo debería reducir el riesgo de CRS y la necesidad de intervenciones costosas como la neutralización de IFNγ, TNFα y/o IL-6, por lo tanto mejorando enormemente el cumplimiento del paciente. Es importante destacar que en momentos posteriores, la dosis de FUSE-211, FUSE-393 o FUSE-394 se puede aumentar de manera segura de tal manera que los niveles de IFNγ se acumulen hasta el punto en que se respalden los mecanismos secundarios de destrucción de células tumorales que involucran la inflamación del tumor y la destrucción de células espectadoras mediada por receptores de destrucción. Esto último se explora en la Figura 70.

Como se muestra en las Figuras 64A-64C, los gráficos x-y no lineales ilustran la inducción de actividad citotóxica independiente de ROR1 mediada por PBMC humana mediante FUSE-211 (formato 11A que incorpora el VHH específico para ROR1, 2A11), FUSE-394 (formato 13ca que incorpora el VHH específico para ROR1, 5A1) y FUSE-393 (formato 11A que incorpora el VHH específico para ROR1, 5A1) y FUSE-393 (formato 11A que incorpora el VHH específico para ROR1, 5A1). Se examinó la especificidad ROR1 de varios TCE con referencia a su inducción de destrucción de células diana que no expresan

ROR1, es decir, línea celular T47-D. Los resultados de tres donantes de PBMC ejemplares se muestran en los paneles A-C, respectivamente. Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. Para medir la potencia citotóxica no específica, se cocultivaron PBMC humanos recién aislados durante 48 horas con células tumorales humanas T-47D ROR1-negativas diseñadas genéticamente para expresar de manera estable la luciferasa de luciérnaga y GFP. La actividad luminiscente inducida por la luciferasa de luciérnaga en presencia de su sustrato, D-Luciferina, se usó como medida de la viabilidad diana $ROR1^{+}$. Observamos muy poca o ninguna citotoxicidad apreciable hacia las células diana T-47D. En la concentración más alta y suprafisiológica de 100 nM, se observó citotoxicidad no específica hacia <10 % de las células T-47D en los donantes 2 y 3, pero no en el donante 1. Además, tal destrucción no específica fue altamente variable entre los artículos de prueba, que incluye el control de isotipo anti-HEL, lo que fue indicativo de artefactos irrelevantes probablemente resultantes de la cadena principal de IgG1 o quizás de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células NK.

Como se muestra en las Figuras 65A-65E, y 65G-65K, se proporciona gráficos x-y no lineales de la actividad citotóxica dependiente de ROR1 mediada por PBMC humana (a) y (b) liberación de IFNγ, respectivamente, cuando se mezcla con una de una serie de células tumorales. Los TCE analizados fueron el TCE control sin desacoplamiento, FUSE-277, y los siguientes TCE que desacoplan la citotoxicidad de la liberación de citocinas: FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. De mayor a menor densidad de superficie celular de ROR1, las líneas celulares analizadas fueron NCCIT (Figuras 65A, 65G), MDA-MB-231 (Figuras 65B, 65H), NCI-H1975 (Figuras 65C, 65I), DU-145 (Figuras 65D, 65J) y T-47D ROR1-negativo (Figuras 65E y 65K). Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. Se observa la destrucción mediada por PBMC de todas las

líneas celulares ROR1$^+$ y muy poca o ninguna citotoxicidad no específica apreciable hacia las células diana ROR1-negativas, es decir, las células T-47D. Se observó que para cada TCE, la potencia de destrucción (EC_{50}de destrucción) se debilitaba a medida que la densidad de ROR1 en la superficie celular disminuía. Como se esperaba, la potencia de FUSE-277 varió entre 70-100 veces mayor que la de los 3 TCE desacoplados, que demostraron potencias de destrucción muy similares en toda la densidad de superficie de las células ROR1, por lo que la diferencia de pliegues entre dos cualesquiera fue inferior a 2 veces. Además, se observa que la destrucción máxima tuvo una tendencia positiva con la densidad de superficie celular de ROR1 en las células diana y, lo que es más importante, con la excepción de la destrucción de NCI-1975, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 alcanzaron valores de destrucción máxima que no fueron apreciablemente diferentes de FUSE-277. En la Figura 65F se muestra una tabla de síntesis de EC_{50} de destrucción para cada artículo de prueba. Como se observó previamente cuando se emplearon células tumorales MDA-MB-231 como objetivos ROR1+, se observó que en comparación con FUSE-277, para el que no se observó una "ventana terapéutica in vitro", los tres TCE desacoplados indujeron la liberación de citocinas mediada por PBMC que se asoció con (a) una potencia reducida de 1000 a >10.000 veces (EC_{50}-IFNγ), (b) valores máximos de IFNγ que fueron al menos 3 veces menores y (c) "ventanas terapéuticas in vitro" de aproximadamente 20.000 pM, (d) relaciones de desacoplamiento (Figura 65M) entre 4-5 (NCCIT, MDA-MB-231 y NCI-H1975) y 6-7 (DU-145), y (e) potencias y niveles máximos dentro de 2 veces entre sí en toda la matriz de líneas celulares. En la Figura 65L se muestra una tabla resumida de EC_{50}-IFNγ para cada artículo de prueba que incluye la falta de actividad no específica observada con T-47D (Figura 65K). Los valores de liberación de IFNγ para FUSE-211 a 100 nM se calcularon basados en la curva. Al igual que la citotoxicidad dependiente de ROR1, la liberación de citocinas

dependiente de ROR1 tendió positivamente con la densidad de superficie celular ROR1, que se midió entre 5000-7000 moléculas por célula en DU-145 (línea celular de cáncer de próstata). Este nivel es consistente con el que se cree que se expresa en la mayoría de los tejidos normales que expresan ROR1, que incluyen las células epiteliales intestinales y las células de los islotes pancreáticos (véase www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27852699/). Es importante destacar que, a diferencia de FUSE-277 que indujo una liberación apreciable de IFNγ mediada por PBMC, la inducida por los tres TCE desacoplados fue insignificante (≤250 pg/ml). Esto sugiere que FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 son capaces de ‘‘distinguir’’ entre niveles ‘‘normales’’ y malignos de ROR1 de tal manera que estos TCE no inducen una producción apreciable de citocina cuando la densidad de ROR1 alcanza niveles en o por debajo de aproximadamente 7000 moléculas de superficie celular por célula.

Como se muestra en las Figuras 66A-66E y 66G-66K, se proporcionan gráficos x-y no lineales de la actividad citotóxica dependiente de ROR1 (a) mediada por PBMC humanas inducida por TCE contingente a la dosis, y (b) la liberación de IFNγ, respectivamente, cuando se mezclan con una de una serie de células tumorales como se describe a continuación. Los TCE analizados fueron el TCE control sin desacoplamiento, FUSE-277, y los siguientes TCE que desacoplan la citotoxicidad de la liberación de citocinas: FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Las células diana consistieron en células MDA-MB-231 diseñadas para expresar de manera estable diferentes densidades de superficie celular de ROR1. Las densidades de superficie celular fueron las siguientes: ~2.000.000 de moléculas por célula (MDA++; Figuras 66A y 66G), ~500.000 moléculas por célula (MDA+; Figuras 66B y 66H), ~ 35.000 moléculas por célula (MDA; Figuras 66C y 66I), y 17.000 moléculas por célula (MDA-bajo; Figuras 66D y 66J). Además, un ROR1-eliminado, una línea celular MDA-MB-231 (MDA-KO; Figuras 66F y 66K) se generaron

usando CRISPR/Cas9, que sirvió como control y reflejó citotoxicidad no específica independiente de ROR1. Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. Para medir la potencia citotóxica y la liberación de IFNγ, las PBMC humanas recién aisladas se cocultivaron durante 48 horas con cada una de las variantes de densidad MDA-MB-231 ROR1. Se observa muy poca o ninguna liberación apreciable de IFNγ no específico a partir de PBMC ni citotoxicidad de las células diana eliminadas MDA-MB-231 ROR1. Se observó que para cada TCE, la potencia de destrucción (EC_{50} de destrucción) y la liberación de IFNγ (EC_{50}-IFNγ) se debilitaban a medida que la densidad de ROR1 en la superficie celular disminuía. Como se esperaba, la potencia de FUSE-277 varió entre 70-100 veces mayor que la de los 3 TCE desacoplados, que demostraron potencias de destrucción muy similares en toda la densidad de superficie de las células ROR1, por lo que la diferencia de pliegues entre dos cualesquiera fue inferior a 2 veces. Además, observamos que la destrucción máxima tuvo una tendencia positiva con la densidad de superficie celular de ROR1 en las células diana y, lo que es más importante, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 alcanzaron valores de destrucción máximos que no fueron apreciablemente diferentes de FUSE-277. En la Figura 66F se muestra una tabla de síntesis de EC_{50} de destrucción para cada artículo de prueba. No se observó "ventana terapéutica in vitro" con FUSE-277. En contraste, la "ventana terapéutica in vitro" observada para los tres TCE desacoplados fue de manera consistente de aproximadamente 20.000 pM. Además, las PBMC mediaron la liberación de citocinas inducida por FUSE-211. FUSE-393 y FUSE-393 se asociaron con (a) una potencia reducida de 1000 a >10.000 veces (EC_{50}-IFNγ), (b) valores máximos de IFNγ que fueron al menos 3 veces más bajos y (c) relaciones de desacoplamiento (Figura 66M) entre 4-5,5. De destacar, apareció una tendencia tal que las relaciones de desacoplamiento aumentaron

de valor a medida que disminuía la densidad de ROR1 en la superficie celular de las variantes MDA-MB-231. En la Figura 66L se muestra una tabla resumida de EC_{50}-IFNγ para cada artículo de prueba. Los valores de liberación de IFNγ para FUSE-211 a 100 nM se calcularon basados en la curva. Se calculó el área bajo la curva para la liberación de IFNγ denominada la magnitud de liberación de IFNγ y realizó un análisis de regresión de tal magnitud versus la densidad de superficie celular de ROR1 (Figura 66N). Cada punto en el análisis de regresión representa una variante diferente de MDA-MB-231 por lo que la densidad de ROR1 aumenta de izquierda a derecha. FUSE-277, el TCE de control sin desacoplamiento, se asoció con una pendiente apreciablemente más pronunciada que FUSE-394, el TCE sin desacoplamiento ilustrativo mostrado. Se asociaron FUSE-211 y FUSE-393 con resultados similares (datos no mostrados). Es importante destacar que se observó que FUSE-277, pero no FUSE-394, estaba asociado con la liberación de IFNγ en densidades de ROR1 inferiores a 10.000 moléculas de superficie celular, lo que se analizó anteriormente como la probable demarcación entre la expresión de ROR1 en la mayoría de las células normales frente a las malignas. Tomado junto con los datos de la Figura 66F.

Como se muestra en las Figuras 67A-67C, se examina la capacidad de los TCE anti-ROR1 para inducir la activación de células T cuando se ligan a ROR1 en células diana (MDA-MB-231). Se muestran TCE ilustrativos que desacoplan la citotoxicidad de la liberación de citocinas, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394, en relación con el TCE de control sin desacoplamiento, FUSE-399 (formato 1A que incorpora el scFV R11 específico para el dominio Kringle ROR1). Las PBMC se mezclaron con MDA-MB-231 durante 24 horas después de lo cual se utilizó citometría de flujo para evaluar los marcadores de activación temprana y tardía, CD69 (Figura 67A) y CD25 (Figura 67B), respectivamente, en células T CD3+ encerrada. La intensidad de fluorescencia media (MFI, por sus siglas en inglés) para cada uno de CD69 y

CD25 se muestra en el eje y de cada gráfico. Cada eje x es representativo de una titulación del artículo de prueba que va de 5 pM a 100 nM. Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo (círculos cerrados llenos). Se observó inducción dependiente de ROR1 de la expresión de CD69 y CD25. Para ambos marcadores de activación, la potencia con la que se indujo la expresión (EC50-CD69 y EC50-CD25) por FUSE-399 (triángulos rellenos) fue entre 200-600 veces mayor que la de FUSE-211 (triángulos rellenos invertidos), FUSE-394 (círculos abiertos) o FUSE-393 (rombos rellenos). En todos los casos, la diferencia en EC50-CD69 y EC50-CD25 entre cada uno de los tres TCE desacoplados no fue mayor de 2 veces y promedió aproximadamente 10 nM. No se observó activación no específica con el control negativo anti-HEL. En la Figura 67C se muestra una tabla resumida de potencias para la inducción de CD69 y CD25 por cada TCE. Previamente se observó una potencia promedio de citotoxicidad dependiente de ROR1 (EC50- de destrucción) de entre 75-150 pM para FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Por lo tanto, estos datos sugieren que, de manera similar a la liberación de citocinas, estos tres TCE también pueden desacoplar la citotoxicidad de la inducción de marcadores de activación temprana y tardía. Para abordar esta posibilidad, se usaron FUSE-394 como el TCE ilustrativo que desacopla la citotoxicidad de la liberación de citocinas para calcular el área bajo la curva (AUC) para la inducción de CD69 (Figura 67A) y la inducción de CD25 (Figura 67B) y se usaron estos valores para calcular el divisor de AUC-destrucción dividido por AUC-69 (relación de desacoplamiento de citotoxicidad/CD69; Figura 67D) o la destrucción de AUC dividida por AUC-CD25 (relación de desacoplamiento de citotoxicidad/CD25; Figura 67F), normalizado para FUSE-399 (establecido en un valor de 1). Se calculó que FUSE-394 desacopló la citotoxicidad de la inducción de CD69 y CD25 en los órdenes de 2 veces y 2,4 veces, respectivamente. Dado que tanto CD25 como IFNγ alcanzan la expresión máxima entre 24-48

horas después de la activación de las células T, el desacoplamiento de la citotoxicidad de la inducción de CD25 no fue sorprendente. Sin embargo, CD69, en parte debido a que la proteína se preforma en las células T, se expresa rápidamente en la superficie de las células T activadas, de tal manera que puede observarse en menos de 4 horas y alcanza su pico aproximadamente 24 horas después de la estimulación con TCR/CD3. Por lo tanto, fue sorprendente que en relación con FUSE-399, FUSE-394 desacopló la citotoxicidad de CD69. Dado que la expresión de CD69 se ha vinculado a un fenotipo similar al agotamiento de las células T infiltrantes de tumores y una actividad antitumoral reducida (véase www.academic.oup.com/intimm/article/30/12/559/5067178), nuestros datos sugieren que FUSE-394 (así como FUSE-393 y FUSE-211) pueden estar asociados a un riesgo reducido de inducir agotamiento de células T y una actividad antitumoral más mejorada en comparación con los TCE no disociados, tal como FUSE-399 (y FUSE-277). Hasta donde sabemos, somos los primeros en observar un desacoplamiento de la citotoxicidad de la inducción de la expresión de CD69, lo que sugiere que la liberación de perforina y proteasas citotóxicas, que incluye la granzima B, puede no estar siempre asociada con la expresión de CD69. Dado que la relación para desacoplar la citotoxicidad de la inducción de CD69 y CD25 se midió entre 2-2,4 para FUSE-394, esto es aproximadamente 2 veces menor que su capacidad para desacoplar la citotoxicidad de la liberación de citocinas (IFNγ) (la relación promedio para FUSE-394 fue de aproximadamente 4; ver más arriba), sin querer limitarse por cualquier teoría particular, creemos que FUSE-394 (así como FUSE-393 y FUSE-211) probablemente desacoplen la inducción de la expresión de CD69 y CD25 de la liberación de citocina (IFNγ). Esto sería especialmente interesante para CD25 ya que, como se indicó anteriormente, la cinética de la expresión de CD25 e IFNγ después de la activación de linfocitos T es muy similar. Como se muestra en la Figura 67E y la Figura 67G, en comparación con FUSE-399, FUSE-394

desacopló la inducción de la expresión de CD69 y CD25 de la liberación de citocina (IFNγ) en 2 veces y 1,8 veces, respectivamente. En general, los datos indican que la citotoxicidad asociada con FUSE-394 está disociada tanto de la liberación de citocinas como de la inducción de marcadores de activación, pero que esta última es intermedia en comparación con la primera, de tal manera que la inducción de marcadores de activación está aún más disociada de la liberación de citocinas. FUSE-211 y FUSE-394 no fueron apreciablemente diferentes mientras que FUSE-393 fue aproximadamente 2 veces menos potente. No se observó activación inespecífica con el anticuerpo anti-HEL.

Como se muestra en las Figuras 68A-68C, se examina la dosis única PK en ratones C57BL/6 silvestres de dos TCE, FUSE-211 (formato 11A que incorpora el VHH específico para ROR1, 2A11) y FUSE-394 (formato 13cA que incorpora el VHH específico para ROR1, 5A1). Se usó una versión recombinante del anticuerpo monoclonal específico de ROR1 en etapa clínica, cirmzuzimab (también denominado FUSE-366), generado a partir de la secuencia publicada, como control de anticuerpo IgG que se describió por tener una farmacocinética consistente con un anticuerpo silvestre. Las Figuras 68A y 68B son gráficos x-y de la concentración del artículo de prueba identificado en suero de ratón (FUSE-211, FUSE-394, o FUSE-366) sobre el eje y versus el tiempo en el eje x. En cada caso, los ratones recibieron una dosis única de un artículo de prueba a 5 mg/kg (Figura 68A) o 0,5 mg/kg (Figura 68B). Cirmzuzimab (también denotado como FUSE-366) solo se incluyó en la cohorte de 5 mg/kg. En todos los casos, a los ratones se les inyectó por IV uno de los 3 artículos de prueba en el tiempo cero y se recogió suero en los diversos puntos temporales (en horas): 0, 1, 6, 24, 48, 72, 168, y 240. Se tomaron muestras de tres ratones en cada punto de tiempo. Después de la recolección de suero, se cuantificó la concentración de cada artículo de prueba usando un ELISA específico para el dominio Fc de IgG humana. No se observó ninguna diferencia apreciable en la PK de

FUSE-211 versus FUSE-366, y ambos exhibieron una distribución alfa y fases de eliminación beta muy similares. Es importante destacar que, aunque la pendiente de la fase de eliminación beta tardía (>150 horas) a 5 mg/kg para el anticuerpo de control, FUSE-366, fue más suave que la de FUSE-211 y FUSE-394 (Figura 68A), la PK de ambos TCE no fue apreciablemente diferente del anticuerpo de control entre 0-150 horas. Esto indica que tanto FUSE-211 como FUSE-394 tienen propiedades PK similares a un anticuerpo monoclonal estándar.

Como se muestra en las Figuras 69A-69E, se examina la capacidad de FUSE-394 y el TCE de control sin desacoplamiento, FUSE399, para mediar la inhibición del crecimiento tumoral en dos modelos de xenoinjerto de ratón humanizado. En ambos casos, se usó el teratoma ROR1^{+} humano altamente agresivo, NCCIT, y se inyectó por vía subcutánea. En el primer modelo, a los ratones NSG se les inyectó una mezcla de NCCIT y células T expandidas de tal manera que la relación de tumor a células T CD8+ constituía 1:4. En un intento de imitar el fenotipo de TIL humano que reflejaría la ‘‘condición humana’’ y no necesariamente se esperaría que controlara completamente el crecimiento del tumor en ausencia de células T circulantes, las células T se expandieron durante 12 días y se recuperaron durante 3 días adicionales en IL-2 para imitar un fenotipo agotado de progenitor, que no se esperaría que fuera completamente funcional ni proliferara in vivo en una masa tumoral hipóxica. Como tales, estas células T no presentaron alorreactividad hacia NCCIT in vitro. Se inició un régimen de tratamiento de cuatro inyecciones intravenosas (IV) el Día 1 y después de eso se monitoreó a los ratones para detectar cualquier crecimiento tumoral ‘‘revolucionario’’. Debido a la preocupación de que matrigel pueda ser tóxico para los TIL, el primero se omitió de este estudio, lo que hace que los tumores sean más difíciles de medir, especialmente en los grupos tratados en los que el crecimiento de los tumores, si estaba presente, era de naturaleza plana y, por lo tanto, subjetivo. El Día 21, se observó lo que parecía

ser una posible formación de tumores en 2 ratones que recibieron la dosis baja de FUSE-394 (0,15 mg/kg), 2 ratones que recibieron la dosis más alta de FUSE-394 (1,5 mg/kg), 1 ratón que recibió la dosis baja de FUSE-399 (0,15 mg/kg) y 1 ratón que recibió la dosis más alta de FUSE-399 (1,5 mg/kg). Se interpretó este hallazgo como posibles tumores ‘‘revolucionarios’’ y, por lo tanto, se inyectó a todos los ratones 3,5 millones de células T expandidas y se inició una segunda ronda de tratamiento (4 inyecciones intravenosas) el Día 24. Tal régimen de dosificación se parecía a la naturaleza de “varias semanas después, varias semanas libres” de la dosificación de TCE que a menudo se usa en la clínica. En este punto, las células T circulantes podrían ser reclutadas en cualquier tumor que evadiera TIL. Para el Día 28, con la excepción de un ratón del grupo que recibió la dosis baja de FUSE-394, todos los tumores se redujeron a menos de 10 mm cúbicos. Después de eso, con la excepción del mismo ratón del grupo que recibió la dosis baja de FUSE-394 y un ratón que recibió la dosis baja de FUSE-399, no se vieron tumores en ninguno de los grupos de tratamiento. En contraste, los tumores crecieron en ratones que fueron tratados con PBS, todos los cuales fueron visiblemente elevados. En el segundo modelo, investigamos la capacidad de FUSE-394 para controlar el crecimiento tumoral de tumores NCCIT establecidos que crecen rápidamente. En este caso, a ratones NSG en los que se habían eliminado tanto MHC-I como MHC-II (NSG-MHC-I/II dKO; n=25) se les implantaron por vía subcutánea 5 millones de células $ROR1^+$ NCCIT. Cuando el volumen tumoral alcanzó ~100 mm^3, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 30 millones de PBMC recién aisladas de un donante humano sano. La frecuencia de linfocitos T dentro de las PBMC fue de ~ 50 %, de los cuales un 60 % más fueron células T CD4+ y ~ 3 % fueron células T reguladoras. Las células T no se expandieron ni se reconstituyeron en nuestras manos. Esto se debe a que no existen xenoantígenos importantes presentes en estos ratones. Como tal, la reconstitución de PBMC en NSG-MHC-I/II dKO depende en gran medida

de los donantes y, a menudo, no tiene éxito. Como tal, este sistema refleja mejor la capacidad de las células T circulantes sin tratamiento previo de infiltrarse en un tumor altamente agresivo no inmunogénico carente de TIL (“tumor del desierto”) en el que el único agente que induce reactividad tumoral es el TCE. Una vez que el volumen tumoral alcanzó ~100 mm^3, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos; dos grupos de diez que recibirían inyecciones de bolo IV de FUSE-394 a 5 mg/kg o 0,5 mg/kg. Se designó un tercer grupo de 5 ratones para recibir el tratamiento de control, cirmtuzumab, un anticuerpo dirigido a ROR1 que bloquea la señalización Wnt5-alfa pero que tiene poco o ningún efecto en modelos tumorales de xenoinjerto de ratón. Esto permitió un estudio adicional del impacto de la unión CD3/ROR1 con FUSE-394 versus la unión de ROR1 solo con un anticuerpo en etapa clínica bien caracterizado. Los ratones recibieron tratamiento (inyección en bolo IV repetida de un artículo de prueba a dosis de 5 mg/kg o 0,5 mg/kg) los Días 0, 2 y 7. La Figura 69D es un gráfico x-y del volumen tumoral (eje y) versus al tiempo en días (eje x). La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) mediada por FUSE-394 se observó tan pronto como 6 días después del tratamiento y alcanzó una magnitud de >45 % versus cirmtuzumab después de diez días (Figura 69E). No se observó diferencia apreciable entre 0,5 mg/kg y 5 mg/kg al día 10.

Como se muestra en las Figuras 70A-70D, se investigó la cinética mediante la cual FUSE-394 (formato 13cA que incorpora el VHH específico de ROR1, 5A1) induce la destrucción mediada por células T (células T derivadas de PBMC expandidas durante 10 días) de células tumorales MDA-MB-231 positivas para ROR1 (Figura 70A), células tumorales T-47D negativas para ROR1 (Figura 70B) o la mezcla de células tumorales MDA-MB-231 positivas para ROR1 y T-47D negativas para ROR1 (Figuras 70C y 70D). Se muestran gráficos x-y no lineales de la viabilidad del tumor en el eje y y del tiempo en el eje x. Para distinguir entre las células tumorales MDA-MB-231 positivas para ROR1 y las células tumorales T-47D ROR1-negativas, las primeras

se diseñaron para expresar RFP y las segundas para expresar GFP. Como se observa en la Figura 70A, en presencia de 800 pM FUSE-394 pero no del control negativo anti-HEL, las células T mataron entre el ~85 % de MDA-MB-231 ROR1-positivo con una $IC50_{VIABILITY}$ de 14,4 horas. Se realizó una titulación completa de TCE de 100 nM a 1,28 pM. Se observó una destrucción máxima similar en concentraciones de FUSE-394 entre 800 pM y 100 nM (datos no mostrados). A 160 pM, 32 pM, 6,4 pM y 1,28 pM de FUSE-395, la destrucción máxima se redujo a ~58 %, 47 %, 25 % y 16 %, respectivamente (datos no mostrados). Cuando las células tumorales T47-D negativas para ROR1 se cocultivaron con células T, FUSE-394 o anti-HEL, no se observó ninguna pérdida apreciable en la viabilidad de las células tumorales a 800 pM del artículo de prueba (Figura 70B) ni ninguna concentración entre 1,28 pM y 100 nM (datos no mostrados). Esto indica que FUSE-394 es específico para ROR1 y, en ausencia de células ROR1 positivas, las células T no median la destrucción de T47-D. Es importante destacar que, específicamente para FUSE-394 y no anti-HEL, cuando se usaron células T como efectores en un cocultivo con una mezcla de células tumorales MDA-MB-231 ROR1-positivas y T-47D ROR1-negativas, observamos la destrucción de ambos tipos de células tumorales. La $IC50_{VIABILITY}$ para MDA-MB-231 ROR1-positiva fue de 14,3 horas y para las células tumorales T-47D ROR1-negativas fue de 32,6 horas, lo que equivale a un retraso de 18,3 horas entre las células tumorales ROR1-positivas y ROR1-negativas. Este momento es consistente con el fenómeno referido a la destrucción directa (temprana) y de células espectadoras (tardía) mediante el cual MDA-MB-231 se mata principalmente mediante perforina/granzima B y T-47D se mata mediante varias vías mediadas por receptores de destrucción. Estos incluyen Fas que son regulados positivamente por IFNγ, lo que influye no solo en la expresión de receptores de destrucción (p. ej., TRAIL-R, TNFR, FAS) sino también en moléculas de adhesión como ICAM-1 que ayudan a fortalecer las uniones sinápticas entre células T y tumores. Los contrarreceptores (p. ej., FasL, TRAIL, TNFα,

LFA-1) son inducidos por la activación de las células T, en este caso mediada por la reticulación del complejo TCR/CD3 por el puente formado por FUSE-394 entre ROR1 y CD3ε. La destrucción de células espectadoras de TCE se describió previamente para BiTE específicos de EGFR (véase www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28837681/), que se observó que inducía la liberación y la destrucción de citocinas de manera acoplada. Los datos sugieren que la cantidad de IFNγ inducida por FUSE-394, aunque más segura que la asociada a los TCE no disociados, todavía es suficiente para mediar una eficacia de destrucción similar en tumores que expresan niveles heterogéneos de ROR1. De hecho, como se observa en la Figura 70D, no observamos ninguna diferencia apreciable en la máxima destrucción de células espectadoras (eficacia de destrucción) inducida por FUSE-394 y FUSE-399, este último es un TCE sin desacoplamiento en formato 1A que incorpora un scFV R11 específico para el dominio Kringle próximo a la membrana. Como se muestra en la Figura 70E, después de un cocultivo de 24 horas de células T y MDA-MB-231, la potencia y la liberación máxima de IFNγ inducidas por FUSE-394 son 100-300 veces menores y menos del 50 % que las de FUSE-399. Es importante destacar que a 800 pM del artículo de prueba, mientras que FUSE-399 estaba dentro del 10 % de su liberación máxima de citocina (~$EC90_{IFN\gamma}$), FUSE-394 había alcanzado sólo aproximadamente su $EC30_{IFN\gamma}$. Esto proporciona más respaldo a nuestra opinión de que, en comparación con un TCE sin desacoplamiento estándar, el tamaño de la ventana para ajustar de manera segura la producción de citocinas para maximizar tanto la eficacia como la seguridad sería mucho mayor con FUSE-394.

Como se muestra en las Figuras 71A y 71B, se evaluó la capacidad de los TCE ilustrativos para inducir la destrucción mediada por células T de un número constante de células tumorales ROR1+ (MDA-MB-231) en un rango de números de células T. Esto permite calcular (a) la cantidad de células T que necesitan diferentes TCE para matar un porcentaje determinado de células tumorales ROR1+ (Figura 71A) y (b) la cantidad promedio de células tumorales

eliminadas por célula T, también denominada “destrucción en serie” (Figura 71B). Para generar los datos, se mezclaron diferentes números de células T CD8+ activadas que van de 300 a 40.000 células con 5000 células tumorales MDA-MB-231 (ROR1+). La viabilidad de las células tumorales se midió después de 24 horas. El rango de números de células T CD8+ añadidas al ensayo se equiparó a relaciones efectora a diana de 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1. Se usó FUSE-399 (formato 1A que incorpora scFV R11 específico para el dominio Kringle de ROR1) como TCE de control sin desacoplamiento específico para ROR1, y se comparó con FUSE-211 (formato 11A que incorpora 2A11, VHH específico del dominio ROR1-Ig), FUSE-393 (formato 11A que incorpora 5A1, un VHH específico del dominio ROR1-Ig) y FUSE-394 (formato 13cA que incorpora 5A1, un VHH específico del dominio ROR1-Ig). En relaciones E:T de 1:2 a 8:1 (Figura 71A, segmento derecho del eje x dividido), no se observa diferencias apreciables en la destrucción de células tumorales entre ninguno de los artículos de prueba, lo que indica que en relaciones E:T consistentes con tumores hematológicos, los TCE desacoplados (FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394) no fueron superados en términos de eficacia de destrucción (destrucción máxima) por FUSE-399. Se observó que con cantidades menores de células T correspondientes a entre 300 y 1250 células T (E:T de 1:16, 1:8 y 1:4), los TCE desacoplados inducían una mayor destrucción de células tumorales dependiente de ROR1 mediada por células T que FUSE-399, tanto en términos de potencia como de eficacia. Se asociaron FUSE-393 y FUSE-211 con curvas de destrucción casi idénticas con una destrucción máxima aproximadamente 0,3 veces más débil que FUSE-394. En comparación con FUSE-399, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 fueron entre 2,5-3 veces más potentes y 2-2,5 veces más eficaces. Por ejemplo, para matar aproximadamente el 25 % de las células tumorales, FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394 requirieron aproximadamente 450, 450 y 300 células T, respectivamente, mientras que FUSE-399 requirió aproximadamente 1100 células T. Con relaciones E:T muy

bajas (p, ej., 1:16 y 1:8), cada célula T (en promedio) probablemente mató a más de una célula tumoral. Por ejemplo, a una E:T de 1:16 (312 células T añadidas al ensayo), FUSE-394 se asoció con 28-29 % de destrucción, lo que equivale a aproximadamente 1450 células tumorales. Como tal, en promedio cada una de las 312 células T mató alrededor de 4 células tumorales. El fenómeno en el que una sola célula T mata a más de una célula tumoral se denomina destrucción en serie y es especialmente importante en tumores sólidos donde el número de células T puede ser escaso, con relaciones E:T que varían de 1:2 a <1:8. La Figura 71B es un gráfico de barras que ilustra la destrucción en serie para cada TCE, que se calcula como el número medio de células tumorales muertas por célula T a una E:T de 1:16 y 1:8. En alineación con la citotoxicidad global observada en la Figura 71A, se observó que FUSE-394 soporta el mayor grado de destrucción en serie con aproximadamente 4,1 células tumorales/célula T. FUSE-211 y FUSE-393 apoyaron una destrucción en serie ligeramente menor entre 3-3,2 células tumorales/célula T. Es importante destacar que el control TCE sin desacoplamiento, FUSE-399, solo permitió la eliminación en serie en el orden de aproximadamente 1,4 células tumorales/célula T. El mecanismo de acción de la diferencia observada probablemente surge de múltiples factores que conducen a un mayor tiempo de residencia de las células T/tumor y/o a una ‘‘sobreactivación’’ de las células T con FUSE-399 en comparación con FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394. Por ejemplo, la sinapsis más corta entre células T y tumores mediada por FUSE-399 versus FUSE-211, FUSE-393 y FUSE-394, (a) dará como resultado una señal de activación más fuerte que podría resultar en una mayor liberación y, por lo tanto, una menor disponibilidad de granzima B y perforina para múltiples destrucciones y (b) probablemente conducirá a un puente más estrecho entre las células T y el tumor debido a la unión de un mayor número y mayor afinidad de las moléculas de adhesión. Todos los datos reportados se derivan del promedio de dos células T donantes. Se deseaba confirmar que la citotoxicidad de células tumorales inducida por

TCE y la liberación de IFNγobservada usando PBMC como efectores estaba mediada por células T. Como tal, se realizó el mismo ensayo que se muestra en las Figuras 63I y 63J pero se sustituyeron las células Pan-T purificadas por PBMC.

Ejemplo 47

Técnicas y Procedimientos

Las siguientes técnicas y procedimientos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente para fines ilustrativos y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos usando medio Ficoll-Paque Plus. En breve, 35 ml de sangre completa diluida (1 volumen de sangre completa vs. 1 volumen de PBS) se superpuso suavemente sobre 15 ml de medio Ficoll-Paque Plus sin alterar la interfaz en un tubo cónico de 50 ml. Después de centrifugar durante 40 minutos a 400 × g a temperatura ambiente sin freno, se recolectó la capa regulada (capa de interfaz entre Ficoll y suero) y se diluyó en 5 volúmenes de PBS. Después de centrifugar durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente, las PBMC se resuspendieron en PBS y se lavaron una vez en PBS centrifugando durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente. A continuación, las PBMC se resuspendieron en 5 ml de regulador de lisis ACK y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos de glóbulos rojos. Después de 5 minutos de incubación, se añadieron 45 ml de PBS a las PBMC y se centrifugaron durante 15 minutos a 100 × g a temperatura ambiente. Por último, las PBMC se resuspendieron en medio de cultivo

(RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina) para la citotoxicidad y la configuración del ensayo de liberación de IFN gamma.

Aislamiento, activación y recuperación de células T humanas

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las células T se aislaron de PBMC humanas frescas usando el kit de aislamiento de células T humanas EASAYSEP de STEMCELL. En breve, las PBMC se mezclaron con cóctel de anticuerpos de aislamiento (proporcionado con el kit) en PBS libre de Ca^{2+}- y Mg^{2+} que contenía 2 % de FBS y 1 mM de EDTA. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la perla RapidSpheres™ (provista con el kit) a la mezcla y después se ensambló inmediatamente en el imán EASY50 EASY SEP de Stemcell. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células en solución de mezcla se recogieron y se ensamblaron nuevamente en el imán EASY50 EASY SEP de Stemcell. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se recogieron células T purificadas en solución de mezcla y se granularon por centrifugación. Las células T purificadas se congelaron y se conservaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Para activar las células T purificadas, las células T aisladas se resuspendieron en el medio de expansión de células T ImmunoCult™-XF de Stemcell. Se añadieron el activador de células T humanas CD3/CD28 ImmunoCult™ de Stemcell y 100 U/ml de IL-2 humana de R&D System a las células T para activarlas durante 12 días. Durante los 12 días de activación, se añadió a las células medio de expansión de células T ImmunoCult™-XF fresco con 100 U/ml de IL-2 humana, siempre que la densidad celular fuera superior a 1 millón de células por mililitro. Al final de la activación de 12 días, las células T activadas se congelaron y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

Para recuperar las células T, las células T activadas congeladas o las células T sin activación se recuperaron del nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua a 37 C. Las células T recuperadas se resuspendieron en medio RMPI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor con 250 U/ml de IL-2 humana. Después de 48 horas de incubación a 37 °C, las células T estaban listas para su uso posterior.

Aislamiento, activación y recuperación de células T CD8+ humanas

Las PBMC se aislaron de sangre completa de donantes sanos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Las células T CD8+ se aislaron de PBMC humanas frescas usando el kit de aislamiento de células T CD8+ humanas EASAYSEP de STEMCELL. En breve, las PBMC se mezclaron con cóctel de anticuerpos de aislamiento (proporcionado con el kit) en PBS libre de Ca^{2+}- y Mg^{2+} que contenía 2 % de FBS y 1 mM de EDTA. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió la perla RapidSpheres™ (provista con el kit) a la mezcla y después se ensambló inmediatamente en el imán EASY50 EASY SEP de Stemcell. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células en solución de mezcla se recogieron y se ensamblaron nuevamente en el imán EASY50 EASY SEP de Stemcell. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se recogieron células T CD8+ purificadas en solución de mezcla y se granularon por centrifugación. Las células T CD8+ purificadas se congelaron y se conservaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

Para activar las células T CD8+, las células T CD8+ humanas purificadas se resuspendieron en medio de expansión de células T ImmunoCult™-XF de Stemcell. Se añadieron el activador de células T humanas CD3/CD28 ImmunoCult™ de Stemcell y 100 U/ml de IL-2 humana de R&D System a las células T para activarlas durante 12 días. Durante los 12 días de activación, se añadió a las células medio de expansión de células T

ImmunoCult™-XF fresco con 100 U/ml de IL-2 humana, siempre que la densidad celular fuera superior a 1 millón de células por mililitro. Al final de la activación de 12 días, las células T activadas se congelaron y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

Para recuperar las células T CD8+, se recuperaron las células T CD8+ activadas o las células T CD8+ del nitrógeno líquido y se descongelaron en un baño de agua a 37 °C. Las células T CD8+ se resuspendieron en medio RMPI1640 con 10 % de FBS inactivado por calor con 250 U/ml de IL-2 humana. Después de 48 horas de incubación a 37° C, las células T estaban listas para su uso posterior.

Ensayo de citotoxicidad

El día anterior a la preparación del ensayo, se eliminaron los antibióticos selectivos de las líneas de células diana. El día de la preparación del ensayo, las líneas de células diana se recolectaron mediante un breve tratamiento con TrypLE y después se lavaron con medio de cultivo mediante centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las líneas celulares diana se resuspendieron en medio de cultivo para determinar la viabilidad celular mediante exclusión azul tripano en Cellometer. La densidad celular viable se ajustó a 50.000 células/ml en medios de cultivo. Se dispensó cuidadosamente 100 ul de suspensión celular diana (5000 células diana) a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillo usando una pipeta multicanal. Después se incubó la placa durante 4-5 horas en incubadora de cultivo tisular para asegurar que las células diana se hayan adherido al fondo de la placa de 96 pocillos.

Las PBMC frescas o las células T recuperadas se centrifugaron durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente para formar un pellet y se resuspendieron en medio de cultivo. También se determinó la viabilidad de las células vía exclusión azul tripano. La densidad de PBMC viable se ajustó a 3 millones de células/ml en medio

RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina mientras que la densidad de linfocitos T viables se ajustó a 0,5 millones de células/ml en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Después de 4-5 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente de las placas de 96 pocillos con células diana. Se añadieron 50 ul de una suspensión de PBMC de 3 millones de células/ml (150.000 PBMC) o 50 ul de una suspensión de PBMC de 0,5 millones de células/ml (25.000 células T) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con célula diana, lo que daría como resultado una relación E:T de 30:1 para PBMC y 5:1 para células T.

Los reclutadores de células T (TCE) CD3xROR1 se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 nM y 2,56 pM. Después se añadieron 50 ul de TCE CD3xROR1 preparados en diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con PBMC y células diana y se incubaron durante uno, dos o tres días a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 ×g para transferir 50 µl de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para el ensayo de liberación de IFN gamma. La solución de ensayo de luciferasa de ONE-Glo se llevó a temperatura ambiente. Después se añadieron 50 ul de solución One-Glo al pocillo designado y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se midió la bioluminiscencia en un lector de placas con protocolo de bioluminancia preestablecido. El porcentaje de destrucción se calculó usando la fórmula: porcentaje de destrucción = 100* (intensidad de bioluminiscencia de la célula diana sola - intensidad de bioluminiscencia de la muestra)/(intensidad de bioluminiscencia de la célula diana sola - intensidad de bioluminiscencia de PBMC sola).

Detección de liberación gamma IFN

La liberación gamma de IFN a partir del ensayo de citotoxicidad se midió usando el kit de detección ELISA de IFN gamma humano. En breve, el anticuerpo de recubrimiento proporcionado en el kit se diluyó a la concentración sugerida siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante del kit. Se añadieron 100 ul de anticuerpo de recubrimiento diluido a la placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp, se selló la placa y se incubó a 4 °C durante la noche. Después, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado. Para bloquear la unión no específica y reducir el fondo, se añadieron 200 µl de diluyente de ensayo A y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 en un agitador de placas (400 rpm). Después de bloquear, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de patrones (preparados con medio de cultivo) o muestras a los pocillos apropiados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas (400 rpm). Después de la incubación de 2 horas con muestras o patrones, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de anticuerpo de detección para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador de placas (400 rpm). Después del período de incubación de 1 hora con anticuerpo de detección, las placas se lavaron 4 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución diluida de avidina-HRP para incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas (400 rpm). Después de 30 minutos de incubación con avidina-HRP, las placas se lavaron 5 veces con regulador de lavado y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB recién mezclada para incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. Después se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo para detener la reacción. La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de placas y la concentración de IFN gamma en cada muestra se volvió a calcular usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferentes concentraciones de patrones.

Cálculo de la relación de desacoplamiento

La citotoxicidad y la liberación de IFN gamma se trazaron frente a la concentración de artículos de prueba en GraphPad Prism. Se calculó el área bajo la curva (AUC) para la citotoxicidad y la liberación gamma de IFN usando el algoritmo AUC en Prism. La relación de desacoplamiento se generó dividiendo el AUC de citotoxicidad con el AUC de liberación gamma de IFN para el mismo artículo de prueba. Todas las relaciones de desacoplamiento se normalizaron a cierto artículo de prueba sin desacoplamiento para comparar la variación entre diferentes experimentos.

Ensayo de unión por citometría de flujo

Las células diana adherentes se recogieron mediante un breve tratamiento TryPle mientras que las células en suspensión se recogieron directamente. Las células recogidas se lavaron una vez con PBS por centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a la placa de 96 pocillos de fondo V (200.000 — 300.000 células por pocillo). Para preparar el rojo fijable Live/Dead, se disolvió un vial de polvo en 50 ul de DMSO para hacer una solución madre y después se diluyó 1 ul de rojo fijable Live/Dead en 1 ml de PBS para preparar la solución de trabajo. A continuación, se añadieron 100 ul de regulador de trabajo rojo fijable Live/Dead a la célula en la placa de 96 pocillos con fondo en V (200.000 – 300.000 células por pocillo) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se cultivaron con anticuerpos a diferentes concentraciones en 100 ul de regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación,

las células se cultivaron con anticuerpo secundario IgG humano conjugado con PE-Cy7 en regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo secundario, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 ul de regulador de fijación BioLegend. A continuación se analizaron las muestras en citómetro de flujo Cytek. Los datos se analizaron con FlowJo y se siguió la estrategia de regulación: En breve, la población celular diana fue cerrada por FSC y SSC. Se seleccionaron células individuales de la población de células diana por FSC-A y FSA-H. Las células individuales vivas se separaron de las células individuales mediante un tinte rojo live/dead bajo. La unión a la diana se determinó mediante tinción específica de anticuerpos y la puerta se decidió por la tinción del control de isotipo del anticuerpo en la misma célula.

Ensayo de transfección y unión celular HEK293

Las células HEK293 de ATCC se mantuvieron en el Medio Esencial Mínimo de Eagle con 10 % de FBS inactivado por calor. Un día antes de la transfección, las células HEK293 fueron recolectadas y resuspendidas en el Medio Esencial Mínimo de Eagle con 10 % de FBS inactivado por calor a la densidad de 0,4 millones de células por mililitro. Luego se añadieron células HEK293 al matraz T-75 por 20 ml de suspensión celular por matraz T-75 y se incubaron a 37 C durante 24 horas. El día de la transfección, se mezclaron 19 ug de plásmido DAN con 1,9 ml de Opti-MEM® I de medio de suero reducido de ThermoFisher y 57 ul de reactivo Transit-293 de Mirus y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 30 minutos de incubación, se añadió la mezcla de reactivo de ADN plásmido/Transit-293 al matraz T-75 con células HEK293 gota a gota en diferente área del matraz. Los matraces T-75 se agitaron suavemente hacia adelante y hacia atrás y de lado a lado para distribuir uniformemente los complejos de reactivo TransIT-293:ADN.

Después de 48 horas de incubación, se recolectaron células para verificar la expresión del objetivo transfectado y la unión de los anticuerpos de prueba al objetivo transfectado mediante citometría de flujo como se describe en la presente en el *Ensayo de unión por citometría de flujo.* En breve, las células recogidas se lavaron una vez con PBS en placa de 96 pocillos con fondo en V (200.000 – 300.000 células por pocillo) y se resuspendieron en 100 ul de regulador de trabajo rojo fijable Live/Dead. Después de la incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS y se cultivaron con anticuerpos a diferentes concentraciones en 100 ul de regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS y se cultivaron con anticuerpo secundario IgG humano conjugado con PE-Cy7 en regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo secundario, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100 ul de regulador de fijación BioLegend. A continuación se analizaron las muestras en citómetro de flujo Cytek. Los datos se analizaron con FlowJo y se siguió la estrategia de regulación: En breve, la población celular diana fue cerrada por FSC y SSC. Se seleccionaron células individuales de la población de células diana por FSC-A y FSA-H. Las células individuales vivas se separaron de células individuales mediante un tinte rojo live/dead bajo. La unión a la diana se determinó mediante tinción específica de anticuerpos y la puerta se decidió por la tinción del control de isotipo del anticuerpo en la misma célula.

Ensayo de unión por interferometría de bicapa

Los anticuerpos se prepararon en 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 con una concentración final de 15 ug/ml. También se prepararon proteínas humanas ROR1-His o CD3e-His y se diluyeron en serie (dilución 4 veces que varía de 400 nM a 0,098 nM) en 1×PBS con 0,02 % de Tween-20. Los biosensores se prehumedecieron en 200 ul de 1×PBS

con 0,02 % de Tween-20 durante 10 minutos. Mientras tanto, el sistema Octet BLI (ForteBio) se precalentó durante 30 minutos y el caudal se ajustó a 1000 rpm. Los biosensores (biosensor de captura de Fc anti-hIgG) se sumergieron en 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 durante 60 segundos a 30 °C para obtener una lectura de referencia inicial. Después de la lectura de referencia de 60 segundos, los biosensores se expusieron al anticuerpo de prueba durante 300 segundos a 30 °C para la asociación entre el anticuerpo y los biosensores (acoplamiento del anticuerpo con el biosensor). Después, los biosensores con anticuerpo se expusieron a ROR1 o CD3e humano en 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 a 30 °C durante 300 segundos para la reacción de asociación entre el anticuerpo y ROR1 o CD3e humano (curva de asociación). Después de una reacción de asociación de 300 segundos entre el anticuerpo y el antígeno, los biosensores con anticuerpo y antígeno se expusieron a 250 ul de 1×PBS con 0,02 % de Tween-20 a 30 °C durante 300 segundos para la reacción de disociación entre el anticuerpo y el anticuerpo (curva de disociación). La afinidad de unión se calculó mediante el algoritmo de ajuste de datos incorporado.

Detección de CD69 y CD25 en células T

Después de configurar el experimento para el ensayo de citotoxicidad, se añadieron células diana a los pocillos (5000 células diana por pocillo) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 5 horas. Después de 5 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo celular de la placa sin tocar las células diana y se añadieron 50 ul de PBMC frescas (150.000 PBMC por pocillo) a los pocillos con células diana (relación E:T de 30:1). A continuación, se añadieron 50 ul de TCE CD3xROR1 a los pocillos designados con 150.000 PBMC y 5000 células diana. Después de incubar a 37° C durante la noche, las PBMC se recogieron y se lavaron una vez con PBS por centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a la placa de 96 pocillos con fondo en V. Para preparar

el rojo fijable Live/Dead, se disolvió un vial de polvo en 50 ul de DMSO para hacer una solución madre y después se diluyó 1 ul de rojo fijable Live/Dead en 1 ml de PBS para preparar la solución de trabajo. A continuación, se añadieron 100 ul de regulador de trabajo rojo fijable Live/Dead a la célula en la placa de 96 pocillos con fondo en V y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se cultivaron con anticuerpos (anticuerpo anti-TCRa/β humano de ratón conjugado con PE-Cy5, anticuerpo anti-CD19 humano de ratón conjugado con PE, anticuerpo anti-CD56 humano de ratón conjugado con BB515, anticuerpo anti-CD14 humano de ratón conjugado con BB700, anticuerpo anti-CD69 o anti-CD25 humano de ratón conjugado con PE-Cy7) en 100 ul de regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 ul de regulador de fijación BioLegend. A continuación se analizaron las muestras en citómetro de flujo Cytek. Los datos se analizaron con FlowJo y se siguió la estrategia de regulación: En breve, la población celular diana fue cerrada por FSC y SSC. Se seleccionaron células individuales de la población de células diana por FSC-A y FSA-H. Las células individuales vivas se separaron de células individuales mediante un tinte rojo live/dead bajo. Las células T fueron liberadas de células individuales vivas por TCRa/b alta. La expresión de CD69 y CD25 fue entonces cerrada en células T con CD69 o CD25 alto.

Detección de CD107a en células T

Después de configurar el experimento para el ensayo de citotoxicidad, se añadieron células diana a los pocillos (5000 células diana por pocillo) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 5 horas. Después de 5 horas de incubación, se retiró el medio

de cultivo celular de la placa sin tocar las células diana y se añadieron 50 ul de PBMC frescas (150.000 PBMC por pocillo) a los pocillos con células diana (relación E:T de 30:1). A continuación, se añadieron 50 ul de TCE CD3xROR1 a los pocillos designados con 150.000 PBMC y 5.000 células diana. Después de incubar a 37° C durante 5 horas, se añadió al medio de cultivo anticuerpo anti-CD107a humano de ratón conjugado con PE-Cy7 (40:1) y monensina (1500:1) y monensina (1500:1) y se incubó durante 8 horas. Después se recogieron las PBMC y se lavaron una vez con PBS por centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a la placa de 96 pocillos con fondo en V. Para preparar el rojo fijable Live/Dead, se disolvió un vial de polvo en 50 ul de DMSO para hacer una solución madre y después se diluyó 1 ul de rojo fijable Live/Dead en 1 ml de PBS para preparar la solución de trabajo. A continuación, se añadieron 100 ul de regulador de trabajo rojo fijable Live/Dead a la célula en la placa de 96 pocillos con fondo en V y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se cultivaron con anticuerpos (anticuerpo anti-TCRa/b humano de ratón conjugado con PE-Cy5, anticuerpo CD19 humano de ratón conjugado con PE, anticuerpo anti-CD56 humano de ratón conjugado BB515, anticuerpo anti-CD14 humano de ratón conjugado BB700) en 100 ul de regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 ul de regulador de fijación BioLegend. A continuación se analizaron las muestras en citómetro de flujo Cytek. Los datos se analizaron con FlowJo y se siguió la estrategia de regulación: En breve, la población celular diana fue cerrada por FSC y SSC. Se seleccionaron células individuales de la población de células diana por FSC-

A y FSA-H. Las células individuales vivas se separaron de células individuales mediante un tinte rojo live/dead bajo. Las células T fueron liberadas de células individuales vivas por TCRa/b alta. A continuación, se seleccionaron las células T con altos niveles de CD107a.

Ensayo de destrucción de células espectadoras

El día antes de la configuración del ensayo, se retiraron antibióticos selectivos de la célula diana (célula RFP ROR1+ MDA-MB-231 o célula FLUC eGFP ROR1- T-47D). El día de la preparación del ensayo, las líneas de células diana se recolectaron mediante un breve tratamiento con TrypLE y después se lavaron con medio de cultivo mediante centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las líneas celulares diana se resuspendieron en medio de cultivo para determinar la viabilidad celular mediante exclusión azul tripano en Cellometer. La densidad celular viable se ajustó a 50.000 células/ml en medios de cultivo. Se dispensaron cuidadosamente 100 ul de suspensión de células diana ROR1 (5000 células) en el pocillo designado de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos usando una pipeta multicanal solo para el grupo con células diana ROR1-. Se dispensaron 100 ul de suspensión de células diana ROR1+ (5000 células) al pocillo designado de la placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos para el grupo con célula diana ROR1+ solamente. Para el grupo con células diana ROR1+ y ROR1-, se añadieron 100 ul de suspensión de células diana ROR1- (5000 células) y 100 ul de suspensión de células diana ROR1+ (5000 células) al pocillo designado de la placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos. Después se incubó la placa durante 4-5 horas en incubadora de cultivo tisular para asegurar que las células diana se hayan adherido al fondo de la placa de 96 pocillos.

Las células T recuperadas se centrifugaron durante 5 minutos a 500 × g a temperatura ambiente para formar un pellet y se resuspendieron en medio de cultivo. La densidad de linfocitos T viables se ajustó a 0,5 millones de células/ml en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Después de 4-5 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente de placas de 96 pocillos con células diana. Se añadieron 50 ul de suspensión de células T de 0,5 millones de células/ml (25.000 células T) al pocillo designado en la placa de 96 pocillos con célula diana, lo que daría como resultado una relación E:T de 5:1 para las células T.

Los reclutadores de células T (TCE) CD3xROR1 se prepararon y se diluyeron en serie (dilución serial 5 veces) en medio RPMI1640 con 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina en el rango de 200 nM y 2,56 pM. A continuación, se añadieron 50 ul de TCE CD3xROR1 preparados en diferentes concentraciones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos con células T y células diana y se incubaron en CELLINK CELLCYTE X a 37 °C con 5 % de CO_2. El número celular de la célula RFP ROR1+ MDA-MB-231 y la célula FLUC eGFP ROR1- T-47D en cada pocillo se monitoreó cada tres horas durante 72 horas. Se graficó el cambio del número de células diana en cada pocillo en función del tiempo y se calculó el porcentaje de destrucción de células diana usando el número de células diana en el tiempo cero como base del 100 %.

Ensayo de destrucción en serie

El día antes de la configuración del ensayo, se retiraron antibióticos selectivos de las líneas celulares diana. El día de la preparación del ensayo, las líneas de células diana se recolectaron mediante un breve tratamiento con TrypLE y después se lavaron con medio de cultivo mediante centrifugación a 500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las líneas celulares diana se resuspendieron en medio de cultivo para determinar

la viabilidad celular mediante exclusión azul tripano en Cellometer. La densidad celular viable se ajustó a 200.000 células/ml en medios de cultivo. Se realizó una dilución en serie de la célula diana (factor 2) a partir de 200.000 células/ml a 3.125 células/ml (200.000 células/ml, 100.000 células/ml, 50.000 células/ml, 25.000 células/ml, 12.500 células/ml, 6.250 células/ml, 3125 células/ml, 0 células/ ml) con medio de cultivo. Se dispensaron cuidadosamente 50 ul de suspensión de células diana a diferentes densidades en pocillos de control estándar designados de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos usando una pipeta multicanal, lo que produjo 10.000 células, 5000 células, 2500 células, 1250 células, 625 células, 313 células, 156 células, 0 células por pocillo como controles estándar. Para todos los pocillos de artículos de prueba, se dispensaron cuidadosamente 100 ul de suspensión celular diana a la densidad de 50.000 célula/ml (5000 células por pocillos) a los pocillos designados. La placa con células diana se incubó a 37 °C durante 4 horas.

Después de 48 horas de recuperación en 250 U/ml de IL-2, las células T CD8+ activadas se granularon hacia abajo mediante centrífuga durante 5 min a 500 × g a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio de cultivo. También se determinó la viabilidad de las células vía exclusión azul tripano. Las células T CD8+ recuperadas viables se ajustaron a 800.000 células/ml en medio de cultivo. Se realizó una dilución en serie de células T CD8+ activadas (factor 2) a partir de 800.000 células/ml a 6.250 células/ml (800.000 células/ml, 400.000 células/ml, 200.000 células/ ml, 100.000 células/ml, 50.000 células/ml, 25.000 células/ml, 12.500 células/ ml, 6.250 células/ ml) con medio de cultivo. Se dispensaron cuidadosamente 50 ul de suspensión de células T CD8+ activadas recuperadas a diferentes densidades a pocillos designados con 5000 células diana para artículos de ensayo o controles en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano, transparente y negra de 96 pocillos usando una pipeta multicanal, que produjo 40.000 células (relación E:T de 8:1), 20.000 células (relación

E:T de 4:1), 10.000 células (relación E:T de 2:1), 5000 células (relación E:T de 1:1), 2500 células (relación E:T de 1:2), 1250 células (relación E:T de 1:4), 625 células (relación E:T de 1:8), 313 células (relación E:T de 1:16) por pocillo para todos los artículos de prueba o controles.

Se prepararon artículos de prueba y controles negativos adecuados en medio de cultivo a la concentración de 1 nM. Se añadieron 100 ul de artículos de prueba preparados de controles negativos a los pocillos designados con 5000 células diana y diferente número de células T CD8+ activadas. Para los pocillos con diferente número de células diana como controles estándar, se añadieron 150 ul de medio de cultivo para llevar el volumen total a 200 ul. Las células se incubaron durante un día a 37 °C con 5 % de CO_2. Al final del período de incubación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron durante 1 minuto a 500 ×g para transferir 150 µl de sobrenadante a la placa de almacenamiento de fondo en V usando una pipeta multicanal para su uso posterior. La solución de ensayo de luciferasa de ONE-Glo se llevó a temperatura ambiente. Después se añadieron 50 ul de solución One-Glo al pocillo designado y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. La bioluminiscencia se midió en un lector de placas con un protocolo de bioluminiscencia preestablecido. Para calcular la frecuencia de destrucción, la intensidad de la bioluminiscencia de las células diana en diferentes números de siembra como controles estándar se graficó contra los números de células para generar una curva estándar. El número de células diana vivas en cada pocillo de muestra de ensayo se calculó con la curva estándar utilizando la intensidad de bioluminiscencia de cada pocillo de muestra de prueba. El número de células diana muertas se calculó restando el número de células diana vivas calculado para cada muestra de prueba de 5000 (número de placas de células diana). La frecuencia de destrucción de las células diana en cada pocillo se generó dividiendo el número de células diana muertas con el número de células T CD8+ de entrada para el mismo pocillo.

Estudio de farmacocinética (PK) en ratones

Se realizó la farmacocinética (PK) de dosis única para proteína similar a anticuerpos en ratones C57BL/6j silvestres de 8-10 semanas de edad obtenidos del Jackson Laboratory. Cada artículo de prueba de proteína se preparó en solución salina regulada con fosfato (PBS) estéril pH 7,4 a una concentración de 100 ug/50 ul (2 mg/ml) para una dosis de 5 mg/kg o 10 ug/50 ul (0,2 mg/ml) para una dosis de 0,5 mg/kg. En el momento "0", se inyectaron 50 ul de proteína como bolo intravenoso (IV) en 9 ratones por nivel de dosis del artículo de prueba, de tal manera que se pudieran tomar muestras de 3 ratones por puntos de tiempo de 0, 1, 6, 24, 48, 72, 168, 240 horas y a ningún ratón se le tomaron muestras más de dos veces. Se recolectó sangre periférica (aproximadamente 60 µl) en tubos de heparina de litio previamente enfriados (0-4 °C) por vía sublingual, retrobulbar o por vía de la vena de la cola (corte de cola) bajo anestesia por inhalación (isoflurano) antes de la inyección IV y a las 1, 6, 24, 48, 72, 168 y 240 horas. Después de la extracción de sangre, las muestras de sangre se centrifugaron (2500 g/10 minutos a 4 °C) y el plasma se almacenó inmediatamente a -80 °C.

La concentración de cada artículo de prueba (proteína FUSE con cadena principal de IgG1 humana) en suero de ratón se cuantificó usando el kit ELISA SimpleStep de IgG humana de Abcam. En breve, todos los reactivos, patrones de trabajo y muestras se llevaron a temperatura ambiente antes del ensayo. Todas las muestras y patrones se prepararon en *diluyente de muestra NS* proporcionado por el fabricante. Cuando comenzó el ensayo, se añadieron 50 µl de todas las muestras o patrones a los pocillos designados en la placa de 96 pocillos proporcionada por el fabricante. A continuación, se añadieron 50 µl de cóctel de anticuerpos a los pocillos. Después de sellar con película, la placa se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas (400 rpm). Tras la incubación de 40 minutos, la placa se lavó tres veces con regulador 1X Wash Buffer PT proporcionado por el

fabricante y después se añadieron 100 µl de *Solución de desarrollo TMB* proporcionada por el fabricante a cada pocillo. Después de incubar durante 5 minutos en la oscuridad en un agitador de placas (400 rpm), se añadieron al pocillo 100 µl de *Solución de parada* proporcionada por el fabricante. La placa se sacudió en un agitador de placas durante 1 minuto para medir la OD a 450 nm para cada pocillo en un lector de placas. La concentración del artículo de prueba en cada muestra se calculó retrospectivamente usando la curva estándar generada con la absorbancia de diferentes concentraciones de IgG humana estándar.

Modelos tumorales de xenoinjerto de ratón en ratones inmunocomprometidos

La PK/PD in vivo (farmacodinámica) y la eficacia se evaluaron usando dos modelos de xenoinjerto ROR1+ humano en ratones inmunocomprometidos humanizados. En el primer modelo, a los ratones NSG se les inyectó una mezcla de 5 millones de NCCIT y células T expandidas de tal manera que la relación de tumor a células T CD8+ constituía 1:4 sin matrigel. Dichas células T se expandieron durante 12 días y se recuperaron durante 3 días adicionales en IL-2 para imitar un fenotipo progenitor agotado. Las células T de 2 donantes sanos se evaluaron para la alorreactividad mediante un ensayo de citotoxicidad bioluminiscente in vitro y liberación de IFNγ (como se describió anteriormente) usando NCCIT diseñada genéticamente para expresar constitutivamente luciferasa de luciérnaga. El donante que mostró una alorreactividad mínima (definida como <15 % de destrucción máxima y <150 pg/ml de liberación máxima de IFNγ a una E:T de 1:3) hacia NCCIT in vitro (donante 2) se usó in vivo. Los ratones se trataron con PBS (n = 4), FUSE-394 (0,15 mg/kg; n=6), FUSE-394 (1,5 mg/kg; n=6), FUSE-399 (0,15 mg/kg; n=6) o FUSE-399 (1,5 mg/kg; n=6) los días 1, 2, 4 y 7. En todos los casos el volumen de tratamiento fue de 50 µl en pBS pH 7,4. A continuación, se examinan ratones para el crecimiento tumoral. Si se sospechaba que había una invasión tumoral, a todos los ratones se les inyectaban por vía intravenosa

3,5 millones de células T expandidas y se iniciaba una segunda ronda de tratamiento de manera que se administraban inyecciones intravenosas de artículos de prueba los días 0, 2, 4 y 6 después de la transferencia adoptiva de células T. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3-5 días. Los ratones fueron sacrificados al final del estudio. En el segundo modelo, a ratones NSG en los que se habían eliminado tanto MHC-I como MHC-II (NSG-MHC-I/II dKO; n=25) se les implantaron por vía subcutánea 5 millones de células de teratoma ROR1+ NCCIT mezcladas con matrigel. Cuando el volumen tumoral alcanzó 50 mm en cubo, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 30 millones de PBMC recién aisladas de un donante humano sano. Una vez que el volumen tumoral alcanzó los 100 mm cúbicos ("día 0"), los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos. El grupo 1 (n=5) recibió 5 mg/kg del tratamiento de control negativo, cirmtuzumab (FUSE-366), un anticuerpo dirigido a ROR1 que bloquea la señalización de Wnt5-alfa pero que tiene poco o ningún efecto en modelos de tumores de xenoinjerto de ratón. Los grupos 2 y 3 (n=10 cada uno) recibieron un TCE seleccionado a 5 mg/kg o 2 mg/kg, respectivamente. El tratamiento consistió en inyecciones IV en bolo del artículo de prueba preparado en PBS pH 7,4, de manera que se inyectaron 50 µl por vía IV a través de la vena de la cola. Para 5 mg/kg, se inyectaron 100 µg de artículo de prueba en 50 µl. Para 0,5 mg/kg, se inyectaron 10 µg de artículo de prueba en 50 µl. Los ratones recibieron tratamiento los días 0, 2 y 7. El volumen tumoral se midió cada 4 días a partir del día 0. Los ratones fueron sacrificados al final del estudio.

Modelo tumoral de xenoinjerto de ratón en ratones inmunocomprometidos humanizados

La capacidad de los bsAb ROR1 x CD3 para mediar la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) in vivo se evaluó usando el modelo de tumor de ratón TNBC de xenoinjerto humano ROR1+, MDA-MB-231. Brevemente, NSG (NOD-*scid* IL2Rgamma^{null}; Jackson Laboratory) fueron inyectados por vía subcutánea con 5 millones de MDA-MB-231 mezclados

en Matrigel Matrix (Corning) en los flancos dorsales derechos de los animales. El mismo día, a los ratones también se les inyectó por vía intravenosa 5 millones de células T humanas expandidas. Las células T expandidas para inyección se seleccionaron de varios donantes sanos basados en la alorreactividad mínima hacia MDA-MB-231. En breve, se expandieron células T de dos donantes sanos usando el reactivo activador de células T CD3/CD28 humanas ImmunoCult™ (Stemcell) según el protocolo recomendado por el fabricante. La alorreactividad se examinó usando nuestros ensayos in vitro de citotoxicidad bioluminiscente y liberación de IFNγ (como se describió anteriormente) y se definió como la destrucción máxima igual al 15 % o menos y la liberación máxima de IFNγ igual a 300 pg/ml o menos a una E:T de 5:1. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron entre 75-100 milímetros cúbicos, los ratones fueron aleatorizados en 5 grupos. El grupo 1, compuesto por 5 ratones, recibió el tratamiento simulado, PBS dos veces por semana. Los grupos 2-4 consistieron en 10 ratones cada uno y recibieron dos dosis semanales de FUSE608 a 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg o 3 mg/kg. El grupo 5 consistió en 7 ratones y recibió dos dosis semanales de FUSE399 a 3 mg/kg. Los volúmenes tumorales se midieron cada 3-5 días y también se registró la supervivencia de ratones. Los ratones fueron sacrificados al final del estudio.

Ejemplo 48

Un reclutador de células T biespecífico CD3 específico para ROR1 diseñado genéticamente para tumores sólidos con una ventana terapéutica ampliada

Se diseñaron dos TCE específicos para ROR1 con propiedades para aumentar el tamaño de sus ventanas terapéuticas usando un VHH específico para ROR1 único de Camelus bactrianus (clon 5A1) que contiene un enlace disulfuro no canónico entre CDR1 y CDR3 y una valencia específica para ROR1 que (1) desacopla la citotoxicidad de

la liberación de citocinas y (2) facilita la discriminación entre la densidad de la superficie celular de ROR1 en células normales versus células tumorales.

Cuando 5A1 se emparejó con un Fab anti-CD3 en dos orientaciones que incluyen un dominio Fc que extiende la vida media, se pudo establecer una sinapsis célula T/tumor que resultó en una activación suficiente para inducir la desgranulación/destrucción tumoral en concentraciones de TCE de 10-30 pM (EC50 ~ 150-200 nM). En contraste, la expresión de CD69, CD25 e IFNγ, este último directamente corriente arriba de CRS, no se observó hasta que la concentración de TCE alcanzó ~1 nM (EC50 ~ 5-10 nM). En comparación con el TCE de control sin desacoplamiento, los TCE 5A1 demostraron un desacoplamiento entre 3,5-4,5 veces mayor. En el contexto de las dianas tumorales JeKo1 CD19+/ROR1+, los TCE 5A1 estaban entre 6-7,5 veces mejor desacoplados en comparación con blinatumomab. También observamos una citotoxicidad EC50 para blinatumomab inferior a 100 fM, lo que sugiere que el riesgo tanto de CRS como de TLS son múltiples pliegues mayores que para los TCE 5A1. En comparación con el control TCE sin desacoplamiento, los TCE 5A1 mediaron una citotoxicidad/destrucción en serie superior con una relación efector-objetivo (E:T) tan baja como 1:16, más consistente con los tumores sólidos. Los TCE 5A1 también utilizaron la valencia de unión específica de ROR1 para discriminar entre las densidades de superficie celular de ROR1 típicas de las células tumorales (>15.000 moléculas/célula) versus las células normales (generalmente <10.000 moléculas/célula). La concentración de los TCE requerida para la liberación máxima de IFNγ y la destrucción de las células tumorales registradas en el rango pM, a diferencia del rango suprafisiológico de nM/uM que fue insuficiente para inducir más de 25 % y 35 % de liberación de IFNγ y citotoxicidad, respectivamente, en células que expresan <10.000 moléculas de ROR1.

Ejemplo 49

Como se muestra en la Figura 58C, los formatos usados para los anticuerpos biespecíficos (bsAb) CD3 x ROR1 son los de botón en ojal y contienen subunidades modulares del fab específico CD3 humanizado 1F3-3 (o variantes de estos) y los VHH específicos para ROR1, 5A1 o 2A11 o variantes de estos. El scFV específico de ROR1, R11, que se une al dominio proximal a la membrana de ROR1 (denominado dominio Kringle) se usó para generar el bsAb de referencia sin desacoplamiento, FUSE399. A manera de ejemplo, el Formato Ac13 consiste en un fab 1F3-3 fusionado genéticamente al extremo N del orificio de la cadena pesada y aglutinantes específicos de ROR1 fusionados genéticamente al extremo N del botón de la cadena pesada y al extremo C de la cadena ligera.

Ejemplo 50

Como se muestra en las tablas a continuación, las células de melanoma de ratón B16-F10 (Tablas 19A-19F) o de adenocarcinoma colorrectal humano LS174T (Tablas 19G-19H) modificadas genéticamente para expresar ROR1 humano en densidades altas y bajas, respectivamente, se tiñeron para análisis citométrico de flujo con 100 nM de variantes humanizadas de los VHH específicos de ROR1, 5A1 o 2A11 en un formato VHH-Fc o en el formato Ac13 que se muestra en la Figura 58. Las células se analizaron en un citómetro de flujo después de que el artículo de prueba primario se etiquetó fluorescentemente con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana, específico para la región Fc, conjugado con PE. El control positivo usado fue el clon 2A2 anti-ROR1 humano conjugado con PE. Los controles negativos incluyeron un Ab IgG de ratón etiquetado con PE, solo el anticuerpo secundario, la combinación de un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) más anticuerpo de cabra anti-IgG humana,

específico para la región Fc, conjugado con PE y fluorescencia menos uno (FMO, por sus siglas en inglés). Otros controles incluyeron la versión no humanizada de 5A1-Fc (FUSE179), 2A11-Fc (FUSE112) y 5A1-Ac13 (FUSE488). Las variantes humanizadas se generaron usando un diseño computacional (FUSE489, FUSE497-498, FUSE563, FUSE569-570 y BI-HU9-VHH11-33), una genoteca de visualización de levadura en la que se insertaron mutaciones en los residuos de la zona de Vernier del marco humano indicado en el número de acceso de GenBank M99660 (FUSE524-525, FUSE589, FUSE597-598, FUSE537, FUSE661-662, BI-HU9-HK y BI-HU9-HK-1), y una segunda genoteca de visualización de levadura en la que se insertaron mutaciones en los residuos de la zona de Vernier del marco humano indicado en el número de acceso de GenBank AWH66715 y la posición de aminoácido 103 dentro de CDR3 (FUSE559, FUSE590-596, BI-HU9-VH9-1, FUSE654-655 y FUSE661-662. También se generaron variantes de FUSE559 maduradas por afinidad usando diseño computacional (F22158101-21; Tabla 19H).

Tabla 19A. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	5,96
mIgG-PE	6,1
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	35240
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	5,67
100 nM anti-HEL4-hIgG1	9,86
100 nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	4220
100 nM FUSE-488 (5A1-Ac13)	3909
100 nM FUSE-489 (h5A1-Ac13)	1055
100 nM FUSE-497 (h5A1-Ac13)	811
100 nM FUSE-498 (h5A1-Ac13)	1363
100 nM FUSE-524 (h5A1-HK1_Fc)	**6473**
100 nM FUSE 525 (h5A1-HK1v Fc)	5,84

Tabla 19B. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	4,07
mIgG-PE	4,36
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	19948
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	15,5
100 nM anti-HEL4-hIgG1	12,1
100 nM de FUSE-179-2-AKTA	3732
100 nM FUSE-559 (h5A1-FA9-HK1 Fc)	6082
100 nM FUSE-563 (h5A1-FA11 Fc)	388
100 nM FUSE-569 (h5A1-FA17 Fc)	590
100 nM FUSE-570 (h5A1-FA18 Fc)	583

Tabla 19C. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	4,32
Migg-PE	4,31
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	38704
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	4,45
100 nM anti-HEL4-hIgG1	6,85
100 nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	8479
100 nM FUSE-112-2 (2A11 Fc)	11934
100 nM FUSE-597 (h5A1-HK2 Fc)	10088
100 nM FUSE-598 (h5A1-HK6 Fc)	9555

Tabla 19D. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	2,14
mIgG-PE	2,08
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	21570
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	3,01

100 nM anti-HEL4-hIgG1	3,86
100 nM FUSE537 (h2A11-HK1_Fc)	862

Table1 9E. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	6,48
mIgG-PE	6,53
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	27104
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	9,92
100 nM anti-hCD47	9,77
100 nM anti-HEL4-hIgG1	13,3
100 nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	4475
100 nM FUSE-112-2 (2A11 Fc)	7840
100 nM FUSE-589 (h2A11-HK5 Fc)	6951
100 nM FUSE-590 (h5A1-FA9-HK2_Fc)	7329
100 nM FUSE-591 (h5A1-FA9-HK3_Fc)	7768
100 nM FUSE-592 (h5A1-FA9-HK4_Fc)	7539
100 nM FUSE-593 (h5A1-FA9-HK5_Fc)	7525
100 nM FUSE-594 (h5A1-FA9-HK6_Fc)	7911
100 nM FUSE-595 (h5A1-FA9-HK7_Fc)	7180
100 nM FUSE-596 (h5A1-FA9-HK8 Fc)	6256

Tabla 19F. Pantalla FACS de concentración única

B16-F10-ROR1-H	MFI
FMO	356
mIgG-PE	94,6
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	416000
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	125
100 nM anti-HEL4-hIgG1	1135
100 nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	93806
100 nM FUSE-112-2 (2A11 Fc)	207782
100 nM FUSE-559 (h5A1-FA9-HK1 Fc)	198683

100 nM FUSE-560 (h2A11-HK2 Fc)	159403
100 nM FUSE-561(h2A11-HK3 Fc)	157168
100 nM FUSE-562 (h2A11-HK4 Fc)	155016
100 nM (BI-HU9-VHH11 h5A1 Fc)	14127
100 nM (BI-HU9-VHH12 h5A1 Fc)	21000
100 nM (BI-HU9-VHH13 h5A1 Fc)	21114
100 nM (BI-HU9-VHH21 h5A1 Fc)	15601
100 nM (BI-HU9-VHH22 h5A1 Fc)	22260
100 nM (BI-HU9-VHH23 h5A1 Fc)	23588
100 nM (BI-HU9-VHH31 h5A1 Fc)	17939
100 nM (BI-HU9-VHH32 h5A1 Fc)	20060
100 nM (BI-HU9-VHH33 h5A1 Fc)	21956
100 nM (BI-HU9-VH9 h5A1 Fc)	14450
100 nM (BI-HU9-VH9-1 h5A1 Fc)	16607
100 nM (BI-HU9-HK h5A1 Fc)	133
100 nM (BI-HU9-HK-1 h5A1 Fc)	135858

Tabla 19G. Pantalla FACS de concentración única

LS174T-ROR1-L	MFI
FMO	22,3
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	22,6
mIgG-PE	23,2
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	7956
IgG1 humana de 100nM	30,8
100nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	**836**
100 nM FUSE-559 (h5A1-FA9-HK1 Fc)	3120
100 nM FUSE-654 - h5A1-FA9-HK6-R19K Fc	4558
100 nM FUSE-655 - h5A1-FA9-HK6-N84S Fc	4010
100 nM FUSE-112-2 (2A11)	**4336**
100 nM FUSE-661- h2A11-HK2-3-N84S Fc	4881
100 nM FUSE-662 – h2A11-HK2-16-N84S Fc	4351

Tabla 19H. Pantalla FACS de concentración única

LS174T-ROR1-L	MFI
FMO	58,4
Migg-PE	54
Anti-ROR1 humano (clon 2A2)-PE	36206
2do anticuerpo anti-IgG humana-PE	45,3
100 nM de IgG1 humana	316
100 nM FUSE-179-2 (5A1 Fc)	3058
100 nM FUSE-559 (h5A1-FA9-HK1 Fc)	24426
100 nM F22158101 (h5A1-BI-001 Fc)	19719
100 nM F22158102 (h5A1-BI-002 Fc)	20481
100 nM F22158103 (h5A1-BI-003 Fc)	15800
100 nM F22158104 (h5A1-BI-004 Fc)	28869
100 nM F22158105 (h5A1-BI-005 Fc)	22268
100 nM F22158106 (h5A1-BI-006 Fc)	17400
100 nM F22158107 (h5A1-BI-007 Fc)	11471
100 nM F22158108 (h5A1-BI-008 Fc)	25086
100 nM F22158109 (h5A1-BI-009 Fc)	34983
100 nM F221581010 (h5A1-BI-010 Fc)	18659
100 nM F221581011 (h5A1-BI-011 Fc)	19368
100 nM F221581012 (h5A1-BI-012 Fc)	14200
100 nM F221581013 (h5A1-BI-013 Fc)	23838
100 nM F221581014 (h5A1-BI-014 Fc)	28696
100 nM F221581015 (h5A1-BI-015 Fc)	29280
100 nM F221581016 (h5A1-BI-016 Fc)	14976
100 nM F221581017 (h5A1-BI-017 Fc)	28569
100 nM F221581018 (h5A1-BI-018 Fc)	17492
100 nM F221581019 (h5A1-BI-019 Fc)	33815
100 nM F221581020 (h5A1-BI-020 Fc)	26535
100 nM F221581021 (h5A1-BI-021 Fc)	35788

Ejemplo 51

Como se muestra en la Figura 72, la afinidad de unión aparente (unión a EC50) del VHH-Fc específico para ROR1 que incorpora el clon VHH no humanizado 5A1 (FUSE179; círculo negro), el clon humanizado 5A1-FA9-HK1 (FUSE559; cuadrado negro) o el clon humanizado 5A1-HK1 (FUSE524; triángulo negro) se calculó. Se muestra un gráfico x-y no lineal de la unión a la célula B16-F10 diseñada genéticamente para expresar ROR1 humano en relación con la concentración del artículo de prueba usado para la tinción. Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. La unión se midió mediante citometría de flujo usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente específico para el dominio Fc de IgG1. A continuación, debajo del gráfico, se muestra una tabla de síntesis de los EC50 y el MFI máximo.

Ensayo de unión por resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se detectó la unión del artículo de prueba de proteínas a ROR1 humano recombinante (Acro Biosystems, RO1-H522y) en un sistema biosensor BIAcore 8K (Cytiva) usando un ensayo SPR. Brevemente, un chip sensor CM5 carboximetilado se activó con una mezcla 1:1 de 0,4 M de N-etil-N-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y 0,1 M′ de N-hidroxisuccinimida. Después, el ROR1 humano recombinante en 10 mM de NaOAc (pH 5) se inmovilizó en el chip sensor mediante acoplamiento de amina de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener el RU estable de 4400. Los sitios sin reaccionar se bloquearon con 1M etanolamina/HCl (pH 8). Las células de flujo de control (en blanco) se activaron y bloquearon en ausencia de ROR1. Las células de flujo se equilibraron rutinariamente con regulador de ejecución (PBS, 0,005 % surfactante P20). Las proteínas del artículo de prueba usadas para evaluar la unión a ROR1 humano recombinante se diluyeron en regulador de ejecución HBS-EP y se inyectaron en el chip sensor en diferentes concentraciones. Los datos

cinéticos y de afinidad de la unión de ROR1/artículo de prueba se obtuvieron a una velocidad de flujo de 30 µl/min, con un tiempo de asociación establecido de 100 segundos y un tiempo de disociación de 200 segundos. Los datos de ensayos duplicados se modelaron para el equilibrio de unión y se calcularon gráficos de puntos para 200 nM del artículo de prueba de proteína. Constante de asociación (ka), constante de disociación (kd) y afinidad de unión (KD = kd/ka) se generaron a partir del software integrado en el sistema BIAcore 8K.

Detección de PD-1, TIGIT y CD69 en células T

Después de configurar el experimento para el ensayo de citotoxicidad, se añadieron células diana a los pocillos (5000 células diana por pocillo) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 5 horas. Después de 5 horas de incubación, se retiró el medio de cultivo celular de la placa sin tocar las células diana y se añadieron 50 ul de PBMC frescas (150.000 PBMC por pocillo) a los pocillos con células diana (relación E:T de 30:1). A continuación, se añadieron 50 ul de TCE CD3xROR1 a los pocillos designados con 150.000 PBMC y 5000 células diana. Después de incubar a 37 °C durante 24, 48 o 72 horas, las PBMC se recolectaron y se lavaron una vez con PBS mediante centrifugación a 500 ×g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron a una placa de 96 pocillos con fondo en V. Para preparar el rojo fijable Live/Dead, se disolvió un vial de polvo en 50 ul de DMSO para hacer una solución madre y después se diluyó 1 ul de rojo fijable Live/Dead en 1 ml de PBS para preparar la solución de trabajo. A continuación, se añadieron 100 ul de regulador de trabajo rojo fijable Live/Dead a la célula en la placa de 96 pocillos con fondo en V y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación de 15 minutos, las células se lavaron dos veces con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se cultivaron con anticuerpos (anticuerpo anti-TCRa/b humano de ratón conjugado con PE-Cy5, anticuerpo anti-CD19 humano de ratón conjugado con PE, anticuerpo anti-CD56 humano de

ratón conjugado con BB515, anticuerpo anti-CD14 humano de ratón conjugado con BB700, anticuerpo anti-PD-1 humano de ratón conjugado con PE-Cy7, TIGIT o CD69) en 100 ul de regulador de tinción Biolegend a 4 °C durante 45 minutos. Después de la incubación de 45 minutos con anticuerpo, las células se lavaron con PBS por centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 ul de regulador de fijación BioLegend. A continuación se analizaron las muestras en citómetro de flujo Cytek. Los datos se analizaron con FlowJo y se siguió la estrategia de regulación: En breve, la población celular diana fue cerrada por FSC y SSC. Se seleccionaron células individuales de la población de células diana por FSC-A y FSA-H. Las células individuales vivas se separaron de células individuales mediante un tinte rojo live/dead bajo. Las células T fueron liberadas de células individuales vivas por TCRa/b alta. La expresión de PD-1, TIGIT y CD69 fue entonces cerrada en células T con PD-1, TIGIT o CD69 alta.

Ejemplo 52

Como se muestra en la Figura 73, se calculó la afinidad (KD) del VHH-Fc específico para ROR1 que incorpora el clon VHH no humanizado 5A1 (FUSE179; Figura 73A) o el clon humanizado 5A1-FA9-HK1 (FUSE559; Figura 73B). Se muestran sensorgramas de datos de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) generados mediante análisis Biacore. Una tabla resumida de afinidad de unión (KD), tasa (k-a) y tasa de desactivación (kd) se muestra a continuación de la Figura 73B.

Ejemplo 53

Como se muestra en la Figura 74, se evaluó la aparente afinidad de unión (unión a EC50) de los dos anticuerpos biespecíficos (BSAB), FUSE488 (clon CD3

humanizado 1F3.3 x VHH contra ROR1 5A1) y FUSE608 (clon CD3 humanizado 1F3.3 x clon humanizado 5A1-FA9-HK1) para ROR1 humano (Figura 74A) y CD3 humano (Figura 74B).

La Figura 74A es un diagrama x-y no lineal que representa la unión de FUSE488 (triángulo negro) o FUSE608 (círculo negro) a la línea celular TNBC ROR1+ MDA-MB-231 humana a diversas concentraciones de artículos de prueba. FUSE608 demostró una afinidad aparente apreciablemente mayor por ROR1 que FUSE608. Esto puede atribuirse a la "optimización" de los residuos de la zona Vernier así como a la sustitución de aminoácidos en CDR3 de 5A1-5A9-HK1, D103H.

La Figura 74B es un gráfico x-y no lineal que ilustra la unión de FUSE488 (triángulo negro) o FUSE608 (círculo negro) a la línea celular Jurkat CD3+ de linfoma humano (que ha sido diseñada genéticamente para expresar la luciferasa Lucia corriente abajo de un promotor NFAT) en varias concentraciones de artículos de prueba. Dado que tanto FUSE488 como FUSE608 usan el mismo aglutinante CD3 e incorporan el formato, no es sorprendente que no se haya observado ninguna diferencia apreciable en la unión aparente para CD3 entre los dos bsAb.

Se usó un anticuerpo específico de lisozima de huevo de gallina (HEL) como control de isotipo negativo. La unión se midió mediante citometría de flujo usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente específico para el dominio Fc de IgG1.

A continuación, debajo de cada gráfico, se muestra una tabla resumida de los EC50 y el MFI máximo.

Ejemplo 54

Como se muestra en la Figura 75, se examina la capacidad de varios bsAb específicos para ROR1 x CD3 para inducir (1; Figura 75A) la destrucción mediada por células T de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231 y (2; Figura 75B) la liberación mediada por

células T de IFNγ cuando se mezclan conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231. Ambos ensayos fueron leídos a las 24 horas. Los artículos de prueba examinados fueron (a) el bsAb de referencia sin desacoplamiento ROR1 x 1F3-3, FUSE399 (scFV específico del dominio Kringle no humanizado, R11, x bsAb 1F3-3 humanizado), (b) FUSE488 (bsAb no humanizado 5A1 x 1F3-3 en formato Ac13) y (c) FUSE608 (clon CD3 humanizado 1F3-3 x clon humanizado 5A1-FA9-HK1). Los controles negativos probados fueron control 1F3-3 no dirigido, FUSE397 y el anticuerpo de control del isotipo anti-HEL IgG1 humano. El sistema de ensayo utilizó células T expandidas purificadas de donantes sanos.

Se muestran gráficos x-y no lineales ilustrativos de destrucción de células tumorales (Figura 75A) y liberación de IFNγ (Figura 75B), por lo que el orden de rango tanto de potencia (EC50) como de eficacia (Emáx) se observó como FUSE399 (triángulo inverso negro) > FUSE608 (círculo negro) > FUSE488 (triángulo negro). Es importante destacar que la diferencia en la potencia/eficacia de la destrucción de células tumorales entre FUSE608 y FUSE399 no fue apreciable. En contraste, FUSE608 fue aproximadamente 25x menos potente en la liberación de IFNγ que FUSE399, lo que indica que se observó un rango de concentración de FUSE608 en el que se puede lograr la máxima destrucción de células tumorales sin una liberación máxima concomitante de IFNγ. Esta propiedad asociada con FUSE608, que puede denominarse "disociación de la citotoxicidad de la liberación de citocinas", podría reducir el riesgo de efectos secundarios tóxicos, tal como el síndrome de liberación de citocinas (CRS), asociado con los bsAb CD3, sin sacrificar la destrucción de células tumorales. No se observó un rango de concentración apreciable con propiedades similares para FUSE399, el cual fue elegido específicamente como el "punto de referencia sin desacoplamiento".

Se observó poca o ninguna actividad en cualquiera de los ensayos con FUSE397 (cuadrado negro) ni en el artículo de prueba de control negativo anti-HEL

(diamante gris). Debajo de cada gráfico se muestran tablas resumidas de EC50, Emáx y AUC para cada artículo de prueba.

Ejemplo 55

Como se muestra en la Figura 76, se examina la capacidad de varios bsAb específicos para ROR1 x CD3 para inducir (1; Figuras 19A-19D) la destrucción mediada por PBMC de cuatro líneas celulares tumorales diferentes y (2); Figuras 76E-76H), liberación mediada por PBMC de IFNγ cuando se mezcla conjuntamente con las células tumorales antes mencionadas. Ambos ensayos fueron leídos a las 24 horas. Los artículos de prueba examinados fueron (a) el bsAb de referencia sin desacoplamiento ROR1 x 1F3-3, FUSE399 (scFV específico del dominio Kringle no humanizado, R11, x bsAb 1F3-3 humanizado) y (b) FUSE608 (clon CD3 humanizado 1F3-3 x clon humanizado 5A1-FA9-HK1). El anticuerpo anti-HEL IgG1 humano sirvió como control de isotipo negativo. El sistema de ensayo utilizó PBMC purificada de donantes sanos y las siguientes líneas celulares tumorales diferentes: (1) el cáncer de mama triple negativo ROR1+ (TNBC, por sus siglas en inglés), MDA-MB-231 (Figura 76A, 76E), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) ROR1+ NCI-H1975 (Figura 76B, 76F), linfoma de células del manto ROR1+, JeKO-1 (Figura 76C, 76G), y el cáncer de mama ROR1 negativo, T-47D (Figura 76D, 76H). La expresión de superficie celular de orden de rango de ROR1 fue la siguiente: JeKo-1>MDA-MB-231>NCI-H1973>T-47D. Como se muestra en los gráficos x-y no lineales ilustrativos etiquetados como Figuras 76A-76D, se observa que FUSE608 (círculo negro) indujo una potente (EC50) y eficaz (Emáx) destrucción de células tumorales dependiente de ROR1 mediada por PBMC dentro de 3 veces la EC50 y dentro del 5 % de la Emáx atribuida al FUSE399 de referencia (triángulo invertido negro). No se asoció ninguna destrucción no específica con el control anti-HEL ni tampoco se observó ninguna con

FUSE399 o FUSE608 en el contexto del objetivo negativo de ROR1, T-47D. En contraste, como se muestra en las Figuras 76E-76H, FUSE608 fue entre 25-30 veces menos potente en la liberación de IFNγ que FUSE399 en las tres líneas de células tumorales positivas para ROR1 examinadas. Este resultado indicó que un rango de concentración de FUSE608 en el que se puede lograr la máxima destrucción de células tumorales sin una liberación máxima concomitante de IFNγ no es una observación singular relacionada con MDA-MB-231, sino que puede extenderse a todas las líneas de células tumorales ROR1+ analizadas. No se observó rango de concentración apreciable con propiedades similares para FUSE399. Además, no se asoció ninguna liberación de IFNγ no específica con el control anti-HEL ni se observó ninguna con FUSE399 o FUSE608 en el contexto del objetivo negativo de ROR1, T-47D.

Las tablas resumidas de EC50, Emáx y AUC para cada artículo de prueba se muestran a continuación en las Figuras 76A-D y las Figuras 76E-H (Figuras 76I y 76J).

Ejemplo 56

Como se muestra en la Figura 77, se examina la capacidad de varios bsAb específicos para ROR1 x CD3 para inducir (1; Figura 77A) la destrucción mediada por PBMC de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231 y (2; Figura 77B), la liberación de IFNγ mediada por PBMC al mezclarse conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, (3. Figura 77C) la regulación positiva de la expresión de CD69 en la superficie celular de las células T dentro de PBMC al mezclarse conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, (4. Figura 77D) la regulación positiva de la expresión de PD-1 en la superficie celular en células T dentro de PBMC cuando se mezcla conjuntamente con células tumorales ROR1+ MDA-MB-231, y (5. Figura 77E) la regulación positiva de la expresión de TIGIT en la superficie celular en células T dentro de PBMC cuando se mezcla conjuntamente con células

tumorales ROR1+ MDA-MB-231. Todas las lecturas se evaluaron a las 72 horas. Los artículos de prueba examinados fueron (a) el bsAb de referencia sin desacoplamiento ROR1 x 1F3-3, FUSE399 (scFV específico del dominio Kringle no humanizado, R11, x bsAb 1F3-3 humanizado) y (b) FUSE608 (clon CD3 humanizado 1F3-3 x clon humanizado 5A1-FA9-HK1). El anticuerpo anti-HEL IgG1 humano sirvió como control de isotipo negativo. Se observa que la potencia (EC50) y la eficacia (Emáx) de la destrucción de células tumorales no fueron apreciablemente diferentes entre FUSE608 (círculo negro) y FUSE399 (triángulo invertido negro). Es importante destacar que, de manera similar al "desacoplamiento de citotoxicidad de la liberación de citocinas (IFNγ)" observado para FUSE608 pero no para el bsAb de referencia sin desacoplamiento CD3, FUSE399 (ver la Figura 77B), se observó que la regulación positiva de CD69, PD-1 y TIGIT de la superficie celular en las células T dentro de las PBMC mezcladas conjuntamente con MDA-MB-231 y el artículo de prueba también estaba desacoplada de la destrucción mediada por tumores. Es decir, FUSE608 fue aproximadamente 10x, 30x y 27x menos potente para inducir la regulación positiva de CD69, PD-1 y TIGIT, respectivamente, en comparación con FUSE399. Estos resultados indican que se observó un rango de concentración de FUSE608 en el que se puede lograr la máxima destrucción de células tumorales sin una máxima regulación positiva concomitante de CD69, PD-1 y TIGIT. No se observó un rango de concentración apreciable con propiedades similares para FUSE399. Esto puede tener importancia fisiológica porque se ha informado que CD69 (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30085193/), PD-1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341794/ y TIGIT (jitc.bmj.com/content/8/2/e000957) son marcadores de "agotamiento" de células T (y células NK) y se ha informado que el tratamiento de ratones portadores de tumores con anticuerpos antagonistas específicos para cada proteína media la inhibición del crecimiento tumoral.

No se asoció la destrucción de células tumorales no específicas, la liberación de IFNγ ni la inducción de CD69, PD-1 o TIGIT con el anticuerpo de control de isotipo negativo anti-HEL.

Las tablas resumidas de EC50, Emáx y AUC para cada artículo de prueba se muestran a continuación de las Figuras 77A-77E (Figura 77F).

Ejemplo 57

Como se muestra en la Figura 78, se examina la capacidad de FUSE399 (triángulo invertido negro) y FUSE608 (círculo negro) para inducir la destrucción mediada por células T CD8+ de un número constante (5000 células) de células ROR1+ MDA-MB-231 en un rango de números de células T CD8+ de 313 a 40.000. Esto permite calcular (a) la cantidad de células T necesarias para que un bsAb ROR1 x CD3 determinado induzca la destrucción mediada por células T de una cantidad dada de células tumorales ROR1+ (Figuras 78A y 78B) y (b) la cantidad promedio de células tumorales eliminadas por célula T, también denominada "destrucción en serie" (Figura 78C). La viabilidad de las células tumorales se midió después de 24 horas de cocultivo. Se analizaron relaciones efector a objetivo de 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 y 8:1. Se usaron FUSE397 (cuadrado negro) y anti-HEL (diamante gris) como artículos de prueba de control negativo. Se probaron dos células T CD8+ expandidas derivadas de donantes sanos distintas. El donante 1 y 2 se muestran en las figuras 78A y 21B, respectivamente. En relaciones E:T de 1:2 a 8:1 no se observó diferencia significativa en la eficacia de destrucción de células tumorales (Emáx). En relaciones E:T más bajas, FUSE608 inducía una mayor destrucción de células tumorales dependiente de ROR1 mediada por células T que FUSE399. Por ejemplo, para matar aproximadamente el 30 % de las células tumorales, FUSE399 requirió alrededor de 1100 células T, mientras que FUSE608 requirió alrededor de 450 células T. En

relaciones E:T muy bajas (p. ej., 1:16 y 1:8), cada célula T, en promedio, mató a más de una célula tumoral. Por ejemplo, a una relación E:T de 1:16 (312 células T añadidas al ensayo), FUSE608 se asoció con un 18 % de destrucción, lo que equivale a aproximadamente 900 células tumorales o aproximadamente 3 células tumorales muertas por célula T en 24 horas.

La Figura 78C es un gráfico de barras que ilustra la matanza en serie promedio asociada con FUSE399 y FUSE608 derivada de las células T de cada donante individual mostrado en la Figura 78A y la Figura 78B. El valor se informa como el número de células tumorales muertas por célula T durante un periodo de 24 horas. Se calculó como el valor promedio a partir de las relaciones E:T de 1:16 y 1:8. FUSE608 soporta la destrucción en serie de aproximadamente 3 células tumorales/célula T, mientras que este número es menor que 1,5 células tumorales/célula T para FUSE399. El fenómeno por el cual una sola célula T mata a más de una célula tumoral es especialmente importante en los tumores sólidos, donde el número de células T puede ser escaso, con relaciones E:T que varían de 1:2 a < 1:8.

Ejemplo 58

Como se muestra en la Figura 79, se analiza si FUSE608 indujo la destrucción de células espectadoras de tumores ROR1 negativos mezclados conjuntamente con tumores ROR1 positivos. Se ha informado que la destrucción de células espectadoras es inducida por receptores de destrucción, impactados por moléculas de adhesión y que la regulación positiva de ambos depende del IFNγ (journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183390). Por lo tanto, la evaluación de este parámetro es crítica para un bsAb CD3 tal como FUSE608 que ha sido diseñado genéticamente para desacoplar la citotoxicidad de la liberación de citocinas. Una

pregunta indirecta de alto nivel es: "¿FUSE608 induce suficiente liberación de IFNγ para soportar la destrucción de células espectadoras?"

Como tal, se examina la cinética por la cual FUSE608 (círculo negro) y FUSE399 (triángulo inverso negro; el bsAb de referencia sin desacoplamiento anti-ROR1 × CD3) indujeron la destrucción mediada por células T expandidas de células tumorales ROR1+ MDA-MB-231 (Figura 79A), células tumorales T-47D ROR1-negativas (Figura 79B) o una mezcla 1:1 de ambas células (Figuras 79C-79D). Se muestran los gráficos x-y de viabilidad tumoral en el eje y y el tiempo en el eje x. Para distinguir entre las células T-47D ROR1 positivas MDA-MB-231 y ROR1 negativas, las primeras fueron diseñadas para expresar RFP y las segundas para expresar eGFP. Como control negativo se utilizó FUSE397 (cuadrado negro).

Como se muestra en la Figura 79A y consistente con los resultados de nuestros ensayos de destrucción anteriores, en presencia de células T expandidas y MDA-MB-231 RFP solo, tanto FUSE399 como FUSE608 (pero no el artículo de prueba de control, FUSE397) indujeron una destrucción fuerte mediada por células T de ROR1+ MDA-MB-231 RFP con potencias ($IC50_{VIABILITY}$) y valores Imáx que no eran apreciablemente diferentes entre sí. También de acuerdo con nuestras observaciones previas, cuando las células eGFP T-47D ROR1-negativas se cocultivaron con células T expandidas, ni FUSE608 ni FUSE399 (o el artículo de prueba de control, FUSE397) indujeron pérdida de la viabilidad de eGFP T-47D (Figura 79B), lo que indica que la destrucción observada con MDA-MB-231 RFP dependía de ROR1.

Para examinar la destrucción de células espectadoras, se usaron células T expandidas como células efectoras en cocultivo con una mezcla 1:1 de MDA-MB-231 RFP ROR1-positiva y eGFP T-47D ROR1-negativas. Los artículos de prueba se probaron a múltiples concentraciones. Se muestra la concentración de 1 nM porque anteriormente se

observó que este nivel era la concentración más consistente en la que tanto FUSE608 como FUSE399 inducían una destrucción máxima similar de MDA-MB-231 pero diferían dramáticamente en la liberación de IFNγ. Es decir, a 1 nM, FUSE399 alcanzó la máxima liberación de IFNγ, pero la liberación de IFNγ por FUSE608 estuvo por debajo de su valor EC50 y, por lo tanto, dentro de la porción desacoplada de su curva.

Aquí, observamos que FUSE608 fue tan eficiente para inducir la destrucción directa de RFP MDA-MB-231 ROR1-positivas (Figura 79C) y la destrucción de células espectadoras de eGFP T-47D ROR1-negativas (Figura 79D) como FUSE399. Esto indica que aunque FUSE608 puede ser dosificada para una menor liberación de IFNγ que FUSE399 mientras se mantiene la destrucción máxima de los tumores ROR1+, FUSE608 todavía induce suficiente IFNγ para mediar en la destrucción de células espectadoras. No se observó pérdida en la viabilidad de ninguna de las células tumorales con el artículo de prueba de control negativo, FUSE397.

La destrucción de RFP MDA-MB-231 ROR1-positivas (Figura 79D) cuando se mezcló con eGFP T-47D ocurrió con una cinética similar a la observada sin mezcla conjunta de células eGFP T-47D (ver la Figura 79A). Se ha demostrado anteriormente que tal “destrucción directa” está mediada por perforina/granzima (journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183390). En contraste, la destrucción de células espectadoras del eGFP T-47D ROR1-negativas solo ocurrió cuando se mezcló junto con MDA-MB-231 y se retrasa con un

$IC50_{VIABILITY}$ de aproximadamente 36 horas (es decir, aproximadamente 22 horas después de la destrucción mediada por perforina/granzima de RFP MDA-MB-231). Este momento es consistente con un informe anterior que describe la destrucción de células

espectadoras dependiente de IFNγ inducida por bsAb CD3 (journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183390).

Ejemplo 59

Como se muestra en la Figura 80, se examina la capacidad de FUSE608 y el bsAb de referencia sin desacoplamiento anti-ROR1 × CD3, FUSE399, para mediar la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) en un modelo de xenoinjerto tumoral de ratón. A los ratones NSG se les implantó por vía subcutánea la línea celular TNBC ROR1+ humana, MDA-MB-231 y se reconstituyeron por vía intravenosa con células T humanas expandidas de un donante humano sano. Primero se examinaron las células T de varios donantes humanos para identificar aquellas con alorreactividad "de fondo" mínima contra MDA-MB-231 pero que inducían una potente destrucción de células tumorales dependiente de ROR1 cuando se mezclaban con FUSE399 o FUSE608 de una manera similar a la observada en la Figura 75.

Cuando el volumen tumoral alcanzó ~100 mm3, los ratones fueron tratados como tales: el grupo 1 (triángulo abierto inverso gris) recibió PBS, el grupo 2 (círculo abierto) recibió 3 mg/kg de FUSE608, el grupo 3 (círculo cerrado negro) recibió 0,3 mg/kg de FUSE608, el grupo 4 (triángulo cerrado gris) recibió 0,03 mg/kg de FUSE608 y el grupo 5 (triángulo inverso negro) recibió 3 mg/kg de FUSE399. El volumen tumoral y la supervivencia en función del tiempo se muestran en las figuras 80A y 80B, respectivamente. Los artículos de prueba se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana.

Observamos TGI altamente apreciable de FUSE608 con niveles de dosis de 0,3 mg/kg y 3 mg/kg asociados con una eficacia ligeramente mejor que 0,03 mg/kg.

Es importante destacar que todos los ratones tratados con FUSE608 sobrevivieron, mientras que todos los ratones tratados con FUSE399 murieron dentro de los primeros 5 días después del primer tratamiento debido a una toxicidad compatible con CRS.

Ejemplo 60

Genotecas de humanización de clones V_HH 5A1 y 2A11

Muchos tumores, tal como el cáncer de pulmón o de mama, muestran una mayor expresión de ROR1. ROR1, que normalmente sólo se expresa durante la embriogénesis a excepción de los hematógonos, juega un papel crucial en la proliferación, migración y supervivencia celular. Se obtuvieron dos variantes V_HH dirigidas a ROR1 (2A11 y 5A1) de una campaña de inmunización de *Camelus dromedarius* y contenían un supuesto puente disulfuro no canónico entre CDR1 y CDR3, que está presente en aproximadamente 30 % de todos los V_HH de HCAb de *Camelus dromedarius*. La posición de un puente disulfuro adicional depende de la especie de camélidos. En *Camelus dromedarius*, por ejemplo, se ubica entre los bucles CDR1 y CDR3, mientras que en los V_HH de llama, el bucle CDR3 se vincula al bucle CDR2. Los dos clones de V_HH tienen una identidad de secuencia de 71,3 %. A pesar de sus muchas propiedades deseables, el origen no humano de V_HH podría conducir al desarrollo de respuestas inmunitarias indeseables tras la administración terapéutica. Así, para ampliar la gama de aplicaciones terapéuticas, la humanización es un método prometedor. El primer informe integral que describe la humanización de V_HH fue publicado por Vincke *et al.* en 2009. En su estudio, propusieron dos métodos generales diferentes para la humanización de V_HH: injerto de CDR y recubrimiento (revestimiento). En el enfoque de injerto, las CDR de una V_HH se injertan sobre otro marco humano o humanizado (16A). En la estrategia de revestimiento, los residuos en las regiones marco del V_HH del camélido se sustituyen para imitar la secuencia de los V_H humanos.

Los supuestos bucles CDR se determinaron basados en una comparación estadística de V_HH realizada por Melarkode Vattekatte et al. En el contexto de la humanización, pueden producirse efectos indeseables tal como atenuación de la afinidad o alteración de la estabilidad de las proteínas debido a la modulación de las regiones marco. Por lo tanto, los llamados residuos de Vernier son de gran importancia para la especificidad y afinidad. Ellos subyacen a las CDR y pueden afectar potencialmente la conformación de los bucles CDR. Se ha demostrado que las retromutaciones de los residuos de Vernier al aminoácido no humano pueden restaurar la conformación original de los bucles CDR.

Para cada clon, se propusieron ocho posibles posiciones Vernier subyacentes a los bucles CDR basados en el trabajo de Vincke et al., Soler et al. y Sang et al., así como en la comparación con la estructura cristalina de un V_HH similar. El marco humano (FR) más cercano, que es IGHV3-23*01 en ambos casos, se identificó utilizando Ig-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/; consultado el 01.06.2022). Para el clon 2A11, la identidad de secuencia es 71,1 %, y para 5A1, es 64,9 %. Para identificar qué aminoácidos humanos deberían permitirse además del de camélido en cada posición de Vernier, se eligieron como plantillas los cinco marcos humanos con la mayor identidad de secuencia. Una diferencia característica entre el V_H humano y el V_H de camélido es el reemplazo de aminoácidos hidrofóbicos conservados en el FR2 (V42F; G49E; L50R; W52G). Los residuos clave conservados en FR2 no se alteraron, a excepción del glutamato a leucina en la posición 52, ya que esto incrementó la estabilidad de V_HH en el pasado.

Se realizaron sustituciones adicionales con posibles efectos beneficiosos para las propiedades V_HH. Por ejemplo, se pudo observar una agregación reducida para la mutación Q1E en la región marco 1 (FR1) y se ha demostrado que el intercambio a un residuo hidrofóbico en la posición 5 mejora la estabilidad. En FR4, el intercambio de triptófano a arginina puede mejorar

la solubilidad y reducir la agregación enmascarando residuos hidrófobos. De esta manera, 16 residuos fuera de los residuos Vernier fueron reemplazados en la genoteca de humanización 5A1. En la genoteca de humanización 2A11 se alteraron siete de esos residuos. La identidad mínima garantizada con el gen de la línea germinal humana IGHV3-23 con este enfoque de genoteca es de 75,3 % teniendo en cuenta las regiones CDR y de 87,6 % sin estas regiones.

Para la generación de genotecas de visualización de superficie de levadura, se utilizó el protocolo de Benatuil et al. Los insertos se obtuvieron mediante una reacción de ensamblaje PCR con cebadores que contenían codones degenerados. Fueron diseñados para permitir los aminoácidos humanos seleccionados y el residuo de camélido en las posiciones de Vernier (Figura 72). La visualización de superficie de levadura aprovecha la maquinaria de modificación postraduccional eucariota. El plegamiento en el entorno oxidante del retículo endoplasmático (ER) y la glicosilación mejoran la presentación de proteínas nativas. Además, las chaperonas y las foldasas ayudan en la presentación de proteínas más complejas y correctamente plegadas. Esto también permite la presentación superficial de proteínas multidominio que contienen múltiples puentes disulfuro. Esto hace que YSD sea un método eficiente para el cribado de genotecas de anticuerpos. La función de las proteínas mostradas puede determinarse de manera rápida y cuantitativa mediante el uso de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Se usó el cribado basado en FACS a lo largo de varias rondas para encontrar variantes funcionales.

Optimización simultánea de Vernier y maduración de afinidad basada en FUS497

El clon computacional humanizado FUSE497, mostró propiedades de expresión mejoradas en comparación con el clon 5A1 parental. Por lo tanto, este clon se utilizó como plantilla para una campaña adicional de humanización. La genoteca basada en FUSE497 (Figura 73) permite la optimización de los residuos de Vernier, el aumento

potencial de la proporción de residuos humanos y la maduración de la afinidad mediante la aleatorización de una posición en CDR3 con un codón NNS degenerado. Se introdujeron nuevos residuos putativos de Vernier en las posiciones marcadas en naranja respecto a las genotecas anteriores. Por un lado, esto permite mutaciones inversas en posibles posiciones de Vernier y, por otro lado, permite un aumento en la homología de secuencia con el gen de la línea germinal humana IGHV-3-23*01 en comparación con la plantilla FUSE497. Fueron identificados como se describió anteriormente.

El inserto para la genoteca se generó con cebadores degenerados. Se realizaron doce PCR diferentes con distintos codones NNS en la región CDR3 y se mezclaron en una relación estequiométrica.

Generación de genotecas de levaduras

La generación de genotecas de levaduras se realizó de acuerdo al protocolo publicado por Benatuli et al. en 2010. Se inocularon 50 ml de medio YPD con *S. cerevisiae* EBY100 y se incubaron durante la noche a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente, se inoculó 1 l de medio YPD con el precultivo hasta una OD_{600} inicial de 0,3 y se incubó a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una OD_{600} de 1,6. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 3 min. Después de lavarlas dos veces con agua helada y una vez con regulador de electroporación helado (sorbitol 1 M; 1 mM $CaCl_2$), las células se recogieron en 250 ml de regulador de resuspensión (0,1 M LiAc; 10 mM DTT) y se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante 30 min. Finalmente, se lavaron cuatro veces con regulador de electroporación helado, se recogieron en 10 ml de regulador de electroporación y se mantuvieron en hielo hasta la electroporación. Para cada electroporación, se añadieron a 400 µl de la solución electrocompetente EBY100, inserto de 12 µg y 4 µg de vector restringido (pCT digerido por Bamh I y Nhe I). Después de la transferencia a una cubeta de electroporación helada, la mezcla

se incubó durante 5 min en hielo. Posteriormente, las células se electroporaron a 200 Ω, 2,5 kV, 25 µF, se transfirieron a 8 ml de una mezcla 1:1 de sorbitol 1 M:YPD y se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante 1 h. Para determinar el tamaño de la genoteca, se preparó una serie de diluciones hasta una dilución de 10-9. La dilución 10^{-4} a 10^{-9} se pusieron en placas selectivas de agar SD. Después de una incubación de 3 días a 30 °C, se calcularon las colonias para determinar el número de células transformadas. El resto de las células regeneradas se transfirieron a 1 l de medio SD selectivo (5,4 g/l Na_2HPO_4; 8,6 g/L NaH_2PO_4; 20 g/L de glucosa; 5 g/l de sulfato de amonio; 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura; 5 g/l de ácidos Bacto Casamino (-Trp)) y se incubaron durante 2 días a 30 °C y 200 rpm.

Inducción de expresión génica para YSD

La presentación superficial de los V_HH fue mediada vía Aga2p (Figura 75). La expresión génica de esas proteínas ligadas fue controlada por el promotor Gal1. Por lo tanto, la expresión de la proteína de fusión Aga2p es inducida por galactosa en el medio de cultivo. Para comenzar a mostrar expresión génica, las células se cultivaron en medio SG (5,4 g/l Na_2HPO_4; 8,6 g/l de NaH_2PO_4; 20 g/l de galactosa; 5 g/l de sulfato de amonio; 1,7 g/l de base de nitrógeno de levadura; 5 g/l de ácidos Bacto Casamino (-Trp)) o una mezcla de medio SG:SD 4:1 a 30 °C y 200 rpm durante 12 a 48 h.

Sin querer limitarse por cualquier teoría particular, creemos que nuestros TCE ROR1 brindan un índice terapéutico superior y un perfil de seguridad asociado con riesgos reducidos de CRS y TLS, la capacidad de administrar dosis más altas, evitar la infusión continua y potencialmente mediar una mejor eficacia en tumores sólidos.

En la Descripción detallada líneas arriba se describen diversas modalidades de la invención. Aunque estas descripciones describen directamente las modalidades anteriores, se entiende que los expertos en la técnica pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las

modalidades específicas mostradas y descritas en la presente. Cualquier tal modificación o variación de este tipo que se encuentre dentro del ámbito de esta descripción está destinada a ser incluida también en ella. A menos que se indique específicamente, es la intención de los inventores que las palabras y frases en la especificación y las reivindicaciones tengan los significados ordinarios y acostumbrados a los expertos en la(s) técnica(s) aplicable(s).

La descripción anterior de diversas modalidades de la invención conocidas por el solicitante en este momento de presentación de la solicitud se ha presentado y está destinada a fines de ilustración y descripción. La presente descripción no pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa descrita y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Las modalidades descritas sirven para explicar los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir que otros expertos en la técnica utilicen la invención en diversas modalidades y con diversas modificaciones según sean adecuadas para el uso particular contemplado. Por lo tanto, se pretende que la invención no se limite a las modalidades particulares descritas para llevar a cabo la invención.

Si bien las modalidades particulares de la presente invención se han mostrado y descrito, será evidente para los expertos en la técnica que, basados en las enseñanzas de la presente, los cambios y modificaciones pueden hacerse sin apartarse de la presente invención y sus aspectos más amplios y, por lo tanto, las reivindicaciones adjuntas son para abarcar dentro de su alcance todos tales cambios y modificaciones que están dentro del verdadero espíritu y alcance de la presente invención. Como se usa en la presente memoria, el término ‘‘que comprende’’ o ‘‘comprende’’ se usa en referencia a composiciones, métodos y componente(s) respectivo(s) de estos, que son útiles para una modalidad, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, sean útiles o no. Se entenderá por los expertos en la técnica que, generalmente, los términos usados en la presente están previstos,

generalmente, como términos ‘‘abiertos’’ (p. ej., el término ‘‘que incluye’’ debe interpretarse como ‘‘que incluye, pero no se limita a’’, el término ‘‘que tiene’’ debe interpretarse como ‘‘que tiene al menos’’, el término ‘‘incluye’’ debe interpretarse como ‘‘incluye, pero no se limita a’’, etc.). Aunque el término abierto ‘‘que comprende’’, como sinónimo de términos tales como incluir, contener o tener, se usa en la presente para describir y reivindicar la invención, la presente invención, o modalidades de esta, pueden describirse alternativamente usando términos alternativos tal como ‘‘que consiste en’’ o ‘‘que consiste esencialmente en’’.

A menos que se indique de cualquier otra manera, los términos ‘‘un/una’’ y ‘‘el/la’’ y ‘‘los/las’’ y referencias similares usadas en el contexto de la descripción de una modalidad particular de la solicitud (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) pueden interpretarse para abarcar tanto el singular como el plural. La recitación de intervalos de valores en la presente está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango. A menos que se indique de cualquier otra manera en la presente, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se recitara individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquier ejemplo o del lenguaje ilustrativo (por ejemplo, ‘‘tal como’’) proporcionado con respecto a ciertas modalidades en la presente pretende únicamente dar claridad a la solicitud y no plantea ninguna limitación al alcance de la solicitud reivindicada de cualquier otra manera. La abreviatura ‘‘p. ej.’’ se deriva del latín exempli gratia, y se usa en la presente para indicar un ejemplo no limitante. Así, la abreviatura ‘‘p. ej.’’ es sinónimo del término ‘‘por ejemplo’’. Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para llevar a la práctica la solicitud.

“Opcional” u “opcionalmente” significan que la circunstancia descrita posteriormente puede o no ocurrir, de manera que la descripción incluye instancias donde dicha circunstancia ocurre e instancias donde no ocurre.

Las agrupaciones de elementos alternativos o modalidades de la presente divulgada en la presente no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser referido y reivindicado individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentran en la presente. Uno o más miembros de un grupo pueden ser incluidos o eliminados de un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce cualquier inclusión o eliminación de este tipo, se considera que la especificación contiene el grupo modificado cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.