

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 351**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2016 PCT/US2016/013292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16115275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2016 E 16737836 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3244907**

54 Título: **Máscaras de enlace peptídico de proteínas de unión a CTLA4**

30 Prioridad:

**13.01.2015 US 201562102966 P**

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

**26.10.2020**

73 Titular/es:

**CITY OF HOPE (50.0%)  
1500 East Duarte Road  
Duarte, CA 91010-3000, US y  
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY AND HEALTH  
SYSTEM, INNOVATION PILLAR (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, JOHN y  
RODECK, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**FLORES DREOSTI, Lucas**

ES 2 789 351 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Máscaras de enlace peptídico de proteínas de unión a CTLA4

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/102,966, presentada el 13 de enero de 2015.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0002]** El cáncer es la segunda causa de muerte principal en Estados Unidos, y provoca más muertes que las cinco causas principales siguientes (enfermedad crónica respiratoria, apoplejía, accidentes, enfermedad de Alzheimer y diabetes). Aunque se han hecho grandes avances, especialmente con terapias dirigidas, el pronóstico del cáncer en estado avanzado, incluido el melanoma y el cáncer de próstata, sigue dejando que desear. Recientemente, la inmunoterapia ha reaparecido como una opción terapéutica viable e interesante para malignidades en estado avanzado. En concreto, ahora se reconoce que una característica del cáncer es la inmunoevasión y tras realizar importantes esfuerzos se han identificado objetivos y se han desarrollado terapias para estos objetivos con el fin de volver a activar el sistema inmunitario para reconocer y tratar el cáncer. De hecho, el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, ipilimumab, por primera vez, ha permitido la supervivencia a largo plazo de los pacientes que sufren un melanoma maligno de grado III/IV. El ipilimumab es un antagonista de control inmunitario e interrumpe la inhibición de las células T mediante el bloqueo de CTLA-4 (Korman, A., *et al.*, 2005. "Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA-4 antibodies". *Current Opinion in Investigational Drugs* 6:582-591). Desafortunadamente, el ipilimumab también provoca la activación generalizada (no específica del tumor) de respuestas inmunitarias dependientes de células T que provocan efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario que pueden ser mortales y suelen limitar la dosis (Weber, J.S., *et al.*, 2008. "Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma". *Journal of Clinical Oncology* 26:5950-5956). Estos incluyen la enterocolitis, la dermatitis, la hipofisitis, la uveítis, la hepatitis, la nefritis y la muerte. La enterocolitis es la toxicidad principal más común (afecta a aproximadamente un 20 % de los pacientes). Los riesgos de seguridad graves relacionados con las reacciones adversas mediadas por el sistema inmunitario hicieron que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobara el ipilimumab con una Estrategia de Evaluación y Mitigación del Riesgo (REMS, por sus siglas en inglés). Recientemente, se ha demostrado que la administración simultánea de ipilimumab y un segundo modulador de control del sistema inmunitario que se dirige a la PD1 (p. ej., nivolumab) aumenta considerablemente la eficacia de la inmunoterapia del melanoma en comparación con el ipilimumab solo. Sin embargo, este aumento se asoció a frecuencias mayores de efectos adversos de grado 3/4, que afectaban a más del 50 % de los pacientes que recibían un tratamiento combinado (Wolchok, J.D., *et al.* 2013. "Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma". *N Engl J Med*). Estos descubrimientos ilustran la necesidad urgente en la técnica de estrategias para aliviar los efectos secundarios asociados a la activación del sistema inmunitario, al tiempo que se conserve la actividad de moduladores de control del sistema inmunitario contra la enfermedad maligna. En el documento US 2014/024810 se expone una proteína recombinante de unión a CTLA-4 que comprende un scFv anti-CTLA-4 que comprende un dominio de unión a CTLA-4; un péptido de enmascaramiento de CTLA-4 y una secuencia de enlace peptídico escindible que incluye un sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz 9. En la presente memoria, se dan a conocer composiciones y métodos que abordan estos y otros problemas de la técnica.

40 BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

**[0003]** En un primer aspecto, se da a conocer una proteína recombinante de unión a CTLA-4, que comprende:

- (i) un dominio de unión a CTLA-4;
- (ii) un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4; y
- 45 (iii) un enlace peptídico escindible que conecta dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con dicho dominio de unión a CTLA-4,

donde dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 comprende una secuencia que presenta o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.

50 **[0004]** En un segundo aspecto, se da a conocer un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el primer aspecto.

**[0005]** En un tercer aspecto, se da a conocer un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 que incluye dos dominios de proteína de unión idénticos, comprendiendo cada uno de los dominios de proteína de unión una proteína de unión a CTLA-4 de acuerdo con el primer aspecto y un dominio de dimerización unido covalentemente al dominio de unión a CTLA-4, donde los dominios de proteína de unión están unidos entre sí.

**[0006]** En otro aspecto, se da a conocer una proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el primer aspecto para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad mediada por CTLA-4 en un sujeto que lo

necesita. El método incluye la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el primer aspecto o de una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el tercer aspecto.

- 5 **[0007]** En otro aspecto, se da a conocer una composición farmacéutica que incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable y una proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el primer aspecto o un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con el tercer aspecto.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

##### **[0008]**

10 Figura 1: Diseño y modo de acción de una mLcn2 antagonista de CTLA-4 enmascarada de forma reversible (también denominada en la presente memoria proteína de unión a CTLA-4). En tejidos normales, el antagonista de CTLA-4 sigue enmascarado y no se une a células diana de expresión de CTLA-4. En el entorno del tumor, la MMP9 asociada al tumor escinde el enlace (enlace peptídico escindible) entre el péptido de enmascaramiento (péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4) y la mLcn2 (dominio de unión a CTLA-4) seguido de la disociación de la máscara (péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4) y el bloqueo de CTLA-4 en el sitio del tumor.

15 Figura 2A y 2B: Identificación y caracterización de un péptido (péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4) que bloquea la unión de la mLcn2 (dominio de unión a CTLA-4) a CTLA-4. La figura 2A es un gráfico que indica que el fago que expresa el péptido 16 unido a superficie muestra mayor unión a la mLcn2-Fc inmovilizada (columna izquierda) en comparación con la mLcn2-Fc previamente complejada con CTLA-4-Fc (columna central) y el control PBS (columna derecha), conforme a lo determinado por ELISA (triplicados). La figura 2B es un gráfico que muestra trazas de resonancia de plasmones superficiales de analito mLcn2-Fc que fluían sobre el péptido 16 de ligando inmovilizado en un chip CM5.

20 Figura 3A-3D: Diseño y activación de la mLcn2-Fc enmascarada covalentemente *in vitro*. La figura 3A es un dibujo de enlace que contiene sustrato de MMP9 (*enmascarado*) y enlace *Mxx9* no escindible; secuencias de sustrato de proteasa en recuadro rojo. Leyenda de secuencias: GGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:46); GGSVPGSGSSGG (SEQ ID NO:47). La figura 3B es un gráfico de análisis SEC que muestra la unión de CTLA-4 solo a constructos de mLcn2-Fc desenmascarados. La figura 3C es un gráfico de SPR de mLcn2-Fc enmascarada, desenmascarada y tratada con MMP9 y no modificada de unión a CTLA-4: *Parte superior*: Sensorgrama de analitos no modificados (azul), desenmascarados y tratados con MMP9 (verde) y de mLcn2-Fc enmascarados (rojo) a una concentración de 3000 nM. *Parte inferior*: Sensorgramas de analitos enmascarados (izquierda) y de mLcn2-Fc enmascarados (derecha) a concentraciones de 3000; 1000; 300; 100; y 30 nM. La figura 3D es un gráfico del análisis citométrico de flujo de constructos de mLcn2-Fc que se unen a linfocitos T de ratón. mLcn2-Fc no modificados, enmascarados y desenmascarados marcados con AlexaFluor(AF)647 fueron incubados con esplenocitos de ratones *Foxp3gfp/KI DBA/2*. Las células T reguladoras fueron reguladas y analizadas. Los valores P basados en análisis por cuadruplicado fueron calculados en relación con el control neg. (AF647). El enmascaramiento de la mLcn2-Fc dio lugar a una unión considerablemente reducida a las células en comparación con la mLcn2-Fc no modificada ( $p = 0,004$ ) y la mLcn2-Fc desenmascarada ( $p = 0,003$ ).

25 Figura 4: Detección *in vivo* de variantes de mLcn2 (variantes de proteína de unión a CTLA-4) en tejidos tumorales B16. Obsérvese la tinción de membrana de los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, por sus siglas en inglés) que expresan bien CD4 o CD8 tanto mediante constructos de mLcn2 enmascarados como desenmascarados (pretratados con MMP9), que indica la actividad de MMP9 en tumores. El control se refiere a mLcn2 enmascarada con enlace no escindible (*Mxx9*) y, como era de esperar, no muestra reactividad.

30 Figura 5: Unión de variantes de mLcn2 de antagonista de CTLA-4 a células en la glándula pituitaria. Cabe señalar que, a diferencia del entorno de tumor, la mLcn2 enmascarada no se unió a constituyentes de tejido normales. En cambio, la mLcn2 desenmascarada y pretratada con MMP9 sin máscaras N-terminales se unió igualmente bien a los pituicitos.

35 Figura 6: Variantes de enlace (enlace peptídico escindible) diseñadas para optimizar la liberación de máscara tras la escisión de enlace proteolítico. Leyenda de secuencias: GGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:46); GGSVPLSLY (SEQ ID NO:48); GGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:49); SGGSGGGVPLSLYSGG (SEQ ID NO:50); SGGSGGGVPLSLYSGG (SEQ ID NO:51).

40 Figura 7: Modelo de dibujo de proantagonista de CTLA-4 con proteasa activada. Se formó un proantagonista uniendo covalentemente un péptido de enmascaramiento (contorno en bucle) al extremo N-terminal de mLcn2 (forma de u) a través de un enlace flexible (líneas grises) que contiene sustrato de MMP-9 (resaltado). La mLcn2 enmascarada fue clonada en el núcleo estructural de IgG1 humana (óvalos grises). *Inserción*: La máscara de péptido (enlace peptídico escindible) reside, preferentemente, en la cavidad de unión de mLcn2; la máscara es liberada tras la escisión de MMP9 del enlace de sustrato.

Figura 8A-8D: Diseño y activación de la mLcn2-Fc enmascarada *in vitro*. La figura 8A es un dibujo de secuencias de enlace que contiene sustrato de MMP9 *Enmascarado* y enlace *Mxx9* no escindible (recuadro rojo). Leyenda de secuencias: GGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:46); GGSVPGSGSSGG (SEQ ID NO:47). La figura 8B es un gráfico de análisis de cromatografía de exclusión por tamaños del antígeno CTLA-4 que se une a los constructos de mLcn2-Fc. Apo CTLA-4 (traza azul) eluye de la columna Superdex 200 con 13,0 mL. Apo mLcn2-Fc enmascarada (rojo), desenmascarada y mLcn2-Fc Mxx9 (no mostrado) eluyen con ~12,7 mL. CTLA-4 incubado con máscara (morado) o mLcn2-Fc Mxx9 (negro) eluye con 12,85 mL. mLcn2-Fc desenmascarada incubada con CTLA-4 eluye principalmente con 11,3 mL (verde), consistente con un complejo heterodimérico. La figura 8C es un gráfico que muestra la resonancia de plasmones superficiales de mLcn2-Fc enmascarada, desenmascarada y no modificada de unión a CTLA-4. CTLA-4 extracelular monomérica fue inmovilizada con baja densidad en un chip CM5. *Parte superior*: Sensorgrama sustraído de referencia de analitos de mLcn2-Fc no modificados (azul), desenmascarados (verde) y enmascarados (rojo) a una concentración de 3000 nM. *Parte inferior*: Sensorgramas sustraídos de referencia de analitos de mLcn2-Fc enmascarados (izquierda) y desenmascarados (derecha) a concentraciones de 3000; 1000; 300; 100; y 30 nM. La figura 8D es un gráfico que muestra el análisis citométrico de flujo de constructos de mLcn2-Fc que se unen a células T murinas reguladoras. mLcn2-Fc no modificados, enmascarados y desenmascarados marcados con Alexa Fluor 647 fueron incubados con esplenocitos de ratones Foxp3gfp/KI DBA/2 y analizados con citometría de flujo. Las células T reguladoras fueron aisladas mediante dispersión hacia adelante y lateral, tinción DAPI y fluorescencia GFP+. Se realizaron cuatro experimentos en dos bazo murinos y se calcularon las medias  $\pm$  s.d. Se calcularon los valores P para observar la diferencia en la tinción con AF647. La mLcn2-Fc enmascarada presentaba una unión considerablemente reducida a las células en comparación con la mLcn2-Fc no modificada ( $P = 0,004$ ) y la mLcn2-Fc desenmascarada ( $P = 0,003$ ).

Figura 9: Biodistribución de constructos de mLcn2-Fc *in vivo*. Se inyectaron 100  $\mu$ g de constructo de mLcn2-Fc indicado en ratones naive (A-C) *in vivo* y se recogieron muestras de tejido 48 horas después de la dosis. Se tiñeron criosecciones para CD4 o CD8 (gris medio) e IgG humana (gris claro) a partir del timo (A), bazo (B) y glándula pituitaria (C, IgG solo). (D) Ratones con melanoma fueron inyectados como se ha indicado anteriormente y se recogieron muestras tumorales 72 horas después de la dosis. Tinción nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) mostrada en gris oscuro.

Figura 10A: Análisis SPR. CTLA-4-Fc dimérico fue inmovilizado con densidad media en un chip CM5. Se utilizó una serie de analitos de mLcn2-Fc monomérica de 3-1000 nM (parte superior) y de mLcn2-Fc dimérica de 3-300 nM (parte inferior) para los análisis cinéticos. La mLcn2 monomérica presentaba una  $k_a = 3,6E4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y una  $k_d = 2,0E-4 \text{ s}^{-1}$  para CTLA-4. La mLcn2-Fc dimérica presentaba una  $k_a = 1,0E4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; la  $k_d$  no pudo determinarse, puesto que sobrepasaba las limitaciones del instrumento. La concentración de analitos es 1000; 300; 30; y 3 nM.

Figura 10B: Resultados de ELISA de biblioteca de bacteriófago después de tres rondas de enriquecimiento. Se inmovilizaron los pocillos de una placa de 96 pocillos con mLcn2-Fc (columna izquierda), con mLcn2-Fc previamente complejada con CTLA-4 (columna central) o con PBS (columna derecha). Cada condición se realizó por triplicado.

Figura 10C: Análisis de citometría de flujo de células de insecto *Tni* inducidas para expresar temporalmente CTLA-4-Fc humano. Se tiñeron las células con variantes de mLcn2-Fc conjugadas con Alexa Fluor-647 y se regularon para la dispersión hacia adelante / lateral, DAPI, tamaño de singulete (ancho de pulsos) y APC. Las células no infectadas teñidas con mLcn2-Fc se muestran en gris como control negativo. Ambas variantes, mLcn2-Fc y mLcn2-Fc desenmascarada mostraron unión a células, mientras que mLcn2-Fc enmascarada mostró poca unión.

Figura 11: Máscara covalente activada por tumor para Lcn2.

Figuras 12A-12D: 18 min de incubación de sustrato. El fago que expresa el péptido unido a superficie [secuencia indicada en la barra de título de cada gráfico] muestra mayor unión a la Lcn2-Fc inmovilizada (columna izquierda) en comparación con la Lcn2-Fc previamente complejada con CTLA4-Fc (columna central) o el control PBS (columna derecha) mediante ELISA. La figura 12A es un gráfico que muestra el clon 1 - YGLGFNF (SEQ ID NO:52); la figura 12B es un gráfico que muestra el clon 2 - RIDETLQ (SEQ ID NO:53); la figura 12C es un gráfico que muestra el clon 3 - FTPWPEA (SEQ ID NO:54); y la figura 12D es un gráfico que muestra el clon 4 - WPEWDLW (SEQ ID NO:55).

Figuras 13A-13D: 18 min de incubación de sustrato. El fago que expresa el péptido unido a superficie [secuencia indicada en la barra de título de cada gráfico] muestra mayor unión a la Lcn2-Fc inmovilizada (columna izquierda) en comparación con la Lcn2-Fc previamente complejada con CTLA4-Fc (columna central) o el control PBS (columna derecha) mediante ELISA. La figura 13A es un gráfico que muestra el clon 6 - EKWFRFM (SEQ ID NO:56); la figura 13B es un gráfico que muestra el clon 8 - YLELMHS (SEQ ID NO:57); la figura 13C es un gráfico que muestra el clon 12 - SVLPPFM (SEQ ID NO:58); la figura 13D es un gráfico que muestra el clon 16 - WSPLPFM (SEQ ID NO:59).

Figura 14A: mLCN2 vs. Pep16. Resonancia de plasmones superficiales de analito mLCn2 fluido sobre el péptido 16 de ligando inmovilizado en un chip CM5. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.  $K_D = 4,6\mu\text{M}$

5 Figura 14B: mLCN2-Fc vs. Pep12. Resonancia de plasmones superficiales de analito mLCn2 fluido sobre el péptido 12 de ligando inmovilizado en un chip CM5. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes.  $K_D = 3,4\mu\text{M}$

Figura 15: Se inyectaron 100  $\mu\text{g}$  de constructo de mtLCN2-Fc indicado en ratones naive *in vivo* y se recogieron muestras de tejido 48 horas después de la dosis. Se tiñeron criosecciones para CD4 o CD8 (gris medio) e IgG humana (gris claro) a partir del timo.

10 Figura 16: Se inyectaron 100  $\mu\text{g}$  de constructo de mtLCN2-Fc indicado en ratones naive *in vivo* y se recogieron muestras de tejido 48 horas después de la dosis. Se tiñeron criosecciones para CD4 o CD8 (gris medio) e IgG humana (gris claro) a partir del bazo.

15 Figura 17: Se inyectaron 100  $\mu\text{g}$  de constructo de mLCn2-Fc indicado en ratones con melanoma *in vivo* y se recogieron muestras tumorales 72 horas después de la dosis. Se tiñeron criosecciones para CD4 o CD8 (gris medio) e IgG humana (gris claro). Obsérvese la tinción de membrana de los TIL tanto mediante constructos de mLCn2 enmascarados como desenmascarados (pretratados con MMP9), que indica la actividad de MMP9 en tumores. El control se refiere a mLCn2 enmascarada con enlace no escindible (Mxx9) y, como era de esperar, no muestra reactividad. Tinción nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) mostrada en gris oscuro.

20 Figura 18: Se inyectaron 100  $\mu\text{g}$  de constructo de mLCn2-Fc indicado en ratones naive *in vivo* y se recogieron muestras de tejido 48 horas después de la dosis. Se tiñeron criosecciones para IgG humana (gris claro). Cabe señalar que, a diferencia del entorno de tumor, la mLCn2-Fc enmascarada no se unió a constituyentes de tejido normales. En cambio, la mLCn2-Fc desenmascarada y pretratada con MMP9 sin máscaras N-terminales se unió igualmente bien a los pituiticos.

25 Figura 19A-19B: Unión de constructos de uPa-mLCn2-Fc enmascarados y desenmascarados a CTLA-4. La figura 19A es un esquema que muestra que la mLCn2-Fc enmascarada fue creada de tal forma que el sustrato de proteasa fuera mutado a *LSGRSDNH*, un sustrato conocido para el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPa). La figura 19B es un gráfico que muestra la absorbancia a 230 nm. Se incubó el uPa-mLCn2-Fc enmascarado con o sin enzima uPa recombinante durante 12 horas a 37 °C. Se mezclaron reacciones con CTLA4-Fc y se analizaron mediante análisis SEC.

30 Figura 20: Citometría de flujo de constructos de CTLA4-bp-Fc a linfocitos humanos CD4+. Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés) con constructos de CTLA4-bp-Fc marcados con AF647 o con AF647-Cetuximab como control de IgG1. Se analizaron las células mediante citometría de flujo y se regularon en células de CD4+, en las que se registró la fluorescencia media de AF647. Se realizaron las muestras por triplicado y se informa de trazas representativas.

## 35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

### DEFINICIONES

**[0009]** Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria presentan el significado convencional dentro de la técnica química y biológica. Las estructuras químicas y las fórmulas establecidas en el presente documento se forman de acuerdo con las normas estándar de valencia química conocidas en las técnicas químicas.

40 **[0010]** Una "célula", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula que lleva a cabo funciones metabólicas u otras funciones suficientes para conservar o replicar su ADN genómico. Las células pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, incluidos, por ejemplo, la presencia de una membrana intacta, la tinción con un colorante en concreto, la capacidad de producir descendencia o, en el caso de un gameto, la capacidad de combinarse con un segundo gameto para producir un descendiente viable. Las células pueden incluir células procariotas y eucariotas. Las células procariotas incluyen, sin carácter limitativo, las bacterias. Las células eucariotas incluyen, sin carácter limitativo, las células de levadura y las células obtenidas de plantas y animales; por ejemplo, las células de mamífero, de insecto (p. ej., spodoptera) y las células de humano. Las células pueden ser útiles cuando son naturalmente no adherentes o se han tratado para no adherirse a las superficies; por ejemplo, mediante tripsinización.

50 **[0011]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos, donde el polímero puede, opcionalmente, conjugarse con una unidad que no consiste en aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos es un mimetismo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y a polímeros de aminoácidos de origen no natural. El término "proteína de fusión" hace referencia a una proteína quimérica que codifica dos o varias secuencias de proteínas independientes que se expresan, de forma recombinante, como una unidad única.

**[0012]** El término "peptidil" y "unidad peptidil" se refiere a un péptido monovalente.

**[0013]** El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y mimetismos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente; por ejemplo, la hidroxiprolina, el  $\gamma$ -carboxiglutamato y la O-fosfoserina. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que presentan la misma estructura básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R; por ejemplo, la homoserina, la norleucina, el sulfóxido de metionina y la metionina metil sulfonio. Tales análogos presentan grupos R modificados (p. ej., la norleucina) o cadenas principales de péptido modificadas, pero mantienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los mimetismos de aminoácido hacen referencia a compuestos químicos que presentan una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de manera similar a la de un aminoácido de origen natural.

**[0014]** En el presente documento, puede que se haga referencia a los aminoácidos, bien mediante sus tres símbolos de letras comúnmente conocidos, bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. A los nucleótidos, de la misma manera, puede que se les haga referencia mediante sus códigos de letra única comúnmente aceptados.

**[0015]** El término "variantes modificadas de forma conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácido como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico concretas, con el término variantes modificadas de forma conservadora se hace referencia a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a las secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de secuencias de ácido nucleico funcionalmente idénticas codifican cualquier residuo de aminoácidos determinado. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón puede ser alterado por cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas," que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciosa posible del ácido nucleico. Cualquier experto en la materia reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (salvo AUG, que es generalmente el único codón para la metionina, y TGG, que es generalmente el único codón para el triptófano) puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a secuencias de sonda reales.

**[0016]** En lo referente a las secuencias de aminoácidos, cualquier experto en la materia reconocerá que las adiciones, deleciones o sustituciones individuales a una secuencia de proteínas, ácido nucleico, péptido o polipéptido que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" donde la alteración da lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica, son bien conocidas las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservadora se suman a las variantes polimórficas, los homólogos interespecíficos y los alelos de la invención, pero no los excluyen.

**[0017]** Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras intercambiables: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, *Proteins* (1984)).

**[0018]** El término "ácido nucleico" hace referencia a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena simple o doble, y sus componentes. El término "polinucleótido" hace referencia a una secuencia lineal de nucleótidos. El término "nucleótido" hace referencia, normalmente, a una unidad única de un polinucleótido, es decir, un monómero. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o versiones modificadas de los mismos. Algunos ejemplos de polinucleótidos contemplados en la presente memoria incluyen ADN de cadena simple y doble, ARN de cadena simple y doble (incluyendo siARN) y moléculas híbridas que presentan mezclas de ADN y ARN de cadena simple y doble. El término ácido nucleico tal y como se emplea en el presente documento también se refiere a ácidos nucleicos que presentan la misma estructura química básica que un ácido nucleico de origen natural. Tales análogos presentan azúcares modificados y/o sustituyentes de anillo modificados, pero mantienen la misma estructura química básica que el ácido nucleico de origen natural. Un mimetismo de ácido nucleico hace referencia a compuestos químicos que presentan una estructura que es diferente a la estructura química general de un ácido nucleico, pero que funcionan de manera similar a la de un ácido nucleico de origen natural. Algunos ejemplos de tales análogos incluyen, sin carácter limitativo, los fosforotiolatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, quiral-metil fosfonatos, 2-O-metil ribonucleótidos y ácidos peptidonucleicos (APN).

**[0019]** El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima en una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idénticos se dan en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

**[0020]** Los términos "idéntico/a/os/as" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que presentan un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos igual (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de identidad en relación con una región específica, por ejemplo, de las secuencias de polipéptido completas de la invención o dominios individuales de los polipéptidos de la invención), cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o una región designada medida mediante la utilización de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Tales secuencias se consideran, por lo tanto, "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad se da en una región que mide al menos 50 nucleótidos o, más preferiblemente, en una región que mide entre 100 y 500 o 1000 o más nucleótidos.

**[0021]** Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia sirve de secuencia de referencia, con la que se comparan secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si procede, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. Pueden utilizarse parámetros de programa por defecto o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias, a continuación, calcula el porcentaje de identidades de secuencia en relación con las secuencias de ensayo relativas a la secuencia de referencia, a partir de los parámetros de programa.

**[0022]** Una "ventana de comparación", tal y como se emplea en el presente documento, incluye referencia a un segmento de cualquiera entre el número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en, p. ej., una secuencia completa o entre 20 y 600, aproximadamente entre 50 y aproximadamente 200, o aproximadamente 100 y aproximadamente 150 aminoácidos o nucleótidos, donde una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias sean alineadas de forma óptima. En la técnica, también son bien conocidos los métodos de alineamiento de secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith-Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482C, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman-Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el método de similitud de Pearson-Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE. UU.* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de *software* Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wisconsin), o mediante el alineamiento manual y la inspección visual (véase, p. ej., Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" (suplemento 1995)).

**[0023]** Un ejemplo de un algoritmo adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de secuencia es el algoritmo BLAST y el algoritmo BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. El *software* para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Este algoritmo implica, en primer lugar, identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden con o cumplen alguna puntuación umbral T con valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se menciona como el umbral de puntuación de palabra próxima (Altschul *et al.*, *supra*). Estas coincidencias de palabras iniciales próximas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar pares de alta puntuación más largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que la puntuación de alineamiento acumulativa pueda aumentarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan mediante la utilización, para las secuencias de nucleótidos, de los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos que no se emparejan; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X a partir de un valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa es cero o inferior, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por

defecto una longitud de onda (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de onda de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

**[0024]** El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría al azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con respecto al ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0,2, más preferiblemente, inferior a aproximadamente 0,01 y, siendo lo más preferible, inferior a aproximadamente 0,001.

**[0025]** Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos consiste en que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico presenta reactividad cruzada inmunológicamente con los anticuerpos generados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por tanto, un polipéptido es normalmente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas consiste en que las dos moléculas o sus complementos hibridan entre sí en condiciones estrictas, como se describe a continuación. Todavía otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas consiste en que pueden utilizarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

**[0026]** Los términos "modulación", "modular" o "modulador" se utilizan de acuerdo con su significado llano y ordinario, y se refieren al acto de cambiar o variar una o más propiedades. "Modulador" hace referencia a una composición que aumenta o disminuye el nivel de una molécula diana o la función de una molécula diana o el estado físico de la diana de la molécula. "Modulación" hace referencia al proceso de cambiar o variar una o más propiedades. Por ejemplo, en la forma en que se aplica a los efectos de un modulador en un objetivo biológico, modular significa cambiar, aumentando o disminuyendo, una propiedad o función del objetivo biológico o la cantidad del objetivo biológico.

**[0027]** Tal y como se emplean en el presente documento, los términos "inhibición", "inhibir" e "inhibidor/a/es/as" y similares en relación con una interacción de inhibidor de proteínas (p. ej., antagonista) significan afectar negativamente (p. ej., haciendo disminuir) a la actividad o la función de la proteína en relación con la actividad o la función de la proteína en ausencia del inhibidor. En los modos de realización, inhibición se refiere a la reducción de una enfermedad o los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, en algunos modos de realización, la inhibición incluye, al menos en parte, el bloqueo parcial o total de la estimulación, la disminución, la prevención o el retraso de la activación, o la inactivación, la insensibilización o la disminución de la transducción de señales o la actividad enzimática o la cantidad de una proteína.

**[0028]** Tal y como se define en el presente documento, los términos "activación" y "activar" y similares en relación con una interacción de activador de proteínas (p. ej., agonista) significan afectar positivamente (p. ej., haciendo aumentar) a la actividad o la función de la proteína en relación con la actividad o la función de la proteína en ausencia del activador (p. ej., la composición descrita en el presente documento). Por lo tanto, en algunos modos de realización, la activación puede incluir, al menos en parte, el aumento parcial o total de la estimulación, el aumento o la habilitación de la activación, o la activación, la sensibilización o el aumento de la transducción de señales o la actividad enzimática o la cantidad de una proteína que ha disminuido en una enfermedad.

**[0029]** El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector han sido modificados mediante métodos de laboratorio o son el resultado de métodos de laboratorio. Por consiguiente, por ejemplo, proteínas recombinantes incluyen proteínas producidas mediante métodos de laboratorio. Las proteínas recombinantes pueden incluir residuos de aminoácidos no encontrados en la forma nativa (no recombinante) de la proteína o pueden incluir residuos de aminoácidos que han sido modificados; por ejemplo, marcados.

**[0030]** El término "heterólogo" cuando se utiliza para hacer referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico normalmente se produce de manera recombinante, presentando dos o más secuencias de genes sin relación, dispuestos para hacer un ácido nucleico nuevo funcional; por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificadora de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una fusión).

**[0031]** El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o sus fragmentos que se une específicamente a un antígeno y lo reconoce. Los genes de



inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la multitud de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon que, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Normalmente, la región de unión de antígeno de un anticuerpo será más crítica en relación con la especificidad y la afinidad de la unión. En algunos modos de realización, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse de diferentes organismos, incluidos los humanos, los ratones, las ratas, los hámsteres, los camellos, etc. Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos que han sido modificados o mutados en una o más posiciones de aminoácido para mejorar o modular una función deseada del anticuerpo (p. ej., glicosilación, expresión, reconocimiento de antígeno, funciones de efector, unión de antígeno, especificidad, etc.).

**[0032]** Una unidad estructural de inmunoglobulina de ejemplo (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está formado por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, presentando cada par una cadena "ligera" (aproximadamente, 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente, 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente entre 100 y 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) y cadena pesada variable (VH, por sus siglas en inglés) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. La región Fc (es decir, fragmento de región cristalizante) es la "base" o "cola" de una inmunoglobulina y está formada, normalmente, por dos cadenas pesadas que aportan dos o tres dominios constantes en función de la clase del anticuerpo. Al unirse a proteínas específicas, la región Fc garantiza que cada anticuerpo genera una respuesta inmunitaria adecuada para un antígeno determinado. La región Fc también se une a diversos receptores celulares, como los receptores Fc y a otras moléculas inmunitarias, como las proteínas de complemento.

**[0033]** Existen anticuerpos, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. Por consiguiente, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab)<sup>2</sup>, un dímero de Fab que, en sí mismo, es una cadena ligera unida a VH-CH1 mediante un enlace disulfuro. El F(ab)<sup>2</sup> puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, de tal forma que se convierte el dímero F(ab)<sup>2</sup> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente la porción de unión de antígeno con parte de la región de bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993)). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen desde el punto de vista de la digestión de un anticuerpo intacto, cualquier experto en la materia observará que tales fragmentos pueden sintetizarse de nuevo de manera química o mediante la utilización de la metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, tal y como se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros o los sintetizados de nuevo mediante metodologías de ADN recombinante (p. ej., cadena simple Fv) o los identificados mediante la utilización de bibliotecas de visualización de fagos (véase, p. ej., McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).

**[0034]** Un fragmento variable de cadena simple (scFv) es normalmente una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulinas, conectado con un péptido de enlace corto de entre 10 y aproximadamente 25 aminoácidos. El enlace puede, normalmente, ser rico en glicina en relación con la flexibilidad, así como en serina o treonina en relación con la solubilidad. El enlace puede conectar el extremo N-terminal de la VH con el extremo C-terminal de la VL o viceversa.

**[0035]** Para la preparación de anticuerpos adecuados, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales, pueden utilizarse muchas técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); y Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986)). Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés pueden clonarse a partir de una célula; por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal pueden clonarse a partir de un hibridoma y utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas genómicas que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales también pueden estar hechas de hibridoma o células plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de los productos génicos de cadena pesada y ligera generan un gran acervo de anticuerpos con diferente especificidad antigénica (véase, p. ej., Kuby, *Immunology* (3ª ed. 1997)). Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena simple o anticuerpos recombinantes (Patente estadounidense 4,946,778, Patente estadounidense n.º 4,816,567) pueden adaptarse para producir anticuerpos para polipéptidos de la presente invención. Asimismo, los ratones transgénicos u otros organismos como otros mamíferos, pueden utilizarse para expresar anticuerpos humanizados o humanos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)). Alternativamente, puede utilizarse tecnología de visualización de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos heteroméricos Fab que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, p. ej., McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554

(1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (véase, por ejemplo, WO 93/08829, Trauneker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente o inmunotoxinas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; y EP 03089).

**[0036]** Diversos métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (p. ej., patentes estadounidenses n.º 4,816,567; 5,530,101; 5,859,205; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,777,085; 6,180,370; 6,210,671; y 6,329,511; WO 87/02671; patente europea n.º 0173494; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522; y Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534). Los anticuerpos humanizados también se describen en, por ejemplo, Winter y Milstein (1991) *Nature* 349:293. Por lo general, un anticuerpo humanizado presenta uno o más residuos de aminoácidos que se le han introducido procedentes de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son denominados frecuentemente residuos de importación, que son normalmente tomados de un dominio variable de importación. La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colegas (véase, p. ej., Morrison *et al.*, *PNAS USA.*, 81:6851-6855 (1984), Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988), Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992), Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994)), sustituyendo CDR de roedores o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n.º 4,816,567), donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente a partir de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados suelen ser anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Por ejemplo, los polinucleótidos que comprenden una primera secuencia que codifica regiones marco de inmunoglobulina humanizada y un segundo conjunto de secuencias que codifican las regiones que determinan la complementariedad de inmunoglobulina deseada pueden ser producidos sintéticamente o combinando segmentos de ADN genómico y de ADNc adecuados. Las secuencias de ADN de región constante humanas pueden aislarse de acuerdo con procedimientos conocidos de una variedad de células humanas.

**[0037]** Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia de tal forma que el sitio de unión de antígeno (región variable) se une a una región constante de una especie, función de efector y/o clase diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico; por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, se sustituye o se intercambia por una región variable que presenta una especificidad de antígeno diferente o alterada. Los anticuerpos preferidos de la invención y para su uso de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos monoclonales humanizados y/o quiméricos.

**[0038]** Se conocen técnicas para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos (véase; por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery" en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)). Tal y como se emplea en el presente documento, el término "conjugado anticuerpo-fármaco" o "ADC" hace referencia a un agente terapéutico conjugado o unido de cualquier otra manera covalentemente a un anticuerpo. Un "agente terapéutico" en el presente documento es una composición útil para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, como el cáncer.

**[0039]** La frase "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunoreactivo con", cuando se hace referencia a una proteína o un péptido, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de la proteína, normalmente en una población heterógena de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo determinadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta al menos el doble del fondo y, más normalmente, más de entre 10 y 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones requiere un anticuerpo seleccionado por su especificidad en relación con una proteína concreta. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden seleccionarse para obtener solamente un subconjunto de anticuerpos que son específicamente inmunoreactivos con el antígeno seleccionado y no con otras proteínas. Esta selección puede conseguirse mediante la sustracción de anticuerpos de reacción cruzada con otras moléculas. Puede utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína concreta. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida se utilizan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunoreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998) para obtener una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden utilizarse para determinar la inmunoreactividad específica).

proteína).

**[0040]** El término "ligando" se refiere a un agente, por ejemplo, un polipéptido u otra molécula, capaz de unirse a un receptor.

5 **[0041]** El término "CTLA-4" o "proteína CTLA-4", tal y como se emplean en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (CTLA-4) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la proteína CTLA-4 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con CTLA-4). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido CTLA-4 de origen natural. g

15 **[0042]** El término "LCN2" o "lipocalina 2 de unión a CTLA-4" o "lipocalina 2" tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína lipocalina 2 (LCN2) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la proteína LCN2 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con LCN2). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido LCN2 de origen natural. En algunos modos de realización, la proteína LCN2 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:38455402, homóloga o fragmento funcional de la misma.

25 **[0043]** El término "MMP 2" o "proteasa MMP 2", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP 2) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la MMP 2 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con MMP 2). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido MMP 2 de origen natural. En algunos modos de realización, MMP 2 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:189217853, homóloga o fragmento funcional de la misma.

30 **[0044]** El término "MMP9" o "proteasa MMP9", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de MMP9 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con MMP 9). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido MMP9 de origen natural. En algunos modos de realización, MMP9 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:74272287, homóloga o fragmento funcional de la misma.

40 **[0045]** El término "MMP 13" o "proteasa MMP 13", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP 13) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la MMP 13 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con MMP 13). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido MMP 13 de origen natural. En algunos modos de realización, MMP 13 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:4505209, homóloga o fragmento funcional de la misma.

50 **[0046]** El término "ADAM 9" o "proteasa ADAM 9", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína 9 de desintegrina y metaloproteinasa que contienen dominios (ADAM) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de ADAM 9 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con ADAM 9). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido ADAM 9 de origen natural. En algunos modos de realización, ADAM 9 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:4501915, homóloga o fragmento funcional de la misma.

60 **[0047]** El término "ADAM 10" o "proteasa ADAM 10", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína 10 de desintegrina y metaloproteinasa que contienen dominios (ADAM) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de ADAM 10 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación

con ADAM 10). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido ADAM 10 de origen natural. En algunos modos de realización, ADAM 10 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:4557251, homólogo o fragmento funcional de la misma.

**[0048]** El término "ADAM 17" o "proteasa ADAM 17", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína 17 de desintegrina y metaloproteínasa que contienen dominios (ADAM) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de ADAM 17 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con ADAM 17). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido ADAM 17 de origen natural. En algunos modos de realización, ADAM 17 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:73747889, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0049]** El término "PSA" o "proteasa PSA", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural del antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés), también conocido como seminoproteína gamma o calicreína-3, o variantes u homólogos del mismo que mantienen la actividad de PSA (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con PSA). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido PSA de origen natural. En algunos modos de realización, PSA es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:71834853, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0050]** El término "PSMA" o "proteasa PSMA", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural del antígeno prostático específico de membrana (PSMA, por sus siglas en inglés), también conocido como glutamato carboxipeptidasa II (GCP II), peptidasa N-acetil-L-aspartil-L-glutamato I (NAALADasa I) o NAAG peptidasa, o variantes u homólogos del mismo que mantienen la actividad de PSMA (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con PSMA). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido PSMA de origen natural. En algunos modos de realización, PSMA es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:62548858, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0051]** El término "catepsina B" o "proteasa catepsina B", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína catepsina B o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la catepsina B (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la catepsina B). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido de catepsina B de origen natural. En algunos modos de realización, la catepsina B es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:4503139, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0052]** El término "proteína asociada a fibroblasto", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína asociada a fibroblasto o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la proteína asociada a fibroblasto (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la proteína asociada a fibroblasto). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido de proteína asociada a fibroblasto de origen natural. En algunos modos de realización, la proteína asociada a fibroblasto es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:1888316, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0053]** El término "uPA" o "proteasa uPA", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteasa activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la proteasa uPA (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la proteasa uPA). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido uPA de

origen natural. En algunos modos de realización, la proteasa uPA es la proteína identificada por la referencia de secuencia del UniProt P00749, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0054]** El término "MT-SP1" o "proteasa MT-SP1", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la serina proteasa 1 de tipo membrana (MT-SP1) o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la MT-SP1 (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con la MT-SP1). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido MT-SP1 de origen natural. En algunos modos de realización, MT-SP1 es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:11415040, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0055]** El término "legumain" o "proteasa legumain", tal y como se emplea en el presente documento, incluye cualquiera de las formas recombinantes o de origen natural de la proteína legumain o variantes u homólogos de la misma que mantienen la actividad de la legumain (p. ej., en al menos una actividad del 50 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con legumain). En algunos aspectos, las variantes u homólogos presentan al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en la secuencia completa o una porción de la secuencia (p. ej., una porción de aminoácido continua de 50, 100, 150 o 200) en comparación con un polipéptido legumain de origen natural. En algunos modos de realización, legumain es la proteína identificada por la referencia de secuencia del NCBI GI:2842759, homóloga o fragmento funcional de la misma.

**[0056]** El término "poner en contacto" se utiliza de acuerdo con su significado simple y ordinario, y se refiere al proceso de permitir que al menos dos especies distintas (p. ej., compuestos químicos, que incluyen biomoléculas o células) estén lo suficientemente próximas para reaccionar, interactuar o tocarse físicamente. Cabe observar, sin embargo, que el producto de reacción resultante puede producirse directamente a partir de una reacción entre los reactivos añadidos o a partir de un producto intermedio de uno o más de los reactivos añadidos, que pueden producirse en la mezcla de reacción.

**[0057]** El término "poner en contacto" puede incluir permitir que dos especies reaccionen, interactúen o se toquen físicamente, donde las dos especies pueden ser, por ejemplo, un enlace peptídico escindible como el descrito en la presente memoria y una proteasa. En algunos modos de realización, "poner en contacto" incluye, por ejemplo, permitir que una proteína recombinante de unión a CTLA-4 descrita en el presente documento interactúe con una proteína CTLA-4.

**[0058]** Una muestra o valor "control" se refiere a una muestra que sirve de referencia, normalmente una referencia conocida, para su comparación con una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede tomarse a partir de una condición de ensayo; p. ej., en presencia de un compuesto de ensayo, y compararse con muestras de condiciones conocidas; p. ej., en ausencia del compuesto de ensayo (control negativo) o en presencia de un compuesto conocido (control positivo). Un control puede también representar un valor medio recopilado a partir de una serie de ensayos o resultados. Cualquier experto en la materia reconocerá que pueden establecerse controles para evaluar cualquier número de parámetros. Por ejemplo, puede establecerse un control para comparar el beneficio terapéutico a partir de datos farmacológicos (p. ej., vida media) o medidas terapéuticas (p. ej., comparación de efectos secundarios). Cualquier experto en la materia comprenderá qué controles son valiosos en una situación determinada y será capaz de analizar datos a partir de comparaciones con valores control. Los controles también son valiosos para determinar la importancia de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro determinado son ampliamente diferentes en los controles, la variación en las muestras de ensayo no se considerará importante.

**[0059]** "Paciente" o "sujeto que lo necesita" se refiere a un organismo vivo que sufre una enfermedad o que es propenso a desarrollar una enfermedad o afección que puede ser tratada mediante la administración de una composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria. Algunos ejemplos no limitativos incluyen humanos, otros mamíferos, bovinos, ratas, ratones, perros, monos, cabras, ovejas, vacas, ciervos y otros animales no mamíferos. En algunos modos de realización, un paciente es humano.

**[0060]** Los términos "enfermedad" o "afección" se refieren a un estado de ánimo o estado de salud de un paciente o sujeto capaz de ser tratado con un compuesto, una composición farmacéutica o un método proporcionados en la presente memoria. En algunos modos de realización, la enfermedad es cáncer (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, osteosarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de piel (p. ej., carcinoma de células de Merkel), cáncer testicular, leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma).

**[0061]** Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer, neoplasma o tumores malignos encontrados en mamíferos, incluidos las leucemias, los linfomas, los melanomas, los tumores neuroendocrinos, los carcinomas y los sarcomas. Ejemplos de cánceres que pueden tratarse con un compuesto, una composición farmacéutica o un método proporcionados en la presente memoria

incluyen el linfoma, el sarcoma, el cáncer de vejiga, el cáncer de hueso, el tumor cerebral, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de colon, el cáncer de esófago, el cáncer gástrico, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de riñón, el mieloma, el cáncer de tiroides, la leucemia, el cáncer de próstata, el cáncer de mama (p. ej., triple negativo, ER positivo, ER negativo, resistente a la quimioterapia, resistente a Herceptin, HER2 positivo, resistente a doxorubicina, resistente a tamoxifeno, carcinoma ductal, carcinoma lobular, primario, metastásico), 5  
cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de hígado (p. ej., carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (p. ej., carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma de células escamosas de pulmón, adenocarcinoma, carcinoma pulmonar de células grandes, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoide, sarcoma), el glioblastoma multiforme, el glioma, el melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de próstata resistente a la castración, el cáncer de mama, el cáncer de mama triple negativo, el glioblastoma, el cáncer de ovarios, el 10  
cáncer de pulmón, el carcinoma de células escamosas (p. ej., cabeza, cuello o esófago), el cáncer colorrectal, la leucemia, la leucemia mieloide aguda, el linfoma, el linfoma de células B o el mieloma múltiple. Otros ejemplos incluyen el cáncer de tiroides, sistema endocrino, cerebro, mama, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, esófago, hígado, riñón, pulmón, pulmón no microcítico, melanoma, mesotelioma, ovarios, sarcoma, estómago, útero o meduloblastoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkiniano, mieloma múltiple, neuroblastoma, glioma, glioblastoma multiforme, cáncer de ovarios, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia 15  
primaria, tumores cerebrales primarios, cáncer, insulinooma de páncreas maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinario, lesiones premalignas de la piel, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del sistema genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer endometrial, cáncer 20  
adrenocortical, neoplasmas del páncreas endocrino o exocrino, cáncer medular tiroideo, carcinoma medular tiroideo, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides papilar, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Paget del pezón, tumores Phyllodes, carcinoma lobular, carcinoma ductal, cáncer de las células estrelladas pancreáticas, cáncer de las células estrelladas hepáticas o cáncer de próstata.

**[0062]** El término "leucemia" se refiere ampliamente a enfermedades malignas progresivas de los órganos que forman la sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y un desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. En general, la leucemia se clasifica clínicamente de acuerdo con (1) la duración y la naturaleza de la enfermedad - aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mielóide (mielógena), linfóide (linfógena) o monocítica; y (3) el aumento o el no aumento del número de células anormales en la sangre - leucémica o aleucémica (subleucémica). Ejemplos de leucemias que pueden tratarse con un compuesto, una composición farmacéutica o un método proporcionados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, la leucemia no linfocítica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia granulocítica aguda, la leucemia granulocítica crónica, la leucemia promielocítica aguda, la leucemia adulta de células T, la leucemia aleucémica, la leucemia leucocitémica, la leucemia basofílica, la leucemia de células blásticas, la leucemia bovina, la leucemia mielocítica crónica, la leucemia cutis, la leucemia embrionaria, la leucemia eosinofílica, la leucemia de Gross, la leucemia de las células pilosas, la leucemia hemoblástica, la leucemia hemocitoblástica, la leucemia histiocítica, la leucemia de células madre, la leucemia monocítica aguda, la leucemia leucopénica, la leucemia linfática, la leucemia linfoblástica, la leucemia linfocítica, la leucemia linfógena, la leucemia linfóide, la leucemia de células de linfosarcoma, la leucemia de mastocitos, la leucemia megacariocítica, la leucemia micromieloblástica, la leucemia monocítica, la leucemia mieloblástica, la leucemia mielocítica, la leucemia mielóide granulocítica, la leucemia mielomonocítica, la leucemia de Naegeli, la leucemia de células plasmáticas, el mieloma múltiple, la leucemia plasmacítica, la leucemia promielocítica, la leucemia de células de Rieder, la leucemia de Schilling, la leucemia de células madre, la leucemia subleucémica o la leucemia de células indiferenciadas. 25  
30  
35  
40

**[0063]** En general, el término "sarcoma" se refiere a un tumor formado por una sustancia como el tejido conectivo embrionario y, en general, se compone de células bien encajadas insertadas en una sustancia homogénea o fibrilar. Los sarcomas que pueden tratarse con un compuesto, una composición farmacéutica o un método proporcionados en la presente memoria incluyen un condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abernethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de parte blanda, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, sarcoma cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma de mesenquimoma maligno, sarcoma parostal, sarcoma reticulocítico, 55  
sarcoma de Rous, sarcoma serocístico, sarcoma sinovial o sarcoma telangiectásico.

**[0064]** El término "melanoma" se entiende por un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas que pueden tratarse con un compuesto, una composición farmacéutica o un método proporcionados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, el melanoma lentiginoso acral, el melanoma amelanótico, el melanoma juvenil benigno, el melanoma de Cloudman, el melanoma S91, el melanoma de Harding-Passey, el melanoma juvenil, el melanoma léntigo maligno, el melanoma maligno, el melanoma nodular, el melanoma subungueal o el melanoma de extensión superficial. 60

**[0065]** El término "carcinoma" hace referencia a un nuevo crecimiento maligno formado por células epiteliales que tienden a infiltrar los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Ejemplos de carcinomas que pueden tratarse con un compuesto, una composición farmacéutica o método proporcionados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, el carcinoma medular tiroideo, el carcinoma medular tiroideo familiar, el carcinoma de células acinares, el carcinoma acinoso, el carcinoma adenoquístico, el carcinoma adenoideo quístico, el adenocarcinoma de corteza adrenal, el carcinoma alveolar, el carcinoma de las células alveolares, el carcinoma de las células basales, el carcinoma basocelular, el carcinoma basaloide, el carcinoma de las células basoescamosas, el carcinoma bronquioalveolar, el carcinoma bronquiolar, el carcinoma broncogénico, el carcinoma cerebriforme, el carcinoma colangiocelular, el carcinoma coriónico, el carcinoma coloide, el comedocarcinoma, el corpus carcinoma, el carcinoma cribiforme, el carcinoma en cuirasse, el carcinoma cutáneo, el carcinoma cilíndrico, el carcinoma de células cilíndricas, el carcinoma canalicular, el carcinoma ductal, el carcinoma duro, el carcinoma embrionario, el carcinoma encefaloide, el carcinoma epidermoide, el carcinoma epitelial adenoide, el carcinoma exofítico, el carcinoma ex ulcere, el carcinoma fibroso, el carcinoma gelatiniforme, el carcinoma gelatinoso, el carcinoma de células gigantes, el carcinoma gigantocelular, el carcinoma glandular, el carcinoma de células granulosas, el carcinoma de matriz del pelo, el carcinoma hepatoide, el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de células de Hurthle, el carcinoma hialino, el carcinoma hipernefroide, el carcinoma embrionario infantil, el carcinoma *in situ*, el carcinoma intraepidérmico, el carcinoma intraepitelial, el carcinoma de Krompecher, el carcinoma de células Kulchitzky, el carcinoma de células grandes, el carcinoma lenticular, el carcinoma lenticulare, el carcinoma lipomatoso, el carcinoma lobular, el carcinoma linfoepitelial, el carcinoma medular, el carcinoma melanótico, el carcinoma molle, el carcinoma mucoso, el carcinoma muciparum, el carcinoma mucocelular, el carcinoma mucoepidermoide, el carcinoma mucoso, el carcinoma mixomatode, el carcinoma nasofaríngeo, el carcinoma de células de avena, el carcinoma osificante, el carcinoma osteoide, el carcinoma papilar, el carcinoma periportal, el carcinoma preinvasivo, el carcinoma de células espinosas, el carcinoma pultáceo, el carcinoma de células renales del riñón, el carcinoma de células de reserva, el carcinoma sarcomatoide, el carcinoma schneideriano, el carcinoma escirroso, el carcinoma del escroto, el carcinoma de células en forma de anillo de sello, el carcinoma simplex, el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma solanoide, el carcinoma de células esféricas, el carcinoma espinocelular, el carcinoma esponjoso, el carcinoma escamoso, el carcinoma de las células escamosas, el carcinoma del intestino, el carcinoma telangiectásico, el carcinoma telangiectode, el carcinoma de células de transición, el carcinoma tuberoso, el carcinoma tubular, el carcinoma tuberoso, el carcinoma verrucoso o el carcinoma vellosos.

**[0066]** Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "metástasis", "metastático" y "cáncer metastático" pueden utilizarse de manera intercambiable y se refieren a la propagación de una enfermedad o un trastorno proliferativos; por ejemplo, cáncer, desde un órgano u otro órgano o parte del cuerpo no adyacentes. El cáncer se produce en un sitio de origen; por ejemplo, la mama, cuyo sitio se denomina tumor primario; por ejemplo, cáncer de mama primario. Algunas células cancerosas en el tumor primario o sitio de origen adquieren la capacidad de penetrar e infiltrarse en el tejido normal circundante en la zona local y/o la capacidad de penetrar las paredes del sistema linfático o el sistema vascular y de circular a través del sistema hacia otros sitios y tejidos del cuerpo. Un segundo tumor detectable clínicamente formado a partir de células cancerosas de un tumor primario recibe el nombre de tumor secundario o metastático. Cuando las células cancerosas metastatizan, se supone que el tumor metastático y sus células serán similares a las del tumor original. Por lo tanto, si el cáncer de pulmón metastatiza a la mama, el tumor secundario en el sitio de la mama consiste en células del pulmón anormales y células de la mama no anormales. El tumor secundario en la mama se denomina cáncer de pulmón metastático. Por lo tanto, la expresión cáncer metastático se refiere a una enfermedad en la que un sujeto presenta o presentó un tumor primario y presenta uno o varios tumores secundarios. Las expresiones cáncer no metastático o sujetos con cáncer no metastático se refieren a enfermedades en las que los sujetos presentan un tumor primario, pero no uno o varios tumores secundarios. Por ejemplo, el cáncer de pulmón metastático se refiere a una enfermedad en un sujeto con un tumor pulmonar primario o con un historial de tumor pulmonar primario y con uno o varios tumores secundarios en una segunda ubicación o en diversas ubicaciones; por ejemplo, en la mama.

**[0067]** El término "asociado/a/os/as" o "asociado/a/os/as a" en el contexto de una sustancia o una actividad o función de sustancia asociados a una enfermedad (p. ej., diabetes, cáncer [p. ej., cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer metastático, melanoma, cáncer de próstata resistente a la castración, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo, glioblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas (p. ej., cabeza, cuello o esófago), cáncer colorrectal, leucemia, leucemia mieloide aguda, linfoma, linfoma de células B o mieloma múltiple]) significa que la enfermedad (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, osteosarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de la piel [p. ej., carcinoma de células de Merkel], cáncer testicular, leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma) es provocada (total o parcialmente) o un síntoma de la enfermedad es provocado (total o parcialmente) por la sustancia o la actividad o función de sustancia.

**[0068]** El término "aberrante", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a diferente de lo normal. Cuando se utiliza para describir la actividad enzimática, aberrante se refiere a la actividad mayor o inferior que un control normal o el promedio de muestras de control normales sin enfermedad. Actividad aberrante puede

referirse a una cantidad de actividad que da lugar a una enfermedad, donde la vuelta de la actividad aberrante a una cantidad normal o que no se asocia a la enfermedad (p. ej., mediante el uso de un método como el descrito en la presente memoria) da lugar a la reducción de la enfermedad o de uno o varios síntomas de la enfermedad.

#### PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5 **[0069]** En la presente memoria, se dan a conocer proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 y dímeros de proteína recombinante de unión a CTLA-4 útiles, entre otros, para el tratamiento del cáncer. Una proteína recombinante de unión a CTLA-4 o un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se da a  
10 conocer en la presente memoria, incluyendo modos de realización de los mismos, incluye un dominio (dominio de unión a CTLA-4) capaz de interactuar con (p. ej., unirse a) una proteína CTLA-4 expresada sobre la superficie de una célula (p. ej., una célula cancerosa). El dominio de unión a CTLA-4 está conectado a un péptido (péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4) a través de un enlace (enlace peptídico escindible) de tal forma que el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 evita que el dominio de unión a CTLA-4 se una a una proteína CTLA-4. Después de la hidrólisis (ruptura proteolítica) del enlace peptídico escindible, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 es liberado, de tal forma que permite que el dominio de unión a CTLA-4 interactúe con una proteína CTLA-4. Por lo tanto, en un primer aspecto, se da a conocer una  
15 proteína recombinante de unión a CTLA-4, que comprende:

(i) un dominio de unión a CTLA-4;

(ii) un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4; y

(iii) un enlace peptídico escindible que conecta dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con dicho dominio de unión a CTLA-4,  
20

donde dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 comprende una secuencia que presenta o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.

#### 25 Dominios de unión a CTLA-4

**[0070]** El término "proteína de unión a CTLA-4", tal y como se da a conocer en la presente memoria, se refiere a un polipéptido expresado de forma recombinante capaz de unirse a, o de mostrar una afinidad de cualquier otra manera con una proteína CTLA-4 que se encuentra en o sobre una célula. La proteína de unión a CTLA-4 que se da a conocer en la presente memoria incluyendo modos de realización de la misma incluye un dominio de unión a CTLA-4, un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 y un enlace peptídico escindible, que conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el dominio de unión a CTLA-4. El término "dominio de unión a CTLA-4" se refiere a un dominio de polipéptido expresado de forma recombinante capaz de unirse a, o de mostrar una afinidad de cualquier otra manera con una proteína CTLA-4 que se encuentra en o sobre una célula. En la técnica, se conocen bien diversos métodos para determinar el alcance de la unión de un dominio de unión a CTLA-4 a CTLA-4. El dominio de unión a CTLA-4 dado a conocer en la presente memoria puede ser una proteína LCN2 capaz de unirse a CTLA-4. Por lo tanto, en algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 es una lipocalina 2 (LCN2) de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 incluye una lipocalina 2 (LCN2) de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 incluye la secuencia de SEQ ID NO:34. En algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 presenta la secuencia de SEQ ID NO:34. En algunos modos de realización, la LCN2 de unión a CTLA-4 presenta la secuencia de cualquier de las proteínas LCN2 expuestas en la solicitud de patente US2014/0051645 A1 y US 2014/0080177.

#### Péptidos de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4

35 **[0071]** Un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 dado a conocer en la presente memoria se refiere a un péptido capaz de unirse a, o de mostrar una afinidad de cualquier otra manera con un dominio de unión a CTLA-4. Cuando se une de manera no covalente al dominio de unión a CTLA-4, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 inhibe (p. ej., hace disminuir) o impide de otra manera (enmascara) la actividad o la unión del dominio de unión a CTLA-4 a su receptor o proteína análogos (es decir, CTLA-4). El péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 presenta suficiente afinidad con el dominio de unión a CTLA-4 para impedir la actividad o la unión del dominio de unión a CTLA-4 a una proteína CTLA-4. En la técnica, se conocen bien diversos métodos para determinar el alcance de la unión de un dominio de unión a CTLA-4 a una proteína CTLA-4.  
40

**[0072]** En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 presenta una longitud de al menos 4 aminoácidos. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 es un péptido circular. En algunos modos de realización, el péptido redondeado es un 12-mero. En los casos en que el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 es un péptido redondeado, un péptido redondeado es formado por un enlace disulfuro que conecta dos residuos de aminoácidos de cisteína. En algunos modos de realización, los residuos de aminoácidos de cisteína  
55



son cisteínas terminales (es decir, se sitúan en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal del péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4). En algunos modos de realización, el enlace disulfuro conecta una cisteína N-terminal con una cisteína C-terminal.

5 **[0073]** De acuerdo con la invención, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 presenta una secuencia con al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, la secuencia presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

25 **[0074]** De acuerdo con la invención, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

45 **[0075]** En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:14.

#### Señales de secreción de glicoproteína

55 **[0076]** En relación con la proteína recombinante de unión a CTLA-4 expuesta anteriormente, en algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una señal de secreción de glicoproteína. El término "glicoproteína", tal y como se expone en la presente memoria, es bien conocido en la técnica y se refiere a las proteínas que contienen cadenas de oligosacáridos (glicanos) unidas covalentemente a la misma (p. ej., a cadenas laterales de polipéptido). El carbohidrato puede unirse a la proteína en una modificación cotraslativa o postraslativa, un proceso conocido como glicosilación. Las glicoproteínas suelen ser proteínas secretadas y proteínas integrales de membrana importantes. Algunos ejemplos no limitativos de glicoproteínas incluyen anticuerpos, moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), mucinas, integrinas, glicoproteínas estructurales, proteínas de envoltura vírica (p. ej., gp41, gp120) y hormonas (p. ej., hormona estimulante del foliculo, hormona tirotrópica, eritropoyetina). Una "señal de secreción de glicoproteína", tal

y como se expone en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos incluida en una glicoproteína que aumenta la secreción, que normalmente se escinde de la glicoproteína naciente una vez haya sido trasladada en la membrana del retículo endoplasmático por una peptidasa de señal. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67, una señal pELB, un receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humano (GM-CSFR, por sus siglas en inglés) o una secuencia de señales de cadena alfa (CAR). En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína (gp) 67 incluye la secuencia de SEQ ID NO:35. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína (gp) 67 presenta la secuencia de SEQ ID NO:35. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una señal pELB. Una secuencia de señal pELB participa en la expresión periplásmica de proteínas en *E. coli*. La secuencia de señal pELB participa en la expresión, plegamiento adecuado, formación de disulfuros y solubilidad de proteínas. En algunos modos de realización, la señal pELB incluye la secuencia MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:44). En algunos modos de realización, la señal pELB es la secuencia MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:44). En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es un receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humano (GM-CSFR). En algunos modos de realización, el GM-CSFR incluye la secuencia MLLLVTSLLLCELPHPAFLLI (SEQ ID NO:45). En algunos modos de realización, el GM-CSFR es la secuencia MLLLVTSLLLCELPHPAFLLI (SEQ ID NO:45). En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una secuencia de señales de cadena alfa (CAR). En algunos modos de realización, la secuencia CAR incluye la secuencia MPPPRLLFFL. En algunos modos de realización, la secuencia CAR es la secuencia MPPPRLLFFL.

#### Enlaces peptídicos escindibles

**[0077]** Un "enlace peptídico escindible", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un enlace polivalente unido covalentemente a un dominio de unión a CTLA-4 y unido covalentemente a un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 que es enzimáticamente escindible (p. ej., en un sitio de escisión). En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible se expresa recombinantemente. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible es un enlace formado mediante la reacción de un grupo funcional (reactivo) unido al enlace con un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 utilizando, por ejemplo, química de conjugación. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible es un enlace formado mediante la reacción de un grupo funcional (reactivo) unido al enlace con un dominio de unión a CTLA-4 utilizando, por ejemplo, química de conjugación. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el extremo N-terminal del dominio de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 al extremo C-terminal del dominio de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible es un enlace flexible que incluye uno o más residuos de glicina. En algunos modos de realización, al menos la mitad de los residuos incluidos en el enlace peptídico escindible son residuos de glicina. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible incluye una secuencia glicina-glicina-serina.

**[0078]** Los términos "conjugar" y "química de conjugación" se refieren a reacciones con grupos reactivos conocidos que se producen en condiciones relativamente suaves. Estos incluyen, sin carácter limitativo, sustituciones nucleofílicas (p. ej., reacciones de aminas y alcoholes con haluros de ácido, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (p. ej., reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (p. ej., reacción de Michael o adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se analizan en, por ejemplo, marzo, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, "MODIFICATION OF PROTEINS"; *Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

**[0079]** Algunos grupos funcionales reactivos útiles que se emplean para químicas de conjugación en la presente memoria incluyen, por ejemplo:

- 50 (a) grupos carboxilo y diversos derivados de los mismos incluyendo, sin carácter limitativo, ésteres N-hidroxisuccinimida, ésteres N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres p-nitrofenil, ésteres alquilo, alquenilo, alquinilo y aromático.
- (b) grupos hidroxilo que pueden transformarse en ésteres, éteres, aldehídos, etc.
- 55 (c) grupos haloalquilo donde el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo nucleofílico como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, carbanión o un ión alcóxido, de tal forma que se produce la unión covalente de un nuevo grupo en el sitio del átomo de halógeno;
- (d) grupos dienofilo, que son capaces de participar en reacciones Diels-Alder como, por ejemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldehído o cetona, de tal forma que la derivatización posterior es posible por medio de la formación de derivados carbonilo como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como la adición de Grignard o la adición de alquil litio;

(f) grupos haluro sulfonilo para su reacción posterior con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;

5 (g) grupos tiol, que pueden convertirse en disulfuros, sometidos a reacción con haluros de acilo o unidos a metales como el oro;

(h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden ser, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

(i) alquenos, que pueden someterse, por ejemplo, a cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc.;

(j) epóxidos, que pueden reaccionar con, por ejemplo, aminas y compuestos hidroxilo;

10 (k) fosforamiditas y otros grupos funcionales estándar útiles en la síntesis de ácido nucleico;

(i) enlazado metal-óxido-silicio; y

(l) enlazado metálico a grupos fosforosos reactivos (p. ej., fosfinas) para formar, por ejemplo, enlaces fosfato-diéster.

15 **[0080]** Los grupos funcionales reactivos pueden seleccionarse de tal manera que no participen en la estabilidad química de las composiciones descritas en la presente memoria ni interfieran en la estabilidad química de las mismas. Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede protegerse de la participación en la reacción de reticulación mediante la presencia de un grupo protector.

20 **[0081]** En la presente memoria, se describen "profármacos de anticuerpo" que utilizan propiedades asociadas a tumor para activar un mAb modificado en un sitio de enfermedad. Una proteína de enmascaramiento recombinante no covalente (p. ej., una máscara de mAb), descubierta en la presente memoria, cuando se integra con componentes biológicos de mAb o similares a mAb clínicamente validados (es decir, proteínas de ligando recombinantes descritas en la presente memoria), reduce la afinidad de mAb validada u ocluye su sitio de unión a antígeno en tejido normal, pero se activa en el tumor mediante proteasas específicas de tumor.

25 **[0082]** El enlace peptídico escindible dado a conocer en la presente memoria puede incluir un sitio de escisión de proteasa. Un "sitio de escisión", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un sitio reconocible para la escisión de una porción de un enlace (p. ej., enlace peptídico escindible tal y como se ha descrito anteriormente) que se encuentra en una proteína recombinante de unión a CTLA-4 o un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, descritos en la presente memoria. Por lo tanto, un sitio de escisión puede encontrarse en la secuencia de un enlace peptídico escindible descrito en la presente memoria, incluyendo modos de realización del mismo. En algunos modos de realización, el sitio de escisión es una secuencia de aminoácidos que es reconocida y escindida por un agente de escisión (p. ej., una secuencia peptídica). Algunos ejemplos de agentes de escisión incluyen proteínas, enzimas, enzimas de ADN, enzimas de ARN, metales, ácidos y bases. En la presente memoria, se definen sitios de escisión ilustrativos (p. ej., tabla 1 y figura 6).

35 **[0083]** En algunos modos de realización, el sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de proteasa asociado a tumor. Un "sitio de escisión de proteasa asociado a tumor", según se da a conocer en la presente memoria, es una secuencia de aminoácidos reconocida por una proteasa, cuya expresión es específica para una célula tumoral o un entorno de célula tumoral del mismo. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de metaloproteinasa de matriz (MMP), un sitio de escisión de metaloproteinasa que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM), un sitio de escisión de proteasa de antígeno específico de próstata (PSA), un sitio de escisión de proteasa de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), un sitio de escisión de proteasa de serina proteasa 1 de tipo membrana (MT-SP1) o un sitio de escisión de proteasa de legumain. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de metaloproteinasa de matriz (MMP) es un sitio de escisión de MMP 9, un sitio de escisión de MMP 13 o un sitio de escisión de MMP 2. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de metaloproteinasa que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM) es un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 9, un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 10 o un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 17. Los sitios de escisión de proteasa pueden ser designados por una secuencia de aminoácidos específica. A continuación, en la tabla 1, se muestran secuencias de sustrato de escisión de proteasa de ejemplo.

50 **[0084]** En algunos modos de realización, los enlaces peptídicos escindibles son 5-meros (es decir, péptidos de 5 aminoácidos de longitud), 6-meros (es decir, péptidos de 6 aminoácidos de longitud), 7-meros (es decir, péptidos de 7 aminoácidos de longitud), 8-meros (es decir, péptidos de 8 aminoácidos de longitud), 9-meros (es decir, péptidos de 9 aminoácidos de longitud), 10-meros (es decir, péptidos de 10 aminoácidos de longitud), 11-meros (es decir, péptidos de 11 aminoácidos de longitud), 12-meros (es decir, péptidos de 12 aminoácidos de longitud) o 13-meros (es decir, péptidos de 13 aminoácidos de longitud).

55 Dominios de dimerización

**[0085]** En relación con cualquier modo de realización expuesto anteriormente, en algunos modos de realización el dominio de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización. Un dominio de dimerización es un dominio de proteína capaz de dimerizar (es decir, unirse a una segunda proteína de dimerización). La dimerización se realiza normalmente a través de una unión no covalente. En algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 se une covalentemente al extremo C-terminal del dominio de dimerización. En algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 se une covalentemente al extremo N-terminal del dominio de dimerización.

**[0086]** En algunos modos de realización, más de una proteína de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización. En algunos modos de realización, una primera proteína de unión a CTLA-4 se une al extremo C-terminal del dominio de dimerización y una segunda proteína de unión a CTLA-4 se une al extremo N-terminal del dominio de dimerización.

**[0087]** El dominio de dimerización puede ser un dominio de proteína Fc. El dominio de proteína Fc puede ser una proteína IgG o IgM Fc. En algunos modos de realización, la proteína Fc es una proteína IgG Fc. La proteína IgG Fc puede ser una proteína IgG<sub>1</sub> Fc. En algunos modos de realización, la proteína IgG<sub>1</sub> Fc presenta un peso molecular de aproximadamente 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 75 kDa, 80 kDa, 85 kDa, 90 kDa, 95 kDa, 100 kDa, 110 kDa, 120 kDa, 130 kDa, 140 kDa, 150 kDa, 160 kDa o 170 kDa. La proteína IgG<sub>1</sub> Fc puede presentar un peso molecular de entre aproximadamente 30 kDa y aproximadamente 70 kDa. La proteína IgG<sub>1</sub> Fc puede presentar un peso molecular de entre aproximadamente 40 kDa y aproximadamente 60 kDa. En algunos modos de realización, la proteína Fc es una proteína IgM Fc. El dominio de dimerización puede ser un dominio de proteína multivalente (p. ej., preferiblemente dominios de proteína diméricos, pero también triméricos y tetraméricos). El dominio de dimerización puede ser una nanopartícula. En algunos modos de realización, el dominio de dimerización incluye cualquiera de las proteínas expuestas en la solicitud de patente 6,277,375, que se incorpora en el presente documento en su totalidad y a todos los efectos. En algunos modos de realización, el dominio de dimerización incluye cualquiera de las proteínas expuestas en Nimmerjahn F *et al.* (*Cancer Immunity* (2012) Vol:12 p.13) y Vidarsson G *et al.* (*Frontiers in Immunology* (2014) Vol:5/520), que se incorporan en el presente documento en su totalidad y a todos los efectos.

**[0088]** En relación con cualquier modo de realización expuesto anteriormente, en algunos modos de realización, la proteína de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio diana. En algunos modos de realización, el dominio diana se une covalentemente al dominio de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el dominio diana se une covalentemente al dominio de dimerización. Un "dominio diana", tal y como se da a conocer en la presente memoria, es una composición monovalente capaz de unirse a, o de mostrar una afinidad de cualquier otra manera con un tipo concreto de tejido o componente del mismo. La adición de un dominio diana a una proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria, puede dirigir la proteína recombinante de unión a CTLA-4 a sitios concretos en el cuerpo. Los dominios diana pueden incluir, por ejemplo, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, péptidos, carbohidratos, lípidos, oligonucleótidos, ADN, ARN o moléculas pequeñas que presentan un peso molecular inferior a 2000 Daltons. En algunos modos de realización, un dominio diana es un dominio de fragmento variable de cadena simple (scFv), tal y como se ha descrito en la presente memoria. Por ejemplo, un dominio diana puede ser una glicoproteína o un receptor que puedan reconocer selectivamente un ligando correspondiente en una célula (p. ej., célula tumoral) y de unirse al mismo. El dominio diana pueden ser un par de proteínas idénticas (p. ej., 1-1 [dímero] o 2-2 [tetramero]) y, en algunos modos de realización, dominios o regiones de anticuerpo Fc (p. ej., longitud completa o fragmentos de IgG Fc o IgM Fc). El dominio diana puede ser un dominio de unión a proteína celular (p. ej., longitud completa o fragmento funcional de una proteína celular reconocida o unida de otra manera por un dominio de proteína celular concreto, tal y como se ha descrito en la presente memoria, incluyendo modos de realización del mismo). En algunos modos de realización, el dominio diana es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el dominio diana es un fragmento variable de cadena simple (scFv). En algunos modos de realización, el dominio diana es un anticuerpo monoclonal (mAb). El mAb puede ser un anticuerpo monoclonal terapéutico. El mAb puede ser un mAb que reconoce un dominio de proteína celular, tal y como se ha descrito en la presente memoria, incluyendo modos de realización del mismo. En algunos modos de realización, el mAb es ipilimumab, lipocalina 2 recombinante modificada, cetuximab, trastuzumab, efalizumab, Etanercept, Adalimumab, Bevacizumab, Gemtuzumab, Infliximab, Natalizumab, Ofatumumab, Panitumumab, Rituximab, Tocilizumab, Abciximab, Ustekinumab, Pertuzumab o Alemtuzumab. En algunos modos de realización, el dominio diana es una proteína de dominio único recombinante (p. ej., molécula affibody).

**[0089]** En algunos modos de realización, el dominio diana es un péptido de unión a albúmina. En algunos modos de realización, el dominio diana aumenta la vida media de la proteína de unión a CTLA-4 dada a conocer en la presente memoria, incluyendo modos de realización de la misma. En los casos en que el dominio diana aumenta la vida media de la proteína de unión a CTLA-4, la vida media de la proteína de unión a CTLA-4 es más larga en presencia de un dominio diana en comparación a en ausencia de un dominio diana. En algunos modos de realización, el dominio diana incluye cualquiera de las proteínas expuestas en la patente US6,277,375.

**[0090]** De acuerdo con la invención, la proteína recombinante de unión a CTLA-4 se expresa de forma recombinante. Una proteína de unión a CTLA-4 puede presentar la fórmula:

## CBDMP-CPL-CBD (I).

En la fórmula (I), CBD es un dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., LCN2 de unión a CTLA-4), CPL es un enlace peptídico escindible, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un sitio de escisión de MMP 9 o de  $\mu$ PA), y CBDMP es un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un péptido de SEQ ID NO:9 o 12). En algunos modos de realización, el extremo C-terminal de CBDMP se conecta al extremo N-terminal de CPL y el extremo C-terminal de CPL se conecta al extremo N-terminal de CBD. En otros modos de realización, el extremo C-terminal de CBD se conecta al extremo N-terminal de CPL y el extremo C-terminal de CPL se conecta al extremo N-terminal de CBDMP. En las figuras 2 y 7, se muestran proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 ilustrativas que presentan dominios de unión a CTLA-4, enlaces peptídicos escindibles y péptidos de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 ilustrativos. En algunos modos de realización, la proteína recombinante de unión a CTLA-4 de la fórmula (I) se une covalentemente a un dominio diana.

**[0091]** En los casos en que la proteína recombinante de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización, la proteína de unión a CTLA-4 puede presentar la fórmula:

## CBDMP-CPL-CBD-DD (II).

En la fórmula (II), DD es un dominio de dimerización, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., IgG<sub>1</sub> Fc), CBD es dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., LCN2 de unión a CTLA-4), CPL es un enlace peptídico escindible, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un sitio de escisión de MMP9 o  $\mu$ PA) y CBDMP es un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un péptido de SEQ ID NO:9 o 12). En algunos modos de realización, el extremo C-terminal de CBDMP se conecta al extremo N-terminal de CPL, el extremo C-terminal de CPL se conecta al extremo N-terminal de CBD y el extremo C-terminal de CBD se conecta al extremo N-terminal de DD. En otros modos de realización, el extremo C-terminal de CBD se conecta al extremo N-terminal de CPL, el extremo C-terminal de CPL se conecta al extremo N-terminal de CBDMP y el extremo C-terminal de CBDMP se conecta al extremo N-terminal de DD. En las figuras 1, 3 y 7, se muestran proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 ilustrativas que presentan dominios de dimerización, dominios de unión a CTLA-4, enlaces peptídicos escindibles y péptidos de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 ilustrativos. En algunos modos de realización, la proteína recombinante de unión a CTLA-4 de la fórmula (II) se une covalentemente a un dominio diana. En modos de realización adicionales, el dominio de dimerización conecta el dominio de unión a CTLA-4 con el dominio diana.

**[0092]** En algunos modos de realización, el CBD no es un ScFv.

**[0093]** En algunos modos de realización, más de una proteína recombinante de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización. En los casos en que más de una proteína recombinante de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización, la proteína de unión a CTLA-4 puede presentar la fórmula:

## CBDMP -CPL-CBD-DD-CBD-CPL-CBDMP (III).

En la fórmula (III), DD es un dominio de dimerización, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., IgG<sub>1</sub> Fc), CBD es un dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., LCN2 de unión a CTLA-4), CPL es un enlace peptídico escindible, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un sitio de escisión de MMP9 o  $\mu$ PA) y CBDMP es un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., un péptido de SEQ ID NO:9 o 12). En las figuras 1 y 7, se muestran proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 ilustrativas que presentan dominios de dimerización, dominios de unión a CTLA-4, enlaces peptídicos escindibles y péptidos de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 ilustrativos. En algunos modos de realización, la proteína recombinante de unión a CTLA-4 de la fórmula (III) se une covalentemente a un dominio diana. En modos de realización adicionales, el dominio de dimerización conecta el dominio de unión a CTLA-4 con el dominio diana.

**[0094]** Las proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 dadas a conocer en la presente memoria pueden formar parte de un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a dos tipos de antígeno diferentes (p. ej., está formado por fragmentos de dos anticuerpos monoclonales diferentes). Los anticuerpos biespecíficos pueden unirse simultáneamente a una célula citotóxica (utilizando un receptor como CD3) y a una célula diana (p. ej., célula tumoral). Ejemplos no limitativos de anticuerpos biespecíficos se exponen en WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)).

Dímero de proteína de unión a CTLA-4

**[0095]** En otro aspecto, se da a conocer un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 que incluye dos dominios de proteína de unión idénticos, incluyendo cada uno de los dominios de proteína de unión (i) un dominio de unión a CTLA-4; (ii) un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4; (iii) un enlace peptídico escindible que conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el dominio

de unión a CTLA-4; y (iv) un dominio de dimerización unido covalentemente al dominio de unión a CTLA-4, donde los dominios de proteína de unión están unidos entre sí. En algunos modos de realización, cada una de las proteínas recombinantes de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio diana. En modos de realización adicionales, el dominio de dimerización conecta el dominio de unión a CTLA-4 con el dominio diana.

5 En algunos modos de realización, los dominios de dimerización de los dominios de proteína de unión son químicamente diferentes. En algunos modos de realización, los dominios de dimerización de los dominios de proteína de unión son idénticos.

**[0096]** El dominio de unión a CTLA-4, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4, el enlace peptídico escindible y el dominio de dimerización incluidos en el dímero de proteína de unión a CTLA-4, pueden ser cualquiera de los dominios de unión a CTLA-4 (p. ej., LCN2 de unión a CTLA-4), los péptidos de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 (p. ej., un péptido de SEQ ID NO:9 o 12), los enlaces peptídicos escindibles (p. ej., un sitio de escisión de MMP9 o  $\mu$ PA) y los dominios de dimerización (p. ej., IgG<sub>1</sub> Fc) descritos en la sección anterior, incluyendo modos de realización de los mismos. Por lo tanto, en algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 es una lipocalina 2 (LCN2) de unión a CTLA-4.

10 **[0097]** De acuerdo con la invención, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

15 **[0098]** En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

**[0099]** En relación con el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, en algunos modos de realización, el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 incluye una señal de secreción de glicoproteína. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67.

**[0100]** Todavía en relación con el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, en algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el extremo N-terminal del dominio de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible conecta el péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el extremo C-terminal del dominio de unión a CTLA-4. En algunos modos de realización, el enlace peptídico escindible incluye un sitio de escisión de proteasa. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de proteasa asociado a tumor. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz (MMP), un sitio de escisión de metaloproteínasa que contiene dominios de desintegrina y metaloproteínasa (ADAM), un sitio de escisión de proteasa de antígeno específico de próstata (PSA), un sitio de escisión de proteasa de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), un sitio de escisión de proteasa de serina proteasa 1 de tipo membrana (MT-SP1) o un sitio de escisión de proteasa de legumain. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz (MMP) es un sitio de escisión de MMP9, un sitio de escisión de MMP13, un sitio de escisión de MMP2 o un sitio de escisión de  $\mu$ PA. En algunos modos de realización, el sitio de escisión de metaloproteínasa que contiene dominios de desintegrina y metaloproteínasa (ADAM) es un sitio de escisión de metaloproteínasa ADAM 9, un sitio de escisión de metaloproteínasa ADAM 10 o un sitio de escisión de metaloproteínasa ADAM 17.

**[0101]** Todavía en relación con el dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, en algunos modos de realización, el dominio de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización. En algunos modos de realización, el dominio de dimerización de un dominio de proteína Fc. En algunos modos de realización, el dominio de proteína Fc es una proteína IgG<sub>1</sub> Fc.

#### ÁCIDOS NUCLEICOS RECOMBINANTES

**[0102]** En otro aspecto, se da a conocer un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína recombinante de unión a CTLA-4 expuesta en la presente memoria. En algunos modos de realización, el ácido nucleico recombinante forma parte de un vector viral. Ejemplos de vectores virales incluyen, sin carácter limitativo, vectores retrovirales, adenovirales, lentivirales y vectores virales adenoasociados. En algunos modos de realización, las moléculas de ácido nucleico se introducen en una célula utilizando un vector retroviral según procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

#### PÉPTIDOS RECOMBINANTES

**[0103]** Los péptidos recombinantes expuestos en la presente memoria son, entre otros, capaces de unirse a, o de mostrar una afinidad de cualquier otra manera con un dominio de unión a CTLA-4, tal y como se da a conocer en la presente memoria, incluyendo modos de realización del mismo. Cuando se une de manera no covalente a un dominio de unión a CTLA-4 expuesto en la presente memoria, el péptido recombinante inhibe o impide de otra manera la actividad o la unión del dominio de unión recombinante a CTLA-4 a su receptor o proteína análogos.

**[0104]** Según otro aspecto, se da a conocer un péptido que incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID

NO:9. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, el péptido incluye una secuencia que presenta aproximadamente un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

**[0105]** En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, la secuencia presenta al menos un 90 % de homología con respecto a SEQ ID NO:14.

**[0106]** En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:1. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:2. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:3. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:4. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:5. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:6. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:7. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:8. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:10. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:11. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:12. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:13. En algunos modos de realización, la secuencia es SEQ ID NO:14.

**[0107]** En algunos modos de realización, el péptido incluye, además, una señal de secreción de glicoproteína. En algunos modos de realización, la señal de secreción de glicoproteína es una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67.

#### 40 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

**[0108]** Las composiciones farmacéuticas dadas a conocer por la presente invención incluyen composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo (p. ej., composiciones descritas en la presente memoria, incluyendo modos de realización o ejemplos), es decir, una cantidad eficaz para conseguir el efecto deseado. La cantidad real eficaz para una aplicación concreta dependerá, entre otras cosas, de la enfermedad que se haya de tratar. Cuando se administran en métodos para tratar una enfermedad, las proteínas recombinantes descritas en la presente memoria contendrán una cantidad de principio activo eficaz para conseguir el resultado deseado; por ejemplo, modular la actividad de una molécula diana y/o reducir, eliminar o ralentizar el progreso de los síntomas de la enfermedad. Los expertos en la materia pueden perfectamente saber cómo determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, especialmente a la luz de la exposición detallada que se proporciona en la presente memoria.

**[0109]** La dosificación y la frecuencia (dosis únicas o múltiples) de administración a un mamífero pueden variar en función de una variedad de factores; por ejemplo, si el mamífero padece otra enfermedad, y su vía de administración: tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal y dieta del destinatario; naturaleza y alcance de los síntomas de la enfermedad que se trate (p. ej., síntomas de cáncer y gravedad de dichos síntomas), tipo de tratamiento simultáneo, complicaciones de la enfermedad que se trata u otros problemas relacionados con la salud. Pueden utilizarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos y compuestos de la invención. Los expertos en la materia saben perfectamente regular y manipular las dosis establecidas (p. ej., frecuencia y duración).

**[0110]** Para cualquier composición (p. ej., la proteína recombinante de unión a CTLA-4 expuesta) descrita en la presente memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones diana serán aquellas concentraciones de compuesto(s) activo(s) que son



capaces de alcanzar los métodos descritos en la presente memoria, medidas mediante la utilización de los métodos descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Como se conoce en la técnica, las cantidades eficaces para su utilización en humanos también pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, puede formularse una dosis para humanos para alcanzar una concentración que ha demostrado ser eficaz en animales. La dosificación en humanos puede ajustarse mediante la monitorización de la eficacia y la regulación de la dosificación hacia arriba o hacia abajo, tal y como se ha descrito anteriormente. Los expertos en la materia saben perfectamente ajustar la dosis para alcanzar la máxima eficacia en humanos a partir de los métodos descritos anteriormente y de otros métodos.

**[0111]** Las dosificaciones pueden variar en función de los requisitos del paciente y del compuesto que se emplea. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica ventajosa en el paciente con el tiempo. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso. La determinación de la dosificación adecuada para una situación particular se encuentra dentro del conocimiento del médico. En general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. A partir de ahí, la dosis se incrementa poco a poco hasta que se alcanza el efecto óptimo en circunstancias.

**[0112]** Las cantidades y los intervalos de dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica concreta que se trata. De esta manera, se conseguirá un régimen terapéutico que se corresponda con la gravedad del estado de la enfermedad del individuo.

**[0113]** Mediante la utilización de la información dada a conocer en la presente memoria, puede planificarse un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause demasiada toxicidad y, aun así, sea eficaz en el tratamiento de los síntomas clínicos manifestados por el paciente concreto. Esta planificación debería implicar la elección cuidadosa del compuesto activo teniendo en cuenta factores como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y la gravedad de efectos secundarios adversos, preferido

**[0114]** En otro aspecto, se da a conocer una composición farmacéutica que incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable y una proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se ha dado a conocer en la presente memoria, o un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se ha dado a conocer en la presente memoria.

**[0115]** "Excipiente farmacéuticamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se refieren a una sustancia que facilita la administración de un agente activo a un sujeto y la absorción por parte de un sujeto y pueden incluirse en las composiciones de la presente invención sin provocar un efecto toxicológico adverso considerable en el paciente. Ejemplos no limitativos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, soluciones salinas normales, solución láctica de Ringer, sacarosa normal, glucosa normal, aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, saborizantes, soluciones salinas (como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, carbohidratos como la lactosa, la amilosa o el almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y colorantes, entre otros. Dichas preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, como lubricantes, conservantes, estabilizadores, humectantes, emulgentes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes y/o aromáticas, entre otros, que no reaccionan negativamente con los compuestos de la invención. Cualquier experto en la materia reconocerá que otros excipientes farmacéuticos son útiles en la presente invención.

**[0116]** El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales derivadas de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos conocidos en la técnica y que incluyen, a modo ilustrativo únicamente: sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, entre otros; y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato, entre otros.

**[0117]** El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como portador, proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin otros portadores, está rodeado por un portador que, por lo tanto, está asociado al mismo. De manera similar, se incluyen obleas y pastillas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, obleas y pastillas pueden utilizarse en formas de dosis sólida adecuadas para su administración oral.

**[0118]** La preparación farmacéutica se encuentra, opcionalmente, en forma de dosis unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación empaquetada, conteniendo el paquete cantidades discretas de preparación, como comprimidos, cápsulas y polvos empaquetados en viales o ampollas. Asimismo, la forma de dosis unitaria puede ser una cápsula, un comprimido, oblea o pastilla por sí solos o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de estos últimos en forma empaquetada. La forma de dosis unitaria puede ser de una dispersión congelada.

## MÉTODOS DE TRATAMIENTO

**[0119]** En otro aspecto, se da a conocer una proteína recombinante de unión a CTLA-4 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad mediada por CTLA-4 en un sujeto que lo necesita. El método incluye la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se ha dado a conocer en la presente memoria, o de una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4, tal y como se ha dado a conocer en la presente memoria.

**[0120]** En algunos modos de realización, la enfermedad mediada por CTLA-4 es cáncer. En algunos modos de realización, la enfermedad mediada por CTLA es un cáncer expuesto en la presente memoria. En algunos modos de realización, el cáncer es leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, osteosarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de piel o cáncer testicular.

**[0121]** Tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "aliviar" se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo, sin carácter limitativo, beneficios terapéuticos y/o beneficios profilácticos. Por beneficio terapéutico, se entiende la erradicación o la mejora del trastorno subyacente que se trata. Asimismo, un beneficio terapéutico se alcanza con la erradicación o la mejora de uno o varios de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente, de tal forma que se observe una mejora en el paciente, a pesar de que el paciente todavía pueda sufrir el trastorno subyacente. Con respecto al beneficio profiláctico, las composiciones pueden ser administradas a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad concreta, o a un paciente que muestra uno o varios de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, aunque no se haya producido todavía un diagnóstico de esta enfermedad. El tratamiento incluye prevenir la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen mediante la administración de una composición protectora antes de la inducción de la enfermedad; contener la enfermedad, es decir, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen mediante la administración de una composición protectora después de la inducción, pero antes de la aparición o reaparición clínica de la enfermedad; inhibir la enfermedad, es decir, frenar el desarrollo de síntomas clínicos mediante la administración de una composición protectora después de su aparición inicial; prevenir la reaparición de la enfermedad y/o mitigar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos mediante la administración de una composición protectora después de su aparición inicial. Por ejemplo, algunos métodos de la presente memoria tratan el cáncer (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, osteosarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de piel (p. ej., carcinoma de células de Merkel), cáncer testicular, leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma). Por ejemplo, algunos métodos de la presente memoria tratan el cáncer al hacer disminuir o reducir o prevenir la aparición, crecimiento, metastásis o evolución del cáncer; o tratan el cáncer haciendo disminuir un síntoma del cáncer. Los síntomas del cáncer (p. ej., cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, osteosarcoma, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de piel (p. ej., carcinoma de células de Merkel), cáncer testicular, leucemia, linfoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma) serían conocidos por un experto en la materia o pueden ser determinados por un experto en la materia.

**[0122]** Tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a un método de reducción de los efectos de uno o varios síntomas de una enfermedad o afección caracterizados por la expresión de la proteasa o síntoma de la enfermedad o afección caracterizada por la expresión de la proteasa. Por lo tanto, en el método expuesto, el tratamiento puede referirse a una reducción de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la gravedad de una enfermedad, afección o síntoma establecidos de la enfermedad o afección. Por ejemplo, un método para tratar una enfermedad se considera como un tratamiento si existe una reducción de un 10 % de uno o varios de los síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier porcentaje de reducción entre un 10 % y un 100 % en comparación con niveles nativos o control. Se entiende que el tratamiento no se refiere necesariamente a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección. Asimismo, tal y como se utiliza en la presente memoria, las referencias a la disminución, reducción o inhibición incluyen un cambio de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o superior en comparación con un nivel control y tales términos pueden incluir, pero no incluyen necesariamente la eliminación completa.

**[0123]** En los casos en los que se contemplan tratamientos de combinación, no se pretende que los agentes (es decir, compuestos de ácido ribonucleico) descritos en la presente memoria estén limitados por la naturaleza particular de la combinación. Por ejemplo, los agentes descritos en la presente memoria pueden administrarse en combinación como mezclas simples, así como híbridos químicos. Un ejemplo de este último caso es cuando el agente está unido covalentemente a un portador diana o a un producto farmacéutico activo. La unión covalente puede conseguirse de diversas maneras, tales como, aunque sin carácter limitativo, el uso de un agente reticulante disponible en el mercado.

**[0124]** Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para conseguir un propósito establecido (p. ej., alcanzar el efecto para el que se administra, tratar una enfermedad, reducir la actividad enzimática, reducir uno o varios síntomas de una enfermedad o afección). Un ejemplo de una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para contribuir al tratamiento, prevención o reducción de un síntoma o síntomas de una enfermedad, que también podría denominarse "cantidad terapéuticamente eficaz". Una "reducción" de un síntoma o síntomas (y equivalentes gramaticales de esta expresión) significa la disminución de la gravedad o frecuencia del síntoma o de los síntomas o la eliminación del síntoma o de los síntomas. Una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que, al ser administrada a un sujeto, presentará el efecto profiláctico deseado; p. ej., prevenir o retrasar el inicio (o la reaparición) de una lesión, enfermedad, patología o afección, o reducir la probabilidad del inicio (o la reaparición) de una lesión, enfermedad, patología o afección, o sus síntomas. El efecto profiláctico total no se produce necesariamente al administrar una dosis y puede producirse solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad profilácticamente eficaz puede ser administrada en una o más administraciones. Una "cantidad que reduce la actividad", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad de antagonista requerida para hacer disminuir la actividad de una enzima o proteína en relación con la ausencia del antagonista. Una "cantidad de interrupción de función", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad de antagonista requerida para interrumpir la función de una enzima o proteína en relación con la ausencia del antagonista. En la literatura, pueden encontrarse directrices en relación con las dosis adecuadas para determinadas clases de productos farmacéuticos. Por ejemplo, para el parámetro dado, una cantidad eficaz mostrará un aumento o una disminución de al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 % o, al menos, un 100 %. La eficacia también puede expresarse como un aumento o una disminución de "veces". Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede presentar al menos un efecto de 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces o más efecto en comparación con un control. Las cantidades exactas dependerán de la finalidad del tratamiento y cualquier experto en la materia podrá averiguarlas utilizando técnicas conocidas (véase, p. ej., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

**[0125]** Tal y como se emplea en la presente memoria, el término "administrar" significa administración oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta; p. ej., una bomba miniosmótica, a un sujeto. La administración se realiza a través de cualquier vía, incluyendo la parenteral y la transmucosa (p. ej., bucal, sublingual, palatal, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, sin carácter limitativo, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc. Por "coadministrar", se entiende que una composición descrita en la presente memoria se administra al mismo tiempo, justo antes de o justo después de la administración de una o más terapias adicionales; por ejemplo, terapias contra el cáncer, como la quimioterapia, la terapia hormonal, la radioterapia o la inmunoterapia. Los compuestos de la invención pueden ser administrados solamente o pueden ser coadministrados al paciente. La coadministración pretende incluir la administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Por lo tanto, las preparaciones también pueden combinarse, en su caso, con otros principios activos (p. ej., para reducir la degradación metabólica). Las composiciones de la presente invención pueden administrarse transdérmicamente, por una vía tópica, formuladas como bastones aplicadores, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, pomadas, pastas, gelatinas, pinturas, polvos y aerosoles.

**[0126]** Las composiciones de la presente invención pueden incluir, adicionalmente, componentes para proporcionar una liberación sostenida y/o comodidad. Dichos componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos portadores de fármaco finamente divididos. Estos componentes se analizan con mayor detalle en las patentes estadounidenses n.º 4,911,920; 5,403,841; 5,212,162; y 4,861,760. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también como microesferas para una liberación lenta en el cuerpo. Por ejemplo, las microesferas pueden administrarse a través de una inyección intradérmica de microesferas que contienen fármaco, que se liberan lentamente subcutáneamente (véase Rao, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995; como formulaciones de gel biodegradables e inyectables (véase, p. ej., Gao *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995); o como microesferas para su administración oral (véase, p. ej., Eyles, *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997). En algunos modos de realización, las formulaciones de las composiciones de la presente invención pueden administrarse con el uso de liposomas, que se fusionan con la membrana celular o permiten la endocitosis, es decir, emplean ligandos de receptor unidos al liposoma que se unen a receptores de proteína membranal de superficie de la célula, dando lugar a la endocitosis. Mediante la utilización de liposomas, concretamente en los casos en que la superficie liposomal porta ligandos de receptor específicos para células diana, o son dirigidos de otra forma preferentemente a un órgano específico, se puede enfocar la administración de las composiciones de la presente invención hacia las células diana *in vivo*. (Véase, p. ej., Al-Muhammed, *J. Microencapsul.* 13:293-306, 1996; Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995; Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989). Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también como nanopartículas.

**[0127]** Mediante la utilización de la información dada a conocer en la presente memoria, puede planificarse un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause demasiada toxicidad y, aun así, sea eficaz en el tratamiento de los síntomas clínicos manifestados por el paciente concreto. Esta planificación debería implicar la elección cuidadosa del compuesto activo teniendo en cuenta factores como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y la gravedad de efectos secundarios adversos, el modo de administración preferido y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

**[0128]** "Agente anticanceroso" se utiliza de acuerdo con su significado simple y ordinario, y se refiere a una composición (p. ej., compuesto, fármaco, antagonista, inhibidor, modulador) que presenta propiedades antineoplásicas o la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación de células. En algunos modos de realización, un agente anticanceroso es un agente identificado en la presente memoria útil en métodos de tratamiento de cáncer. En algunos modos de realización, un agente anticanceroso es un agente aprobado por la FDA (Agencia de Medicamentos y Alimentación de Estados Unidos) u organismo regulador similar de un país diferente de Estados Unidos, para el tratamiento del cáncer.

**[0129]** Las composiciones (p. ej., proteínas recombinantes de unión a CTLA-4) descritas en la presente memoria pueden utilizarse en combinación entre sí, con otros agentes activos conocidos por ser útiles en el tratamiento de un cáncer, tales como agentes anticancerosos.

**[0130]** Algunos ejemplos de agentes anticancerosos incluyen, sin carácter limitativo, inhibidores de MEK (p. ej., MEK1, MEK2 o MEK1 y MEK2) [p. ej., XL518, CI-1040, PD035901, selumetinib/ AZD6244, GSK1120212/ trametinib, GDC-0973, ARRY-162, ARRY-300, AZD8330, PD0325901, U0126, PD98059, TAK-733, PD318088, AS703026, BAY 869766), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosourea, mostazas nitrogenadas (p. ej., mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, melfalán), etilenimina y metilmelaminas (p. ej., hexametilmelamina, tiotepa), alquilsulfonatos (p. ej., busulfán), nitrosoureas (p. ej., carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina), triacenos (decarbocina)), antimetabolitos (p. ej., 5-azatioprina, leucovorina, capecitabina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, análogo de ácido fólico (p. ej., metotrexato), o análogos de pirimidina (p. ej., fluorouracilo, floxuridina, citarabina), análogos de purina (p. ej., mercaptopurina, tioguanina, pentostatina), etc.), alcaloides de plantas (p. ej., vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel, docetaxel, etc.), inhibidores de topoisomerasa (p. ej., irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (p. ej., doxorrubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), compuestos a base de platino (p. ej., cisplatino, oxaloplatino, carboplatino), antraquinona (p. ej., mitoxantrona), urea sustituida (p. ej., hidroxiurea), derivado de metilhidrazina (p. ej., procarbazona), supresor adrenocortical (p. ej., mitotano, aminoglutetimida), epipodofilotoxinas (p. ej., etopósido), antibióticos (p. ej., daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina), enzimas (p. ej., L-asparaginasa), inhibidores de señalización de proteína quinasa activada por mitógeno (p. ej. U0126, PD98059, PD184352, PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, wortmanina, o LY294002, inhibidores de Syk, inhibidores de mTOR, anticuerpos (p. ej., rituxan), gopipol, genasense, polifenol E, clorofusin, ácido transretinoico (ATRA), briostatina, ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), 5-aza-2'-desoxicitidina, ácido transretinoico, doxorrubicina, vincristina, etopósido, gemcitabina, imatinib (Gleevec.RTM.), geldanamicina, 17-N-Alilamino-17-Demetoxigeldanamicina (17-AAG), flavopiridol, LY294002, bortezomib, trastuzumab, BAY 11-7082, PKC412, PD184352, 20-epi-1, 25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidcolina; moduladores del gen de apoptosis; reguladores de apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastato; antagonistas de BCR/ABL; benzocloros; benzoilstaurosporina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; cloros; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cispofirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemnina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; 9-dioxamicina; difenil espiromustina; docosanol; dolasetrón; doxilfluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleño; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; episteride; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina;

clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor de receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; iododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplaquinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatina; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; mannostatina A; marimastato; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinas de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario mal emparejado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; saporina del factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina; mitoxantrona; mofarotena; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; lípido A monofosforilo+pared celular sk de miobacterias; mopidamol; inhibidor de gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en supresor 1 de múltiples tumores; agente anticanceroso de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular de miobacterias; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-benzilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; oracín; inductor de citoquina oral; ormaplatina; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; palauamina; palmitoilirizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato sódico; pentostatina; pentozol; perflubrón; perfosfamida; alcohol perílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanil; hidrocloreuro de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de activador de plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidor de proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de proteína quinasa C; inhibidores de proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilado; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcófitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señal; moduladores de la transducción de señal; proteína de unión a antígeno de cadena sencilla; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatrina 1; esqualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámidas; inhibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglucanos sintéticos; talimustina; yodometilato de tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante del tiroides; etiletiopurpurina de estaño; tirapazamina, bicloruro de titanoceno, topsentina, toremifeno, factor de células madre totipotentes, inhibidores de la traducción, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, trimetrexato, triptorelina, tropisetrón, turosterida, inhibidores de la tirosina quinasa, tirfostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de uroquinasa, vapreótido, variolina B, sistema vector, terapia génica con eritrocitos, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, vinorelbina, vinxaltina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina estimalámero, adriamicina, dactinomicina, bleomicina, vinblastina, cisplatino, acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; ametantrona acetato; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; sodio brequinar; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucil; cirolemicina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziacuona; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de sodio de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; sodio de fostriecina; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxíurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina I1 (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL.sub.2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-la; interferón gamma-lb; iroplatina; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreótido; letrozol;

acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; sodio de lometrexol; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; sodio de metotrexato; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurán; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfíromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; sintraceno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina, agentes que estancan las células en las fases G2-M y/o modulan la formación o la estabilidad de microtúbulos, (p. ej., Taxol.TM (es decir, paclitaxel), Taxotere.TM, compuestos que comprenden la estructura de taxano, Erbulozol (es decir, R-55104), Dolastatin 10 (es decir, DLS-10 y NSC-376128), isetionato de mivobulina (es decir, como CI-980), vincristina, NSC-639829, discodermolida (es decir, como NVP-XX-A-296), ABT-751 (Abbott, es decir, E-7010), altorirtinas (p. ej., altorirtina A y altorirtina C), espongiestatinas (p. ej., espongiestatina 1, espongiestatina 2, espongiestatina 3, espongiestatina 4, espongiestatina 5, espongiestatina 6, espongiestatina 7, espongiestatina 8 y espongiestatina 9), clorhidrato de cemadodina (es decir, LU-103793 y NSC-D-669356), epotilonas (p. ej., epotilona A, epotilona B, epotilona C (es decir, desoxiepotilona A o dEpoA), epotilona D (es decir, KOS-862, dEpoB, y desoxiepotilona B), epotilona E, epotilona F, epotilona B N-óxido, epotilona A N-óxido, 16-aza-epotilona B, 21-aminoepotilona B (es decir, BMS-310705), 21-hidroxiopotilona D (es decir, desoxiepotilona F y dEpoF), 26-fluoroepotilona, auristatina PE (es decir, NSC-654663), soblidotina (es decir, TZT-1027), LS-4559-P (Farmacia, es decir, LS-4577), LS-4578 (Farmacia, es decir, LS-477-P), LS-4477 (Farmacia), LS-4559 (Farmacia), RPR-112378 (Aventis), sulfato de vincristina, DZ-3358 (Daiichi), FR-182877 (Fujisawa, es decir, WS-9885B), GS-164 (Takeda), GS-198 (Takeda), KAR-2 (Academia de Ciencias de Hungría), BSF-223651 (BASF, es decir, ILX-651 y LU-223651), SAH-49960 (Lilly/Novartis), SDZ-268970 (Lilly/Novartis), AM-97 (Armad/Kyowa Hakko), AM-132 (Armad), AM-138 (Armad/Kyowa Hakko), IDN-5005 (Indena), criptoficina 52 (es decir, LY-355703), AC-7739 (Ajinomoto, es decir, AVE-8063A y CS-39.HCl), AC-7700 (Ajinomoto, es decir, AVE-8062, AVE-8062A, CS-39-L-Ser.HCl, y RPR-258062A), vitilevuamida, tubulisina A, canadensol, centaureidina (es decir, NSC-106969), T-138067 (Tularik, es decir, T-67, TL-138067 y TI-138067), COBRA-1 (Instituto Parker Hughes, es decir, DDE-261 y WHI-261), H10 (Universidad Estatal de Kansas), H16 (Universidad Estatal de Kansas), oncocidina A1 (es decir, BTO-956 y DIME), DDE-313 (Instituto Parker Hughes), fijianolida B, laulimalida, SPA-2 (Instituto Parker Hughes), SPA-1 (Instituto Parker Hughes, es decir, SPIKET-P), 3-IAABU (citoesqueleto / Escuela de Medicina Mount Sinai, es decir, MF-569), narcosina (también conocida como NSC-5366), nascapina, D-24851 (Asta Medica), A-105972 (Abbott), hemiasterlina, 3-BAABU (citoesqueleto/ Escuela de Medicina Mount Sinai, es decir, MF-191), TMPN (Universidad Estatal de Arizona), acetilacetato de vanadoceno, T-138026 (Tularik), monsatrol, inanocina (es decir, NSC-698666), 3-IAABE (citoesqueleto/ Escuela de Medicina Mount Sinai), A-204197 (Abbott), T-607 (Tularik, es decir, T-900607), RPR-115781 (Aventis), eleuterobinas (tales como desmetileleuterobina, desaeleleuterobina, isoeleuterobina A y Z-eleuterobina), caribaesol, caribaesol, halicondrina B, D-64131 (Asta Medica), D-68144 (Asta Medica), diazonamida A, A-293620 (Abbott), NPI-2350 (Nereus), tacalonolida A, TUB-245 (Aventis), A-259754 (Abbott), diostostatina, (-)-fenilhistina (es decir, NSCL-96F037), D-68838 (Asta Medica), D-68836 (Asta Medica), mioseverina B, D-43411 (Zentaris, es decir, D-81862), A-289099 (Abbott), A-318315 (Abbott), HTI-286 (es decir, SPA-110, sal de trifluoroacetato) (Wyeth), D-82317 (Zentaris), D-82318 (Zentaris), SC-12983 (NCI), fosfato sódico de resverastatina, BPR-OY-007 (Institutos Nacionales de Investigación Sanitaria) y SSR-250411 (Sanofi), esteroides (p. ej., dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasa, agonistas de hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) tales como goserelina o leuprolida, adrenocorticosteroides (p. ej., prednisona), progestinas (p. ej., caproato de hidroxiprogesterona, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (p. ej., dietilestilbestrol, etinilestradiol), antiestrógeno (p. ej., tamoxifeno), andrógenos (p. ej., propionato de testosterona, fluoximesterona), antiandrógeno (p. ej., flutamida), inmunoestimulantes (p. ej., bacilo de Calmette-Guerin (BCG), levamisol, interleucina-2, alfa-interferón, etc.), anticuerpos monoclonales (p. ej., anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR y anti-VEGF), inmunotoxinas (p. ej., conjugado de caliqueamicina-anticuerpo monoclonal anti-CD33, conjugado de exotoxina pseudomonas-anticuerpo monoclonal anti-CD22, etc.), radioinmunoterapia (p. ej., anti-CD20 anticuerpo monoclonal conjugado con <sup>111</sup>In, <sup>90</sup>Y, o <sup>131</sup>I, etc.), triptolida, homoharringtonina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, topotecán, itraconazol, vindesina, cerivastatina, vincristina, desoxiadenosina, sertralina, pitavastatina, irinotecán, clofazimina, 5-noniloxitriptamina, vemurafenib, dabrafenib, erlotinib, gefitinib, inhibidores de EGFR, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés)-terapia dirigida o terapéutico (p. ej., gefitinib (Iressa™), erlotinib (Tarceva™), cetuximab (Erbix™), lapatinib (Tykerb™), panitumumab (Vectibix™), vandetanib (Caprelsa™), afatinib/BIBW2992, CI-1033/canertinib, neratinib/HKI-272, CP-724714, TAK-285, AST-1306, ARRY334543, ARRY-380, AG-1478, dacomitinib/PF299804, OSI-420/desmetil erlotinib, AZD8931,

AEE788, pelitinib/EKB-569, CUDC-101, WZ8040, WZ4002, WZ3146, AG-490, XL647, PD153035, BMS-599626), sorafenib, imatinib, sunitinib, dasatinib, entre otros. En algunos modos de realización, las composiciones de la presente memoria pueden utilizarse en combinación con agentes auxiliares que pueden no ser eficaces por sí solos, pero pueden contribuir a la eficacia del agente activo en el tratamiento del cáncer.

- 5 **[0131]** En algunos modos de realización, la coadministración incluye la administración de un agente activo dentro de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 o 24 horas después de un segundo agente activo. La coadministración incluye la administración de dos agentes activos de manera simultánea, aproximadamente simultánea (p. ej., dentro de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos después del otro) o de manera secuencial en cualquier orden. En algunos modos de realización, la coadministración puede llevarse a cabo mediante la coformulación, es decir, la  
10 preparación de una única composición farmacéutica que incluye ambos agentes activos. En algunos modos de realización, los agentes activos pueden formularse por separado. En algunos modos de realización, los agentes activos y/o auxiliares pueden unirse o conjugarse entre sí.

#### EJEMPLOS

- 15 **[0132]** Se espera que los resultados y reactivos generados en la presente solicitud tengan repercusión de manera significativa y a corto plazo en los enfoques inmunoterapéuticos del cáncer en estado avanzado. Esto es particularmente pertinente para poblaciones de pacientes que actualmente no son tenidos en cuenta para inmunoterapias de alto riesgo debido a los efectos adversos. Específicamente, los solicitantes consideran que pueden utilizarse bloqueadores de CTLA-4 en pacientes con enfermedad localmente avanzada en riesgo de propagación metastásica.

- 20 **[0133]** En algunos modos de realización, la lipocalina2 modificada (mLcn2) utilizada como antagonista de CTLA-4 (proteína de unión a CTLA-4) en la presente memoria (fig. 1) se une a CTLA-4 murino, primate y humano. Esta circunstancia ofrece versatilidad en las pruebas de diseños alternativos en distintos modelos animales, incluidos mamíferos superiores. Los solicitantes han utilizado secuencias de IgG humana para dimerizar mLcn2 simplificando la detección de este reactivo *in situ* para estudios de biodistribución cruciales, como los que se  
25 presentan en la presente memoria. Los solicitantes han explotado esta circunstancia para manifestar el enmascaramiento eficaz de mLcn2-Fc. Más allá de los antagonistas de CTLA-4 (proteínas de unión a CTLA-4), la tecnología de enmascaramiento puede utilizarse para captar múltiples otros objetivos de interés terapéutico que actualmente son intratables debido a los efectos no deseados severos.

- 30 **[0134]** *Contexto:* La captación de moduladores de control inmunitario en sitios de tumor, pero no en tejidos normales representa un enfoque alternativo y más seguro para obtener respuestas inmunitarias antitumorales eficaces. Específicamente, en modelos murinos, la administración local de una combinación de anticuerpos dirigidos a CTLA-4 y OX40 junto con un agonista de TLR9 (nucleótidos de CpG no metilados) no solo eliminó los tumores en los sitios de inyección, sino que diseminó la enfermedad a distancia. La administración sistémica de los antagonistas de CTLA-4 activados *in vivo* presentada en el presente documento mejora potencialmente este  
35 concepto aún más, puesto que se espera que los antagonistas de CTLA-4 enmascarados se activen en cualquier sitio de tumor, incluidas las metástasis ocultas.

#### *Caracterización y mejora de un antagonista de CTLA-4 recombinante "enmascarado" preferentemente activo en sitios de tumor*

- 40 **[0135]** *Fundamento y significado:* Un objetivo consiste en explotar altos niveles de proteasas extracelulares en el microentorno tumoral (Jamaspishvili, T., *et al.*, 2010. "Urine markers in monitoring for prostate cancer." *Prostate cancer and prostatic diseases* 13:12-19; Hadler-Olsen, E., *et al.*, 2013. "Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets." *Tumour Biol* 34:2041-2051) para activar de manera específica y eficaz un profármaco dirigido a CTLA-4, que conduce a la activación selectiva de células T en el entorno tumoral. Con este fin, los solicitantes han tomado dos enfoques únicos para enmascarar un  
45 bloqueador de CTLA-4 recombinante (mLcn2): 1) una máscara no covalente (tal y como se describe en la solicitud anterior de los solicitantes) y 2) una máscara covalente unida al extremo N-terminal de mLcn2.

- [0136]** *Datos:* La secuencia de mLcn2 fue obtenida del PDB, sintetizada y producida en bacterias. Los péptidos que se unen específicamente a mLcn2 fueron identificados utilizando una biblioteca cíclica 7-mero. Se identificaron ejemplos positivos y la secuenciación de estos resultados indicó un patrón global en las secuencias.  
50 Para caracterizar aún más los péptidos de ejemplo y para garantizar que los péptidos se unían al mismo sitio que CTLA, se realizó un ELISA de competencia utilizando todos los ejemplos (Fig. 2A). A partir de este análisis, se seleccionaron dos péptidos cíclicos, se sintetizaron químicamente y se caracterizaron mediante SPR (Fig. 2B) y cristalografía. Se obtuvieron cristales de difracción de pocillo para ambos complejos (1,95 y 2,15 Å) y se refinaron ( $R/R_{\text{libre}}$  de 18,0/22,5 % y 16,5/18,5 % y sin ningún valor atípico de Ramachandran). La superposición de las  
55 estructuras indicaba que los péptidos, en efecto, se unían a la misma posición que CTLA-4, pero cada uno de manera ligeramente diferente. El diseño del enlace fue auxiliado por el análisis de la estructura cristalina de la lipocalina.

- [0137]** A partir de estos datos, los solicitantes eligieron el péptido 16, lo fusionaron con el extremo N-terminal de mLcn2 y lo fusionaron con el extremo N-terminal de un dominio IgG1 Fc a través de un enlace flexible (fig. 1 y fig.  
60 3A). La adición de Fc al extremo C-terminal creó un antagonista de CTLA-4 bivalente de alta afinidad que ofrece

diversas ventajas en determinados contextos. Por ejemplo, muchos componentes biológicos logran una alta afinidad y especificidad a través de la multivalencia. Adicionalmente, la máscara no covalente que podría ser liberada al reducir la valencia de la máscara. Además, la Fc aumenta la masa por encima del umbral renal. Como ventaja añadida, la Fc facilita los esfuerzos de purificación. El constructo fue producido con un rendimiento elevado (>50 mg/L) y se purificó inmediatamente de los medios. Como control, se generaron dos constructos adicionales - uno sin una máscara fusionada con el extremo N-terminal (control positivo - mLcn2 vacía) y uno en el que el sitio de escisión de MMP9 fue mutado (control negativo). De ahora en adelante, los solicitantes utilizarán, de manera intercambiable, mLcn2 y mLcn2-Fc.

**[0138]** La mLcn2 enmascarada se caracterizó *in vitro* mediante cromatografía de exclusión por tamaños y análisis SPR (fig. 3 C/D). Mezclas de la mLcn2 enmascarada y una CTLA-4 bivalente recombinante (también fusionada con la IgG1 Fc humana) fueron incubadas y aplicadas a una columna analítica. En ausencia de MMP9, la combinación eluyó en la misma posición que los componentes individuales. No obstante, la incubación con MMP9 condujo a una elución más temprana, lo que indicaba la formación de un complejo heterodimérico. No se observó ningún cambio con control de mLcn2 enmascarada con MMP9 mutada y CTLA-4-Fc (fig. 3B). Se obtuvieron resultados similares utilizando SPR (fig. 3C). En estos estudios, CTLA-4 monomérico fue atado químicamente al chip y la mLcn2 enmascarada, la mLcn2 enmascarada con escisión de MMP y la n-mLcn2 (sin fusión de extremo N-terminal) fueron pasadas por encima del chip. Estos datos indican que el péptido 16 fusionado con la mLcn2 bloquea de forma eficaz CTLA-4, pese a existir una diferencia considerable de afinidad (p. ej., la fusión del péptido con mLcn2 crea, de forma eficaz, una concentración "infinita" del péptido en el sitio de unión).

**[0139]** Las pruebas *in vivo* de la mLcn2 desenmascarada, enmascarada y tratada con MMP9 revelaron la localización preferente de todas las variantes de mLcn2, a excepción del constructo no escindible enmascarado en masas tumorales, determinado mediante IHC (fig. 4). En estos experimentos, los constructos fueron inyectados *in vivo* en ratones C57/B16 con melanomas B16. Tres días después de la inyección, se recogieron muestras de tumor y de tejido y se tiñeron doblemente utilizando anticuerpos que reconocen CD4 o CD8 y mLcn2 (p. ej., IgG-Fc humana). Las membranas tanto de las células T intratumorales CD4+ como CD8+ fueron decoradas con mLcn2, que no fue detectada en otros tipos de células. Cabe destacar que se observó muy poca reactividad o ninguna reactividad en los tejidos tumorales que utilizaban la mLcn2 enmascarada no escindible. Asimismo, en consonancia con la investigación previa utilizando anticuerpos CTLA-4 (Iwama, S., *et al.*, 2014. "Pituitary expression of CTLA-4 mediates hypophysitis secondary to administration of CTLA-4 blocking antibody." *Sci Transl Med* 6:230ra245), los solicitantes observaron reactividad de mLcn2 con células no inmunitarias en las glándulas pituitarias (fig. 5). Por último, los constructos de mLcn2 enmascarados y desenmascarados unidos a células negativas CD4/CD8 en el bazo (no mostrado) potencialmente debido a la unión de FcR (véase el análisis sobre más mejoras de diseño a continuación).

**[0140]** Una versión del profármaco de CTLA-4 enmascarado contenía un enlace "mínimo" entre el péptido de enmascaramiento y la mLcn2. Mediante la utilización de la estructura cristalina, se utilizó el paquete de Schrodinger para modelar la "conformación" de enlace. Aunque el enlace puede ser flexible y accesible (p. ej., puede escindirse específicamente con MMP9 recombinante), este ejercicio de modelado indica que puede existir impedimento estérico, lo que podría reducir el acceso a la proteasa y la escisión eficaz de la máscara en los tejidos. Se prevé que los enlaces alternativos mostrados en la figura 6 hagan que el sitio de proteasa sea más accesible a solvente. Puede utilizarse cromatografía de exclusión por tamaños y SPR para evaluar la eficacia de enmascaramiento (véase la figura 3). La eficacia de escisión por MMP9 para cada constructo puede cuantificarse mediante espectrometría de masas. Cada constructo enmascarado se expone con MMP9 y se utiliza espectrometría para identificar los productos de escisión. Al garantizar que se genera la máscara de péptido escindido pronosticada, un producto peptídico sintético, que incorpora <sup>15</sup>N en el péptido, será producido. A continuación, distintas concentraciones de constructo no marcado serán tratadas individualmente con MMP9 y la reacción detenida con ácido trifluoroacético en momentos específicos. Las muestras detenidas serán enriquecidas con una concentración conocida del péptido marcado <sup>15</sup>N y sometidas a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización y desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) para determinar la cantidad de producto escindido liberado (Gao, W., *et al.*, 2006. "Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19099-19104; Guitot, K., *et al.*, 2014. "Label-free measurement of histone lysine methyltransferases activity by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Anal Biochem* 456:25-31). Los índices serán determinados mediante la realización de mediciones en diferentes intervalos de tiempo. La determinación de estos índices para cada constructo proporcionará información crucial con respecto a limitaciones estéricas del agente biológico y de enmascaramiento. Asimismo, la combinación de estos datos con datos de biodistribución *in vivo* (véanse las figuras 4 y 5, y la sección C.5.4) permitirá obtener conocimientos generales y valiosos sobre la generación de profármacos.



Tabla 1:

Proteasa asociada a tumor	Secuencia de sustrato	Ref.
PSA	HSSKLQ (SEQ ID NO:28)	Singh, P., <i>et al.</i> , 2009. "Molecular insights into substrate specificity of prostate specific antigen through structural modeling." <i>Proteins</i> 77:984-99)
PSMA	DEEEE (SEQ ID NO:29)	Denmeade, S.R., <i>et al.</i> 2012. "Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy." <i>Science translational medicine</i> 4:140ra18)
Legumain	AAN (SEQ ID NO:30)	Liu, Z., <i>et al.</i> 2014. "Legumain protease-activated TAT-liposome cargo for targeting tumours and their microenvironment." <i>Nat Commun</i> 5:4280
$\mu$ PA	SGRSA (SEQ ID NO:31)	(Ke, S.H., <i>et al.</i> , 1997. "Optimal subsite occupancy and design of a selective inhibitor of urokinase." <i>J Biol Chem</i> 272:20456-20462
Catepsina B	GFLG (SEQ ID NO:32)	Biniossek, M.L., <i>et al.</i> , 2011. "Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S." <i>J Proteome Res</i> 10:5363-5373
Proteína asociada a fibroblasto	ASGPAGPA (SEQ ID NO:33)	Brennen, W.N., <i>et al.</i> , S.R. 2012. "Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug." <i>J Natl Cancer Inst</i> 104:1320-1334; Brennen, W.N., <i>et al.</i> , 2012. "Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy." <i>Mol Cancer Ther</i> 11:257-266)

**[0141]** Pese a que la MMP9 fuera inicialmente seleccionada por su prevalencia en diversas formas tumorales y, específicamente, los modelos tumorales que se investigan en la presente memoria, existen diversas proteasas sobreexpresadas en el estroma tumoral y una o varias pueden diferenciar mejor entre la activación tumoral y fuera del objetivo del profármaco. Esto incluye la secuencia para antígeno específico de próstata (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), legumain,  $\mu$ PA, catepsina B y proteína de activación de fibroblasto (tabla 1). Cada proteasa puede obtenerse comercialmente. La información obtenida anteriormente puede utilizarse para ubicar el sustrato en el enlace. Puesto que los sustratos presentan distintas longitudes, los solicitantes repetirán el sustrato (p. ej., AANAANAAN para legumain) y o añadirán glicinas para mantener una longitud de enlace comparable para cada constructo. Asimismo, dos sitios de proteasa en el enlace pueden ser más eficaces que un único sitio de proteasa. Por ejemplo, un enlace PSA-PSMA, HSSKLQDEEEE podría utilizarse para el cáncer de próstata. Como se ha explicado anteriormente, cada uno puede caracterizarse mediante cromatografía de exclusión por tamaños y SPR para garantizar que cada uno se enmascara de manera adecuada. Asimismo, la actividad de escisión de cada uno para cada proteasa puede cuantificarse mediante la utilización de espectrometría de masas, también como se ha descrito anteriormente. Además, la actividad de cada constructo enmascarado contra cada proteasa proporcionará información sobre la reactividad cruzada.

**[0142]** En un intento por mejorar la afinidad de la máscara, puede utilizarse un péptido de mayor afinidad. Alternativamente, la interacción puede "madurarse" de manera específica. Esto puede conseguirse mediante la adición de dos residuos al extremo N-terminal del péptido de enmascaramiento codificando cada aminoácido y

seleccionando una mayor afinidad. De la misma manera, los veinte residuos en el extremo C-terminal del péptido pueden codificarse y seleccionarse para un péptido de mayor afinidad.

LISTA DE SECUENCIAS INFORMAL

[0143]

5 **Tabla 2:** Identificación de péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4. Véase la figura 2.

<b>N.º de péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
6	CEKWFRFMC	5
9	CVTGFFLC	7
12	CSVLPPFMC	9
19	CSVLLPFMC	13
16	CWSPLPFMC	12
11	CPRPLYWLC	8
3	CFTPWPEAC	3
20	CFHAPWAPC	14
13	CNNYKGGRC	10
4	CWPEWDLWC	4
15	CLPEISFLC	11
2	CRIDERLQC	2
8	CYLELMHSC	6
1	CYGLGFNFC	1

Pep##-protease\_site-mLCN2-Fc

# ES 2 789 351 T3

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggettcaataaggaacacacaagcaagatggta  
agcgetattgttttatatgtgcttttggcggcgggcggeattctgcctttgcggggga  
tctgttacggattaggtttcaacttctgtggcggtagtgtcccgtgtcgtctgatagt  
ggatcccaggactctaccagcgacctgatccccgcaccaccgctgtctaaggtgccactg  
cagcaaaacttccaggacaatcaatttcaaggtaaatggtacgtggtcggcctggctgga  
aacctgatcctgcgcgacgatcagcatcctatgaatatgtacgcgactatztatgaactg  
aaggaagacaaaagctacaacgttacctccgtgatctcttcacacaagaaatgcaaatat  
acgattgccaccttctgtcggggaagccagcctggcgagtttaccctgggcaatatcaag  
tcttacggagacaaaacctcatatctggtgcgcgttgtgtccactgattacaaccaatat  
gcagtcgttttcttaagctggcgaagataatgcagagttctttgccatcaccatttat  
ggccgtaactaaggagctggccagcgaactgaaagagaacttcattcgttttagtaaatcg  
ctgggctgccagagaatcacattgttttccctgtccccattgaccagtgattgacggc  
tctagatcaggtggcacctcaggtggcggtagtgtcccggggtcggggtctagtgttgcg  
accagcggctccggtaaaagctccgagggcagcggccaagcttcgaccataacctgccca  
ccatgtccagctcctgaactgctgggtggtccaagcgtgttctgtttccgctaagcct  
aaagacacctgatgatcagcctgaccccagaggtcacctgcgtggtcgttgacgtttcc  
cacgaagatccagaggtcaagttcaactggtacgtggatggcgttgaagtgcataatgct  
aagacaaaacccctggaagagcagtaacaactctacctatcgcgtggtctcagtcctgacc  
gttctgcaccaggactggctgaacggcaagagataaagtgcaaaagtctctaataaggcg  
ctgcccgcaccaatcgaaaaaacatttcaaggcgaagggtcagccccgtgagccacag  
gtttacacctgcccccaagtcgcgacgaaactgaccaagaaccaggtgtcgtgacctgt  
ctgggtcaaggettctatccgtctgatattgcagtggaatgggagtcaaatggtcagcct  
gagaacaattacaagaccaccccgctgtctggactccgatggctctttctttctgtat  
agcaagctgaccgtggataaatcccgtggcagcagggtaacgtgttcagctgctcagtg  
atgcatgaagccctgcacaatcattacaccagaagagctctgtcgtgagccccgggtaa  
taa (SEQ ID NO:15)

## Pep##-protease\_site-mLCN2-Fc

M L L V N Q S H Q G F N K E H T S K M V  
S A I V L Y V L L A A A A H S A F A A G  
S C Y G L G F N F C G G S V P L S L Y S  
G S Q D S T S D L I P A P P L S K V P L  
Q Q N F Q D N Q F H G K W Y V V G L A G

# ES 2 789 351 T3

N R I L R D D Q H P M N M Y A T I Y E L  
K E D K S Y N V T S V I S S H K K C E Y  
T I A T F V P G S Q P G E F T L G N I K  
S Y G D K T S Y L V R V V S T D Y N Q Y  
A V V F F K L A E D N A E F F A I T I Y  
G R T K E L A S E L K E N F I R F S K S  
L G L P E N H I V F P V P I D Q C I D G  
S R S G G T S G G G S V P G S G S S G S  
T S G S G K S S E G S G Q A S T H T C P  
P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P  
K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A  
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A  
L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q  
V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C  
L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y  
S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V  
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

(SEQ ID NO:16)

## Pep01-MMP9-mLCN2-IgG1

AGSCYGLGFN FCGGSVPLSL YSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKWYVVGL  
AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN  
IKSYGDKTSY LVRVSTDYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSGETSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:17)

## Pep02-MMP9-mLCN2-IgG1

AGSCRIDETL QCGGSVPLSL YSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKWYVVGL  
AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN  
IKSYGDKTSY LVRVSTDYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSGETSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:18)

## Pep04-MMP9-mLCN2-IgG1

AGSCWPEWDL WCGGSVPLSL YSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKWYVVGL  
AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN  
IKSYGDKTSY LVRVSTDYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSGETSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT  
CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:19)

**Pep12-MMP9-mLCN2-IgG1**

AGSCSVLPPF MCGGSVPLSL YSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWVVG  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSRGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:20)

**Pep16-MMP9-mLCN2-IgG1**

AGSCWSPLPF MCGGSVPLSL YSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWVVG  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSRGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:21)

**Pep16-Mxx9-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión de MMP inactivo)**

AGSCWSPLPF MCGGSVPGSG SSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWVVG  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSRGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:22)

**Pep16-uPA-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión para uPA, MT-SP1 y legumain)**

AGSCWSPLPF MCGSLSGRS DNHSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWVVG  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSRGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:23)

**Pep16-PSA-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión para PSA)**

AGSCWSPLPF MCGGSHSSKL QLGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWVVG  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSRGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:24)

**Pep16-ADAM17-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión para ADAM9, ADAM10,**

ADAM17) AGSCWSPLPF MCGSPLAQAV RSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWYVGL  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN IKSYGDKTSY  
 LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS KSLGLPENHI VFPVPIDQCI  
 5 DGSRSGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR  
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
 KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP  
 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:25)

Pep16-MMP13-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión para MMP13)

AGSCWSPLPF MCGSGSPLGM RSGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWYVGL  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:26)

10 Pep16-MMP2-mLCN2-IgG1 (sitio de escisión para MMP2)

AGSCWSPLPF MCGGSNLAYY TAGSQDSTSD LIPAPPLSKV PLQQNFQDNQ FHGKQWYVGL  
 AGNRILRDDQ HPMNMYATIY ELKEDKSYNV TSVISSHKKC EYTIATFVPG SQPGEFTLGN  
 IKSYGDKTSY LVRVVDSTYN QYAVVFFKLA EDNAEFFAIT IYGRTELAS ELKENFIRFS  
 KSLGLPENHI VFPVPIDQCI DGSRSGGTSG GGSVPGSGSS GSTSGSGKSS EGSGQASTHT  
 CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF  
 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO:27)

HSSKLQ (SEQ ID NO:28).

DEEEE (SEQ ID NO:29).

15 AAN (SEQ ID NO:30).

SGRSA (SEQ ID NO:31).

GFLG (SEQ ID NO:32).

ASGPAGPA (SEQ ID NO:33)

mLCN2

Q D S T S D L I P A P P L S K V P L  
 Q Q N F Q D N Q F H G K W Y V V G L A G  
 N R I L R D D Q H P M N M Y A T I Y E L  
 K E D K S Y N V T S V I S S H K K C E Y  
 T I A T F V P G S Q P G E F T L G N I K  
 S Y G D K T S Y L V R V V S T D Y N Q Y  
 A V V F F K L A E D N A E F F A I T I Y  
 G R T K E L A S E L K E N F I R F S K S

20 L G L P E N H I V F P V P I D Q C I D G (SEQ ID NO:34)

señal de secreción de gp67

M L L V N Q S H Q G F N K E H T S K M V  
 S A I V L Y V L L A A A A H S A F (SEQ ID NO:35)

A1R-Pep16-MMP9-mLCN2-Fc

## ES 2 789 351 T3

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggcttcaataaggaacacacaagcaagatggtaagcgctattgtttta  
tatgtgcttttggcgggcgggcgccattctgcctttgcgCGgggATCCTGttGGagTCcaTTACcTTcATGTgt  
ggcggtagtgtcccgtgtcgctgtatagtgatcccaggactctaccagcgacctgatccccgcaccaccgctg  
tctaaggtgccactgcagcaaaacttccaggacaatcaatttcacggtaaatggtacgtggtcggcctggctgga  
aacgctatcctgcgcgacgatcagcatcctatgaatatgtacgcgactatttatgaactgaaggaagacaaaagc  
tacaacgttacctccgtgatctcttcacacaagaaatgcgaatatacgattgccaccttcgtgccgggaagccag  
cctggcgagtttaccctgggcaatatacaagtcttacggagacaaaacctcatatctggtgcgcgcttgtgtccact  
gattacaaccaatatgcagtcgcttttcttttaagctggcggaagataatgcagagttctttgccatcaccatttat  
ggccgtaactaaggagctggccagcgaactgaaagagaacttcattcgcttagtaaatcgctgggctgccagag  
aatcacattgtttccctgtcccattgaccagtgattgacggctctagatcaggtggcacctcaggtggcggt  
agtgtcccgggctcggggtctagtggttcgaccagcggtccggtaaaagctccgagggcagcggccaagcttcg  
accatacctgccaccatgtccagctcctgaactgctgggtggtccaagcgtgttctgtttccgctaagcct  
aaagacaccctgatgatcagccgtacccagaggtcacctgctggtcgttgacgtttcccacgaagatccagag  
gtcaagttcaactggtacgtggatggcgttgaagtgcataatgctaaagacaaaccccgtaagagcagtaaac  
tctacctatcgctggtctcagtcctgaccgttctgcaccaggactggctgaacggcaaagagataaagtgcaaa  
gtctctaaataaggcgctgcccgcaccaatcgaaaaaacatttcaaaggcgaagggtcagccccgtgagccacag  
gtttacaccctgcccccaagtgcgcgacgaactgaccaagaaccaggtgtcgctgacctgtctggtcaaaggcttc  
tatccgtctgatattgcagtggaatgggagtcfaatggctcagcctgagaacaattacaagaccaccctcctgtt  
ctggactccgatggctctttcttctgtatagcaagctgaccgtggataaatcccgtggcagcagggtaacgtg  
ttcagctgctcagtgatgcatgaagccctgcacaatcattacaccagaagagctctgtcgctgagccccgggtaa  
taa (SEQ ID NO:36).

### A1R-Pep16-MMP9-mLCN2-Fc

MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSFARGSCWSPLPFMCGGSVPLSLYSGSQDSTSDLIPAPPL  
SKVPLQQNFQDNQFHGKWyVVGLAGNRI LRDDQHPMNYATIYELKEDKSYNVTSVISSHKCEYTIATFVPGSQ  
PGEFTLGNIKSYGDKTSLVRRVSTDYNYAVVFFKLAEDNAEFFAITIYGRKELASELKENFIRFSKSLGLPE  
NHIVFPVPIDQCIDGSRSGGTSGGGSVPGSGSGSTSGSGKSSEGSQASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMSIRIPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:37).

### Pep16-uPA-mLCN2-Fc

## ES 2 789 351 T3

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggttcaataaggaacacacaagcaagatggtaagcgctattgtttta  
tatgtgcttttggcgggcgccgattctgectttgcgcgggATCCTGttGGagTCcaTTACcTtATGTgt  
ggcggtagtCtcTcTGGTAGgTCTGataAtCACtcccaggactctaccagcgacctgatccccgcaccaccgctg  
tctaaggtgccactgcagcaaaacttccaggacaatcaatttcacggtaaatggtacgtggtcggcctggetgga  
aaccgtatcctgcgcgacgatcagcatcctatgaatgtacgcgactatttatgaactgaaggaagacaaaagc  
tacaacgttacctccgtgatctcttcacacaagaaatgcgaatatacgattgccaccttcgtgccgggaagccag  
cctggcgagttaccctgggcaatcaagctctacggagacaaaacctcatatctggtgcgcggttctgtccact  
gattacaaccaatgtcagtcggtttcttttaagctggcggaagataatgcagagttctttgccateaccatttat  
ggccgtaactaaggagctggccagcgaactgaaagagaacttcattcgcttagtaaatcgctgggctgccagag  
aatcacattgtttccctgtccccattgaccagtgatgtacggctctagatcaggtggcacctcaggtggcggt  
agtggtcccggggtcggggtctagtggttcgaccagcggtccggtaaaagctccgagggcagcggccaagcttcg  
accatacctgcccaccatgtccagctcctgaactgctgggtggtccaagcgtgttcctgtttccgctaagcct  
aaagacaccctgatgatcagccgtaccacagaggtcacctgctggtcgttgacgtttcccacgaagatccagag  
gtcaagttcaactggtacgtggatggcgttgaagtgcataatgctaaagacaaaccccgtaagagcagtaaac  
tctacctatcgcggtggtctcagtcctgaccgttctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtataagtgcaaa  
gtctctaataaggcgctgcccgaccaatcgaaaaaacatttcaaaggcgaagggtcagccccgtgagccacag  
gtttacacctgcccccaagtcgacgacgaactgaccaagaaccaggtgtcgctgacctgtctggtcaaaggcttc  
tatccgtctgatattgcagtggaatgggagtcfaatggcagcctgagaacaattacaagaccaccgctgtt  
ctggactccgatggetctttctttctgtatagcaagctgaccgtggataaatcccgctggcagcagggtaacgtg  
ttcagctgctcagtgatgcatgaagccctgcacaatcattacaccagaagagtctgtcgctgagccccgggtaaa  
taa (SEQ ID NO:38).

### Pep16-uPA-mLCN2-Fc

MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSFAAGSCWSPLPFMCGGSLSGRSDNHSQDSTSDLIPAPPL  
SKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGLAGNRI LRDDQHFMNMYATIYELKEDKSYNVTSVISSHKKEEYTIATFVPGSQ  
PGEFTLGNIKSYGDKTSLVRRVSTDYNYAVVFFKLAEDNAEFFAITIYGRTELASELKENFIRFSKSLGLPE  
NHIVFPVPIDQCIDGSRSGGTSGGGSPVSGSGSGSTSGSGKSSEGSQASTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK  
KDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39).

### Pep16-PSA-mLCN2-Fc



## ES 2 789 351 T3

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggcttcaataaggaacacacaagcaagatggtaagcgctattgtttta  
tatgtgcttttggcgggcgcgccattctgcctttgcgcgggATCCTGttGGagTCcaTTACcTtATGTgt  
ggcggtagtTCcAAgTACCAGctgtatagtgatcccaggactctaccagcgacctgatccccgcaccaccgctg  
tctaaggtgccactgcagcaaaacttccaggacaatcaatttcacggtaaatggtacgtggtcggcctggctgga  
aacctatcctgcgcgacgatcagcatcctatgaatatgtacgcgactatttatgaactgaaggaagacaaaagc  
tacaacgttacctccgtgatctcttcacacaagaaatgcgaatatacgattgccaccttcgtgccgggaagccag  
cctggcgagtttaccctgggcaatatacaagtcttaccggagacaaaacctcatatctggtgcgcggttgtgctcact  
gattacaaccaatatgcagtcgctttcttttaagctggcggaagataatgcagagttctttgccatcaccatttat  
ggcctactaaggagctggccagcgaactgaaagagaacttcattcgcttagtaaatcgctgggcctgccagag  
aatcacattgtttccctgtccccattgaccagtgatagcggtctagatcaggtggcacctcaggtggcggt  
agtgtcccggggtcggtgctagtggttcgaccagcggtccggtaaaagctccgagggcagcggccaagcttcg  
accatacctgccaccatgtccagctcctgaactgctgggtggtccaagcgtgttctgtttccgctaagcct  
aaagacacctgatgatcagccgtaccagaggtcacctgcgtggtcgtgacgtttcccacgaagatccagag  
gtcaagttcaactggtacgtggatggcgttgaagtgcataatgctaaagacaaaccccgtaagagcagtaaac  
tctacatatcgctggtctcagtcctgaccgttctgcaccaggactggctgaacggcaaagagataaagtgcaaa  
gtcttaataaggcgtgcccgaccaatcgaaaaaccatttcaaaggcgaagggtcagccccgtgagccacag  
gtttacacctgcccccaagtgcgcgacgaactgaccaagaaccaggtgtcgctgacctgtctggtcaaggcttc  
tatccgtctgatattgcagtggaatgggagtc aaatggtcagcctgagaacaattacaagaccaccccgctgtt  
ctggactccgatggctctttctttctgtatagcaagctgaccgtggataaatcccgtggcagcagggtaacgtg  
ttcagctgctcagtgatgcatgaagccctgcacaatcattacaccagaagagctctgtcgctgagccccgggtaa  
taa (SEQ ID NO:40).

### Pep16-PSA-mLCN2-Fc

MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSFAAGSCWSPLPFMCGGSSKYQLYSGSQDSTSDLIPAPPL  
SKVPLQNFQDNQFHGKWYVVGLAGNRI LRDDQHPMNYATIYELKEDKSYNVTSVISSHKCEYTIATFVPGSQ  
PGEFTLGNIKSYGDKTSLVRRVSTDYNYAVVFFKLAEDNAEFFAITIYGRKELASELKENFIRFSKSLGLPE  
NHIVFPVPIDQCIDGSRSGGTSGGGSVPVSGSGSGSTSGSGKSSEGSQASTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:41).

### Pep16-MMP9-NGAL-Fc

## ES 2 789 351 T3

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggcttcaataaggaacacacaagcaagatggtaagcgctattgtttta  
tatgtgcttttggcgggcgcgcgcttctgcctttgcggcgggATCCTGttGGagTCcaTTACcTTcATGTgt  
ggcggtagtgtcccgtgtcgctgtatagtggatcccaggactctaccagcgacctgatccccgcaccaccgctg  
tctaaggtgccactgcagcaaaacttcaggacaatcaatttcacggtaaatggtacgtggtcggcctggctgga  
aacctatcctgcgcgacgatcagGatcctCAgaatatgtacgcgactatttatgaactgaaggaagacaaaagc  
tacaacgttacctccgtgatctcttcacacaagaaatgcgaatatacgattgccaccttcgtgccgggaagccag  
cctggcgagtttaccctgggcaatatacaagtcttacggagacaaaacctcatatctggtgcgcggttgtgctcact  
gattacaaccaatatgcagtcgctttctttt aagAAggcgTCaCaGaatgcagagttctttgccatcaccatttat  
ggcctactaaggagctggccagcgaactgaaagagaacttcattcgctttagtaaatcgctgggcctgccagag  
aatcacattgtttccctgtccccattgaccagtgatgacggctctagatcaggtggcacctcaggtggcggt  
agtgtcccgggtcggggtctagtggttcgaccagcggtccggtaaaagctccgagggcagcggccaagcttcg  
accatacctgccaccatgtccagctcctgaactgctgggtggtccaagcgtgttctgtttccgcctaagcct  
aaagacacctgatgatcagccgtacccagaggtcacctgcgtggtcgtgacgtttcccacgaagatccagag  
gtcaagttcaactggtacgtggatggcgttgaagtgcataatgctaagaccaaaccctggaagagcagtaaac  
tctacctatcgcggtgtcagtcctgaccgttctgcaccaggactggctgaacggcaaagagataaagtgcaaa  
gtcttaataaggcgtgcccgcaccaatcgaaaaaccatttcaaaggcgaagggtcagccccgtgagccacag  
gtttacacctgcccccaagtgcgcgacgaactgaccaagaaccaggtgtcgctgacctgtctggtcaaaggcttc  
tatccgtctgatattgcagtggaatgggagtc aaatggtcagcctgagaacaattacaagaccaccctcctgtt  
ctggactccgatggctctttctttctgtatagcaagctgaccgtggataaatcccgtggcagcagggttaacgtg  
ttcagctgctcagtgatgcatgaagccctgcacaatcattacaccagaagagctgtgctgctgagccccgggtaaa  
taa (SEQ ID NO:42).

### Pep16-MMP9-NGAL-Fc

MLLVNQSHQGFNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSFAAGSCWSPLPFMCGGSVPLSLYSGSQDSTSDLIPAPPL  
SKVPLQQNFQDNQFHGKWIYVVGLAGNRILRDDQDFQNMAYATIYELKEDKSYNVTSVISSHKKEEYTIATFVPGSQ  
PGEFTLGNIKSYGDKTSLVLRVVS TDYNQYAVVFFKKASQNAEFFAITIIYGRTKELASELKENFIRFSKSLGLPE  
NHIVFPVPIDQCIDGSRSGGTSGGSVPGSGSSGTSVSGSKSSEGSQASHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV  
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43).

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:44).

5 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLI (SEQ ID NO:45).

GGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:46).

GGSVPGSGSSGG (SEQ ID NO:47).

GGSGGSVPLSLY (SEQ ID NO:48).

GGSGGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:49).

10 SGGGSGGGSVPLSLYSGG (SEQ ID NO:50).

SGGGSGGGSVPLSLYSGGSGG (SEQ ID NO:51).

YGLGFNF (SEQ ID NO:52).

RIDETLQ (SEQ ID NO:53).

FTPWPEA (SEQ ID NO:54).

15 WPEWDLW (SEQ ID NO:55).

EKWFRFM (SEQ ID NO:56).

YLELMHS (SEQ ID NO:57).

SVLPPFM (SEQ ID NO:58).

WSPLPFM (SEQ ID NO:59).

## REIVINDICACIONES

1. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 que comprende:
  - (i) un dominio de unión a CTLA-4;
  - (ii) un péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4; y
  - (iii) un enlace peptídico escindible que conecta dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con dicho dominio de unión a CTLA-4;

donde dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 comprende una secuencia que presenta o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.
2. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho dominio de unión a CTLA-4 es una lipocalina 2 de unión a CTLA-4 (LCN2).
3. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicha secuencia de dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 es SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12, o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12.
4. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 comprende una señal de secreción de glicoproteína, tal como una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67, una señal pELB, un receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humano (GM-CSFR) o una secuencia de señales de cadena alfa (CAR).
5. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho enlace peptídico escindible conecta dicho péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 con el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de dicho dominio de unión a CTLA-4.
6. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho enlace peptídico escindible comprende un sitio de escisión de proteasa, opcionalmente donde dicho sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de proteasa asociado a tumor.
7. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho sitio de escisión de proteasa es un sitio de escisión de metaloproteinasa de matriz (MMP), tal como un sitio de escisión de MMP9, un sitio de escisión de MMP 13 o un sitio de escisión de MMP 2, un sitio de escisión de metaloproteinasa que contiene dominios de desintegrina y metaloproteinasa (ADAM), tal como un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 9, un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 10 o un sitio de escisión de metaloproteinasa ADAM 17, un sitio de escisión de proteasa de antígeno específico de próstata (PSA), un sitio de escisión de proteasa de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), un sitio de escisión de proteasa de serina proteasa 1 de tipo membrana (MT-SP1) o un sitio de escisión de proteasa de legumain.
8. Proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicho dominio de unión a CTLA-4 se une covalentemente a un dominio de dimerización, opcionalmente donde dicho dominio de dimerización es un dominio de proteína Fc, tal como una proteína IgG<sub>1</sub> Fc.
9. Ácido nucleico recombinante que codifica la proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 que comprende una secuencia que presenta o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 o SEQ ID NO:14.
11. Péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicha secuencia es SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12, o presenta al menos un 90 % de identidad con SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:12.
12. Péptido de enmascaramiento de dominio de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, comprendiendo además una señal de secreción de glicoproteína, tal como una señal de secreción de glicoproteína (gp) 67, una señal pELB, un receptor de factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humano (GM-CSFR) o una secuencia de señales de cadena alfa (CAR).
13. Dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 que comprende dos dominios de proteína de unión idénticos, comprendiendo cada uno de dichos dominios de proteína de unión la proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un dominio de dimerización unido covalentemente a dicho dominio de unión a CTLA4, donde dichos dominios de proteína de unión están unidos entre sí.

14. Composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y una proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o un dímero de proteína recombinante de unión a CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 13.

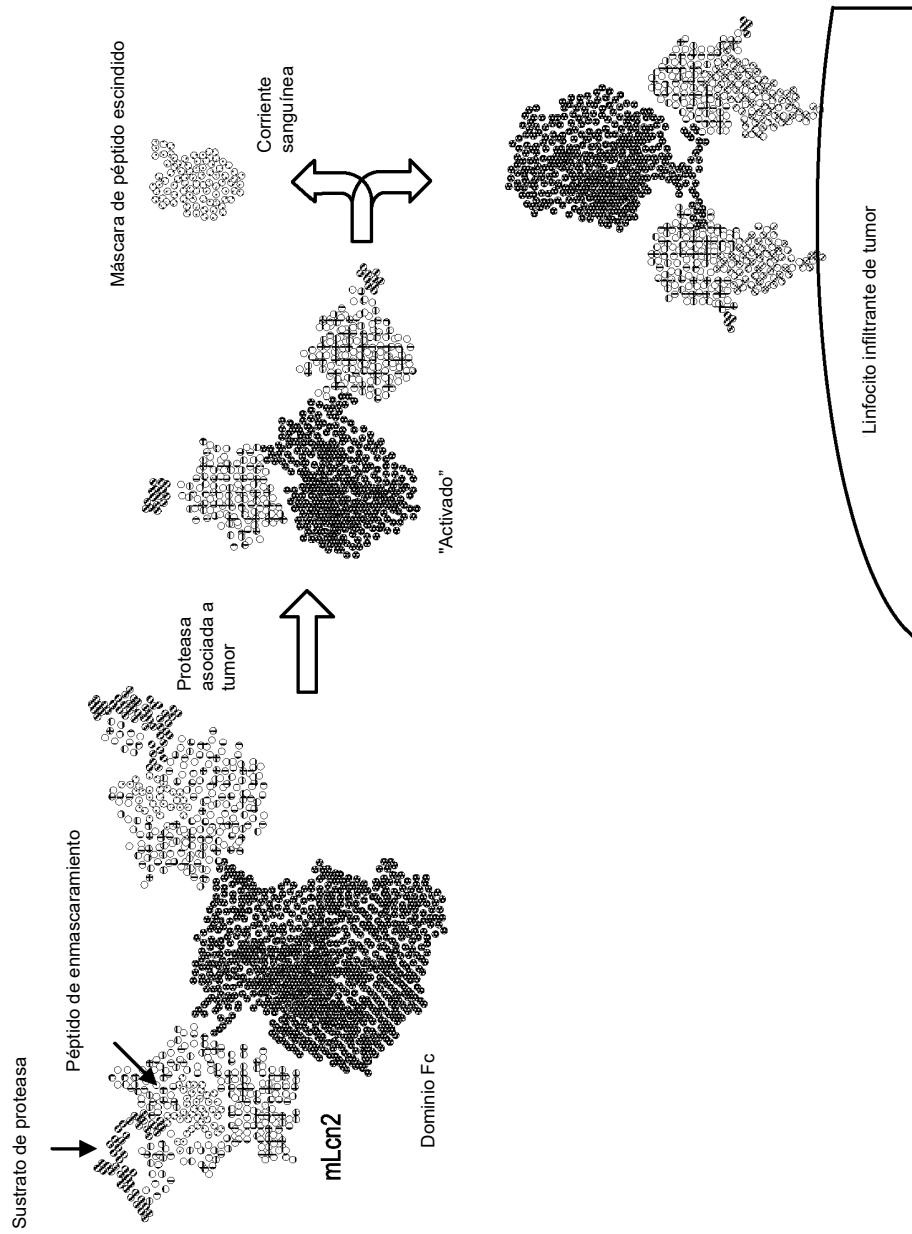
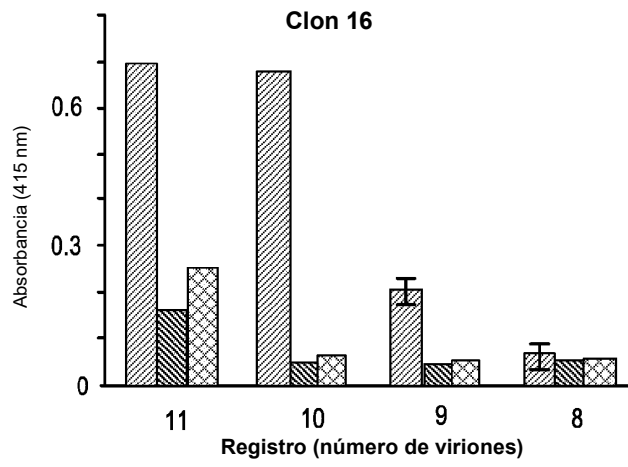
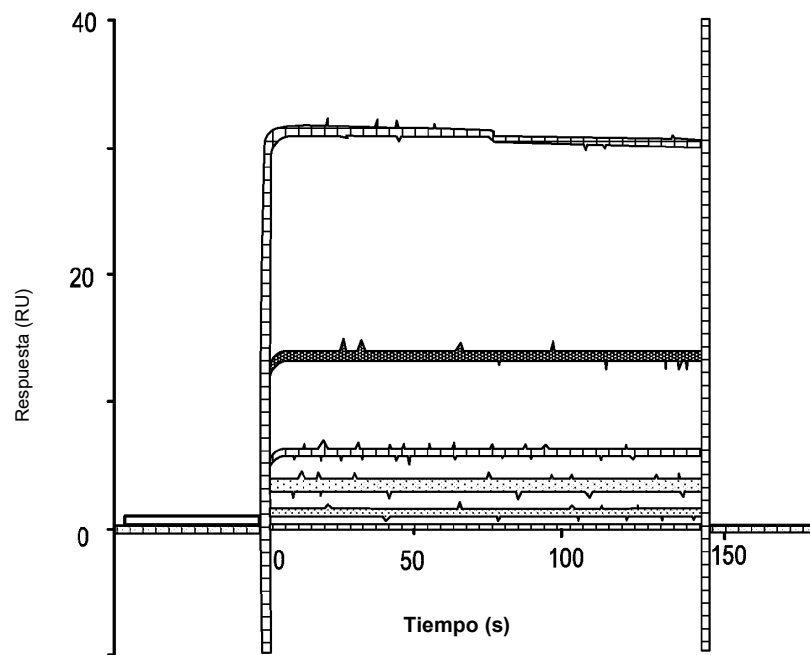


FIG. 1



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

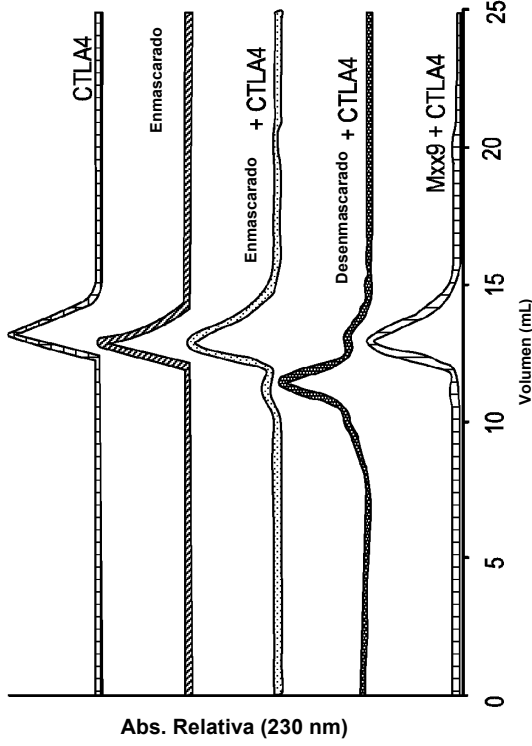


FIG. 3B

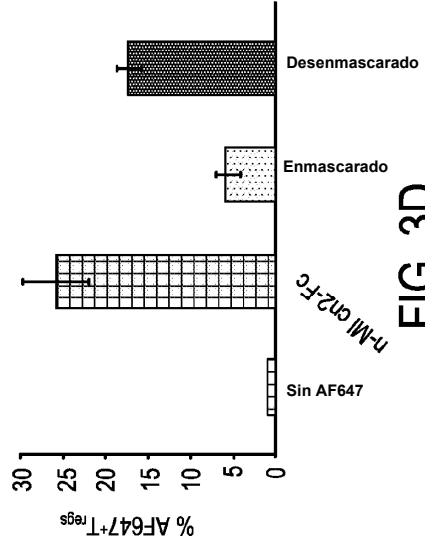


FIG. 3D

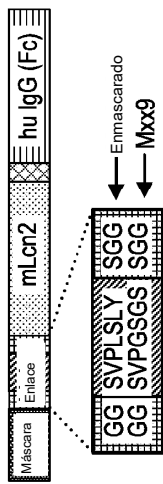


FIG. 3A

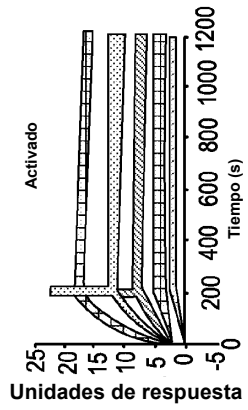
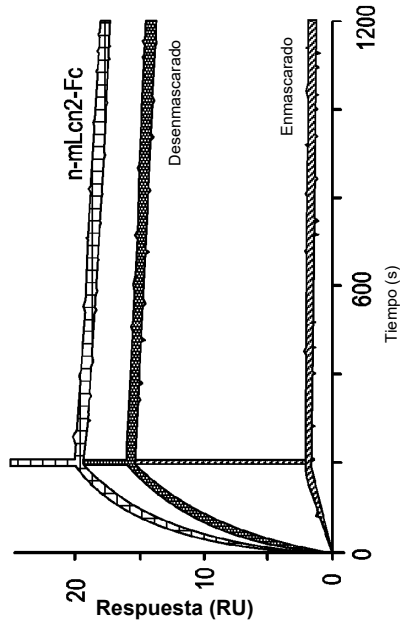


FIG. 3C

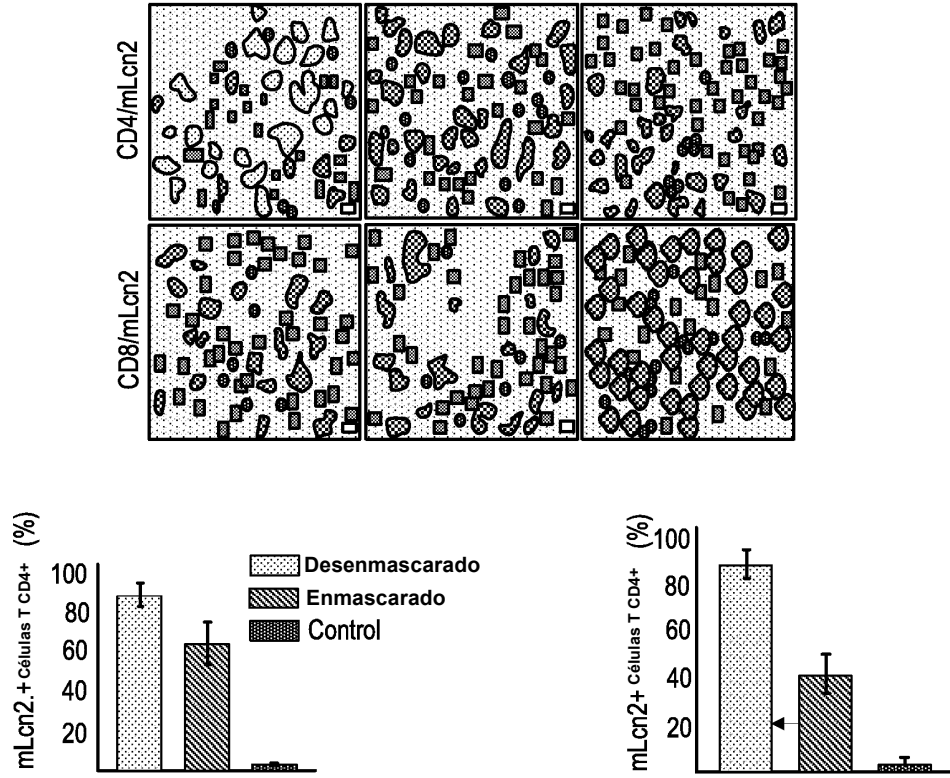


FIG. 4

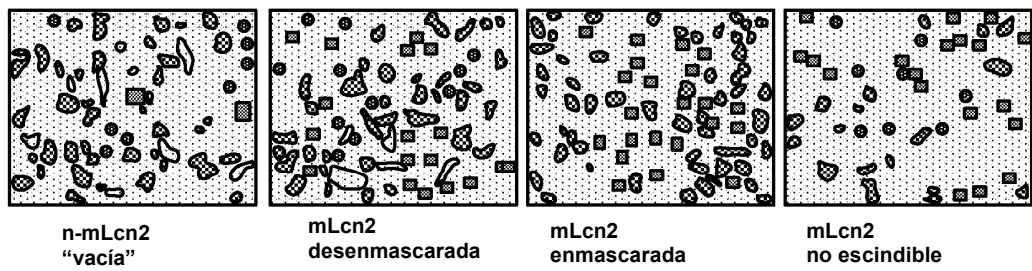


FIG. 5



Original	<b>GGSVPLSLYSGG</b>
V1	<b>GGSGGSVPLSLY</b>
V2	<b>GGSGGSVPLSLYSGG</b>
V3	<b>SGGGSGGGSVPLSLYSGG</b>
V4	<b>SGGGSGGGSVPLSLYSGGSGG</b>

**FIG. 6**

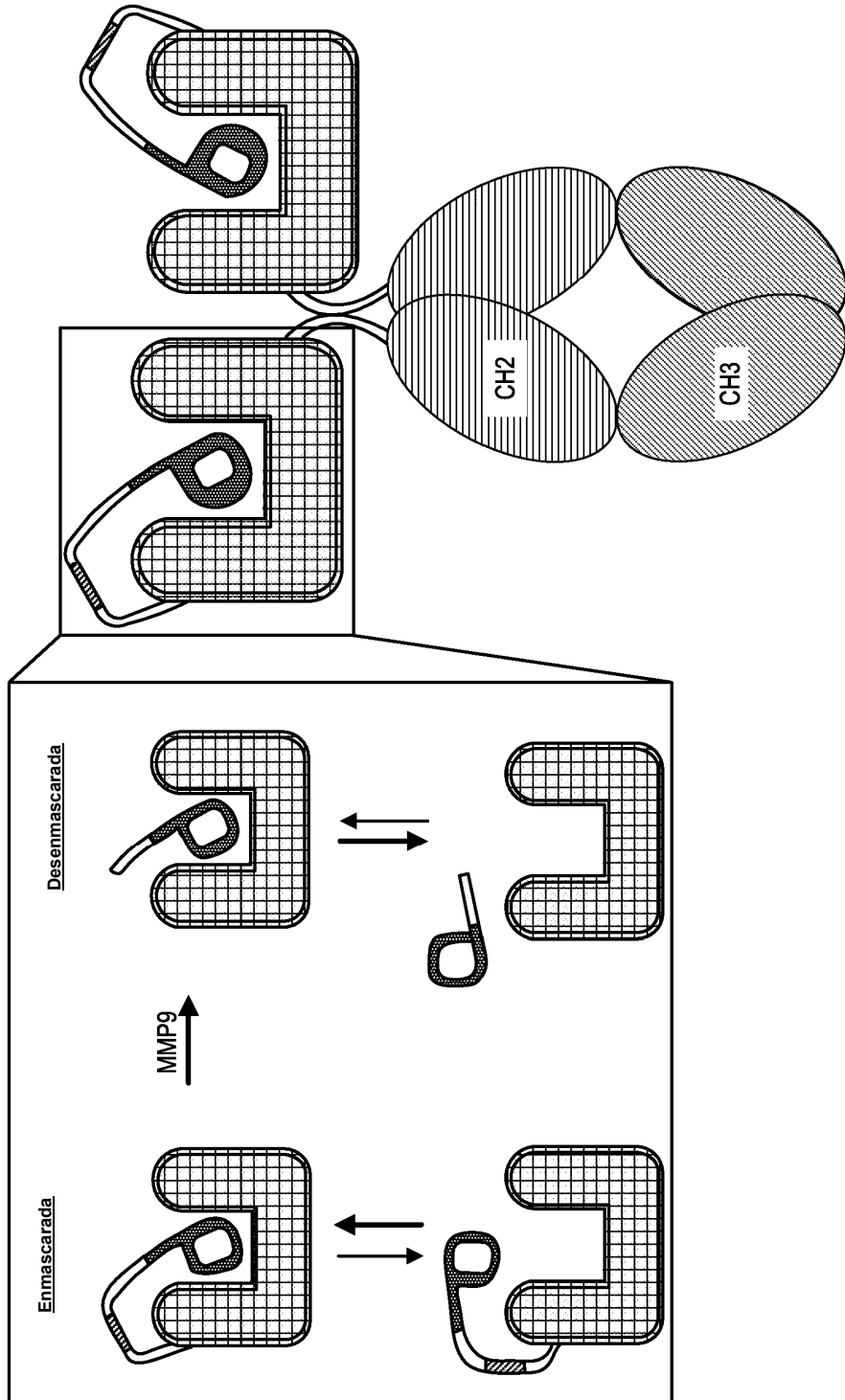


FIG. 7

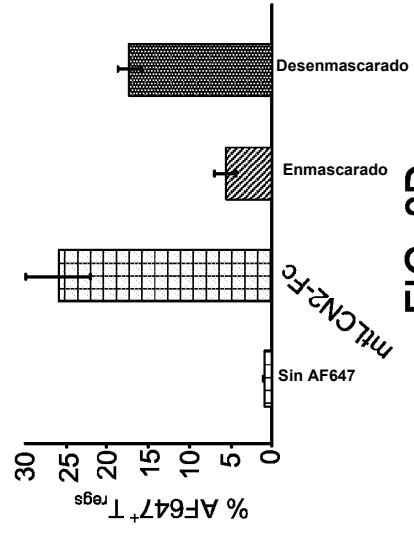
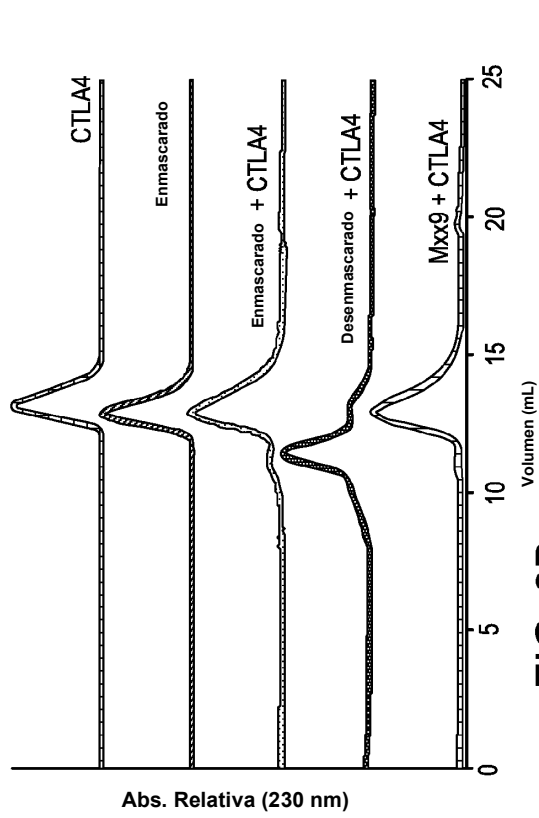


FIG. 8D

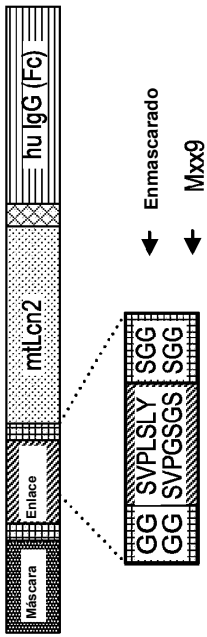


FIG. 8A

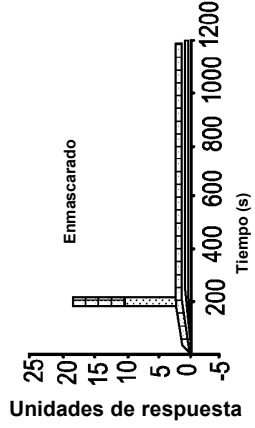
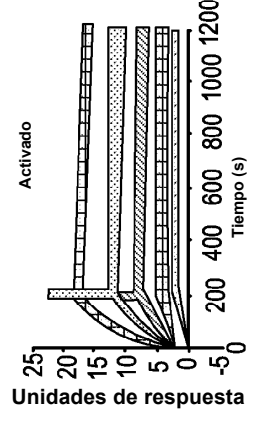
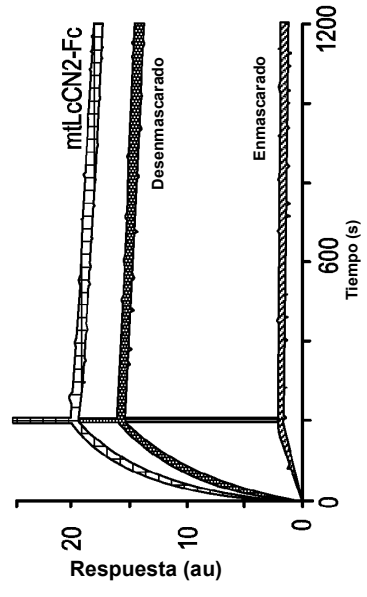


FIG. 8C

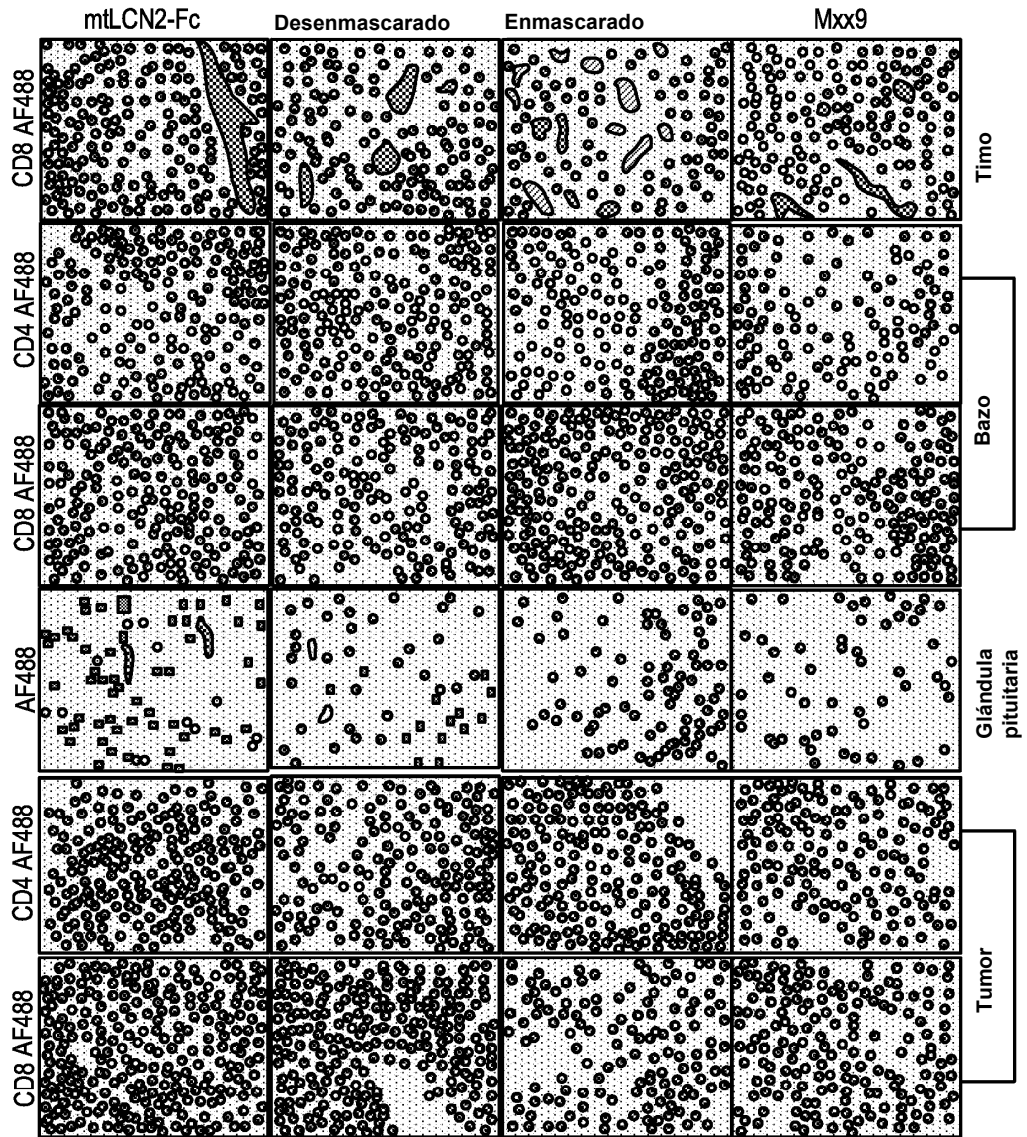


FIG. 9

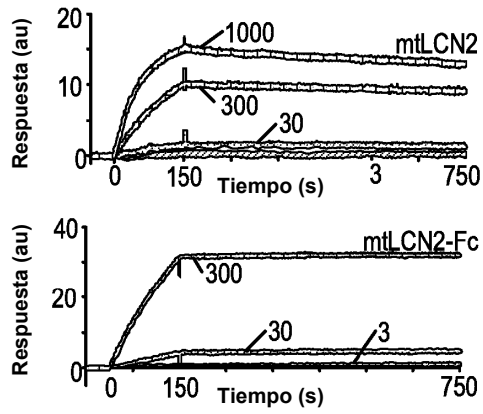


FIG. 10A

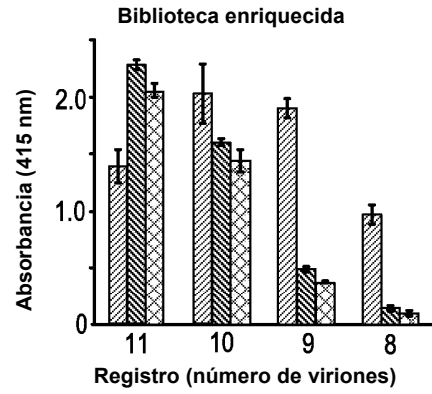


FIG. 10B

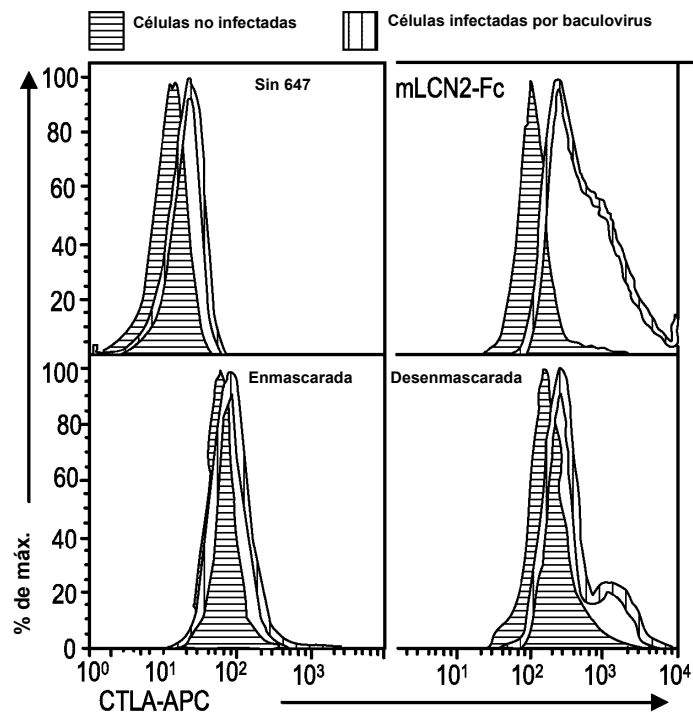


FIG. 10C

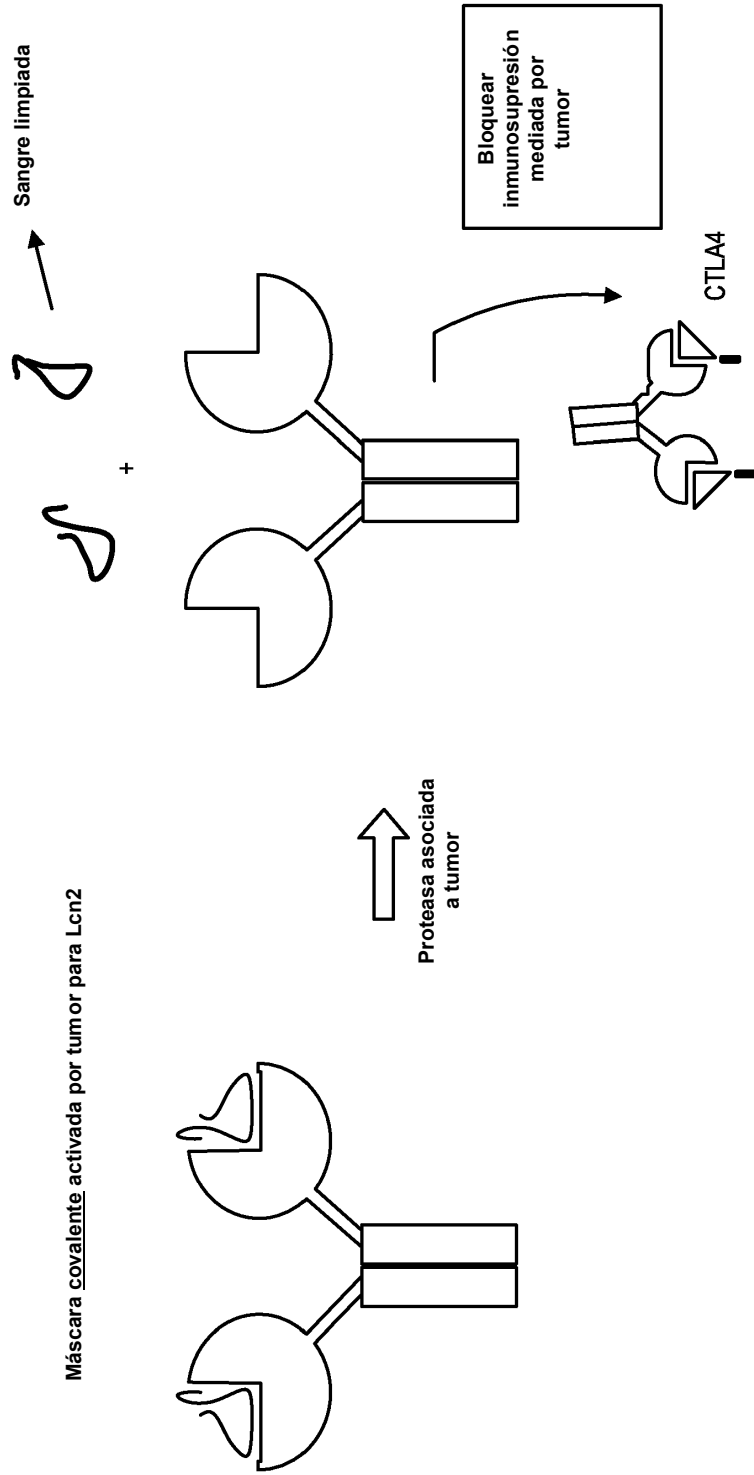


FIG. 11

18 min. de incubación de sustrato

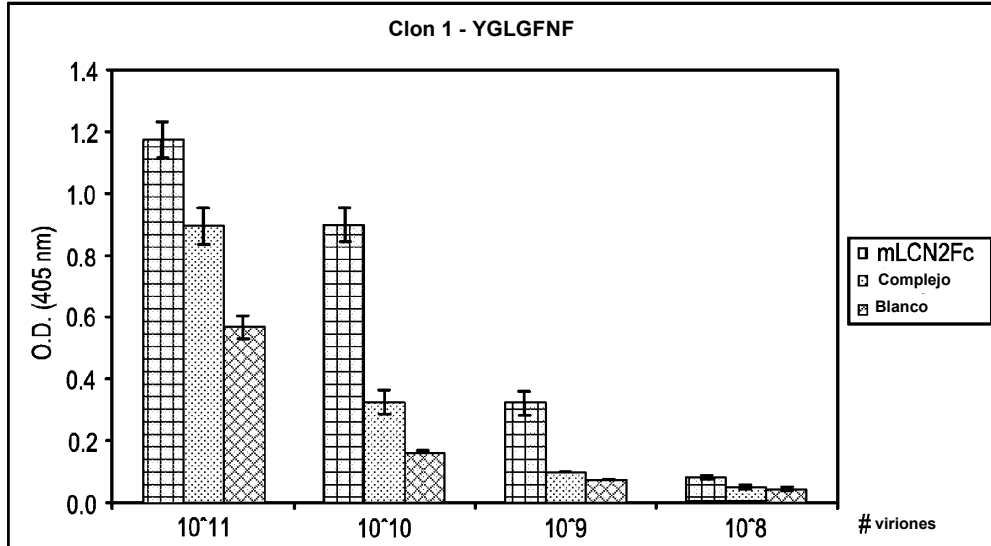


FIG. 12A

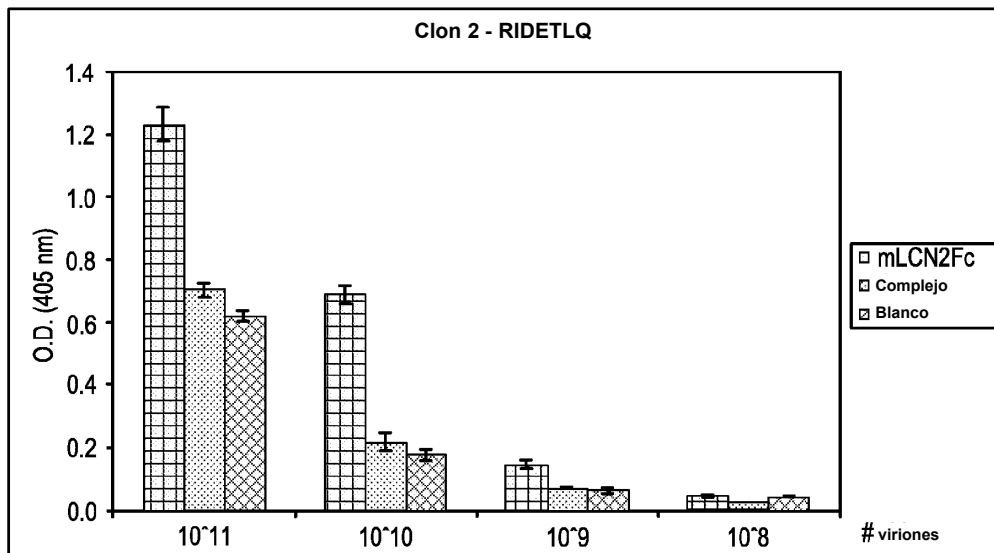


FIG. 12B

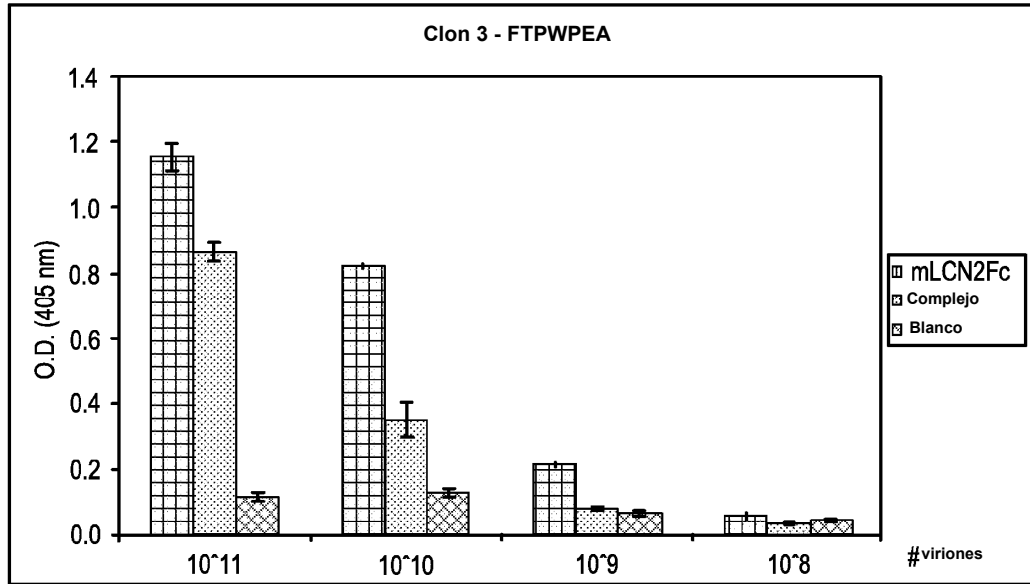


FIG. 12C

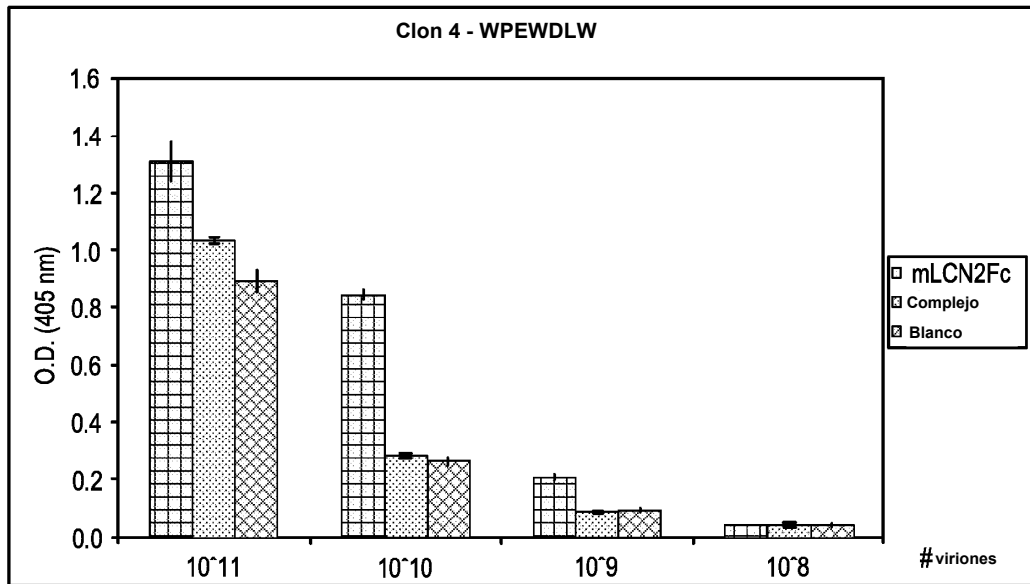


FIG. 12D



18 min. de incubación de sustrato

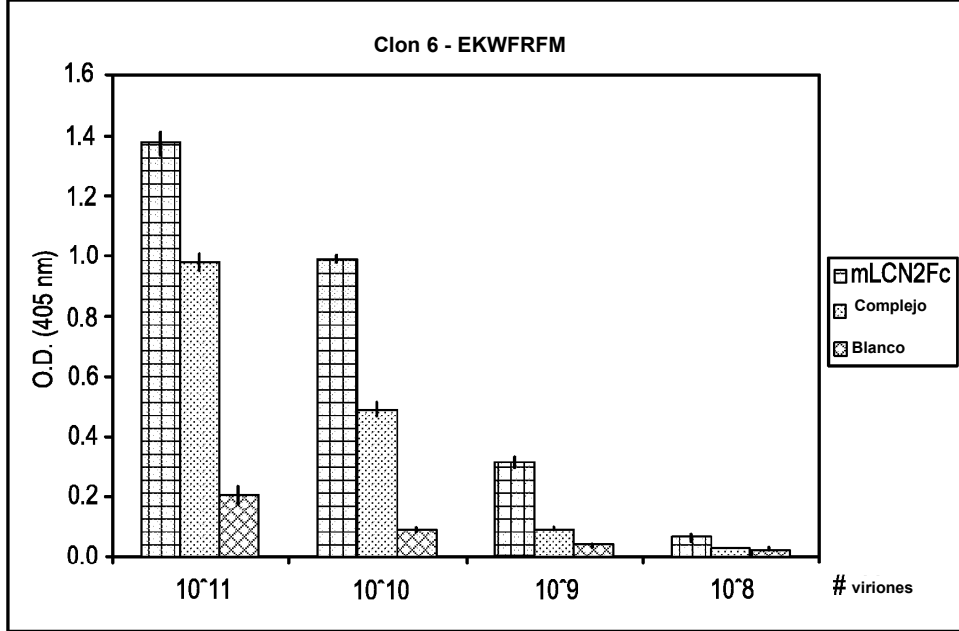


FIG. 13A

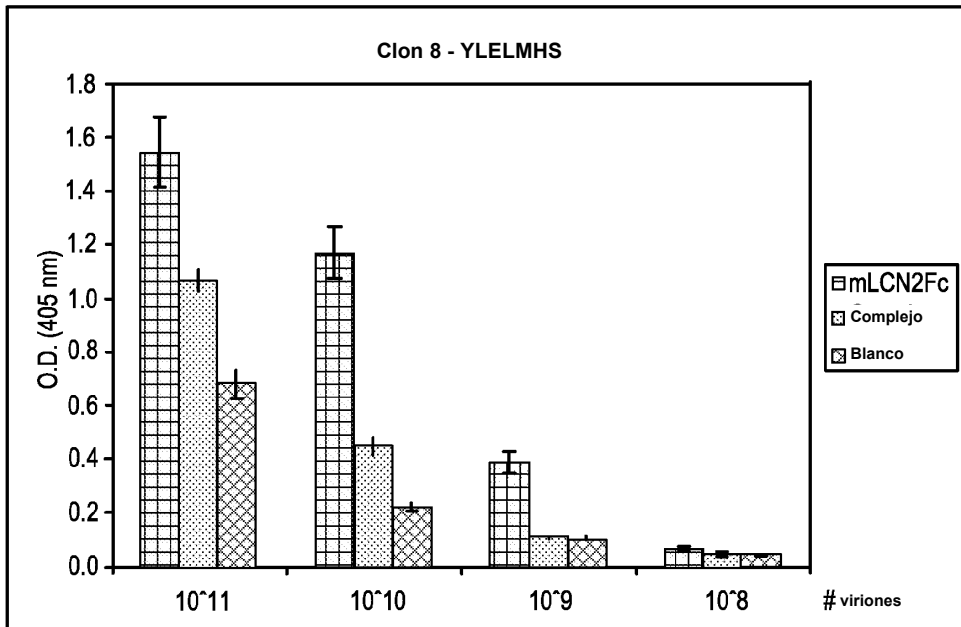


FIG. 13B

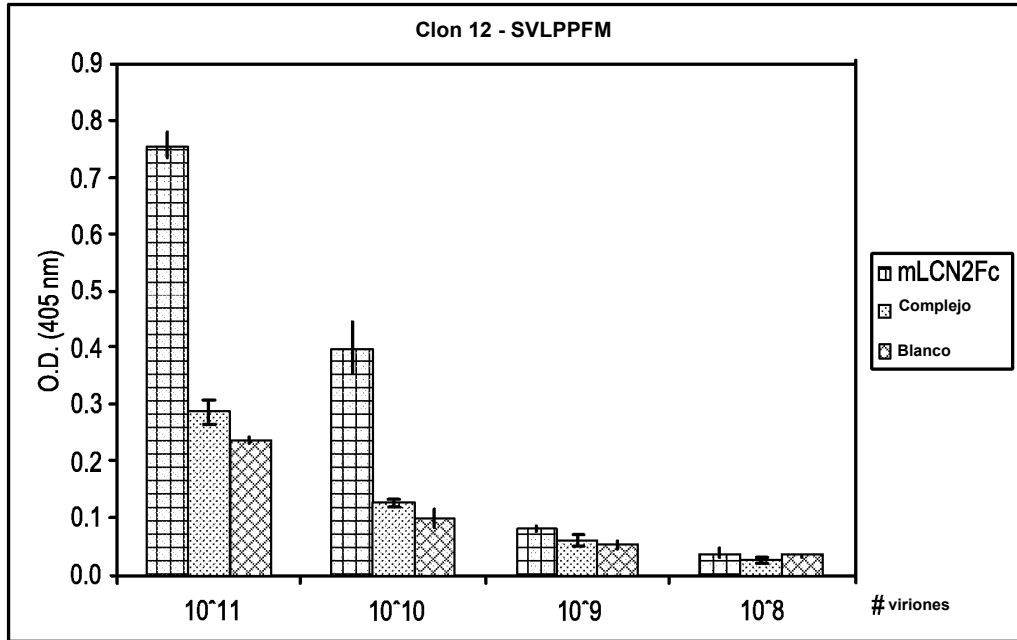


FIG. 13C

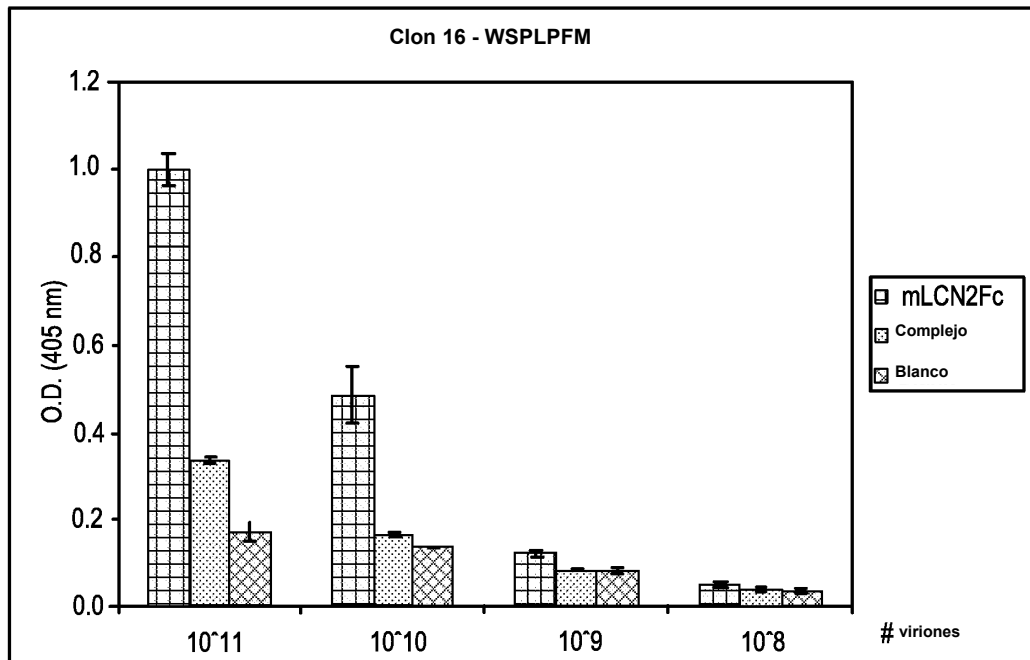


FIG. 13D

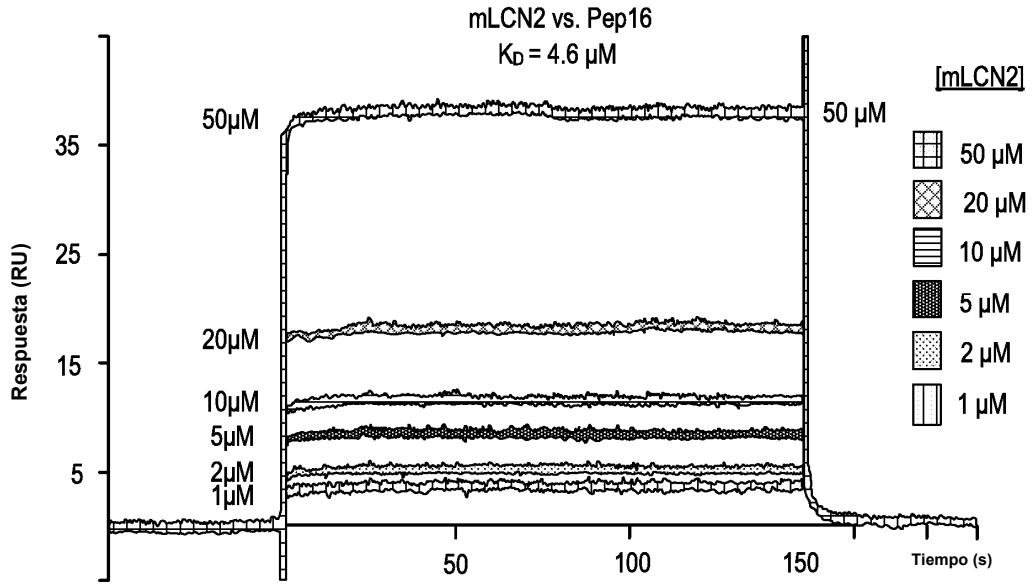


FIG. 14A

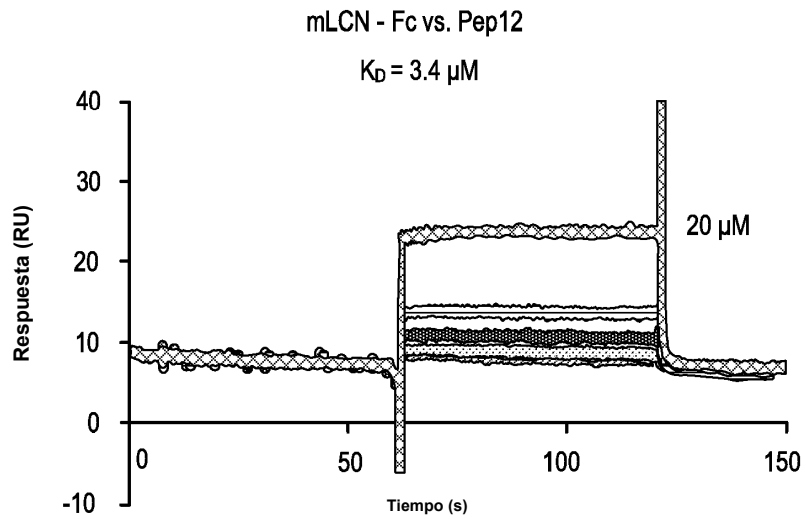


FIG. 14B

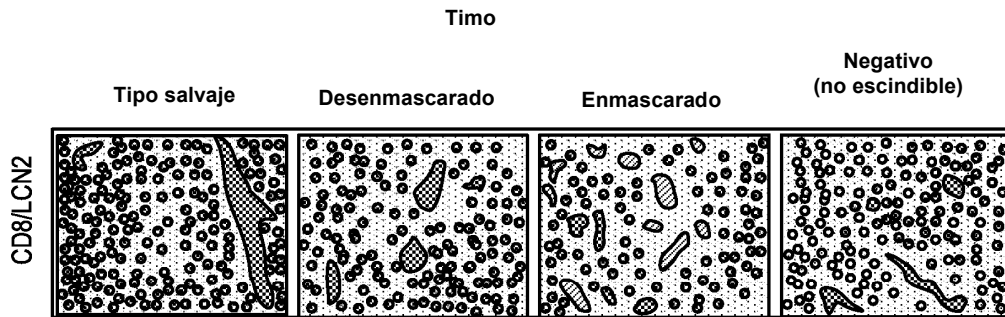


FIG. 15

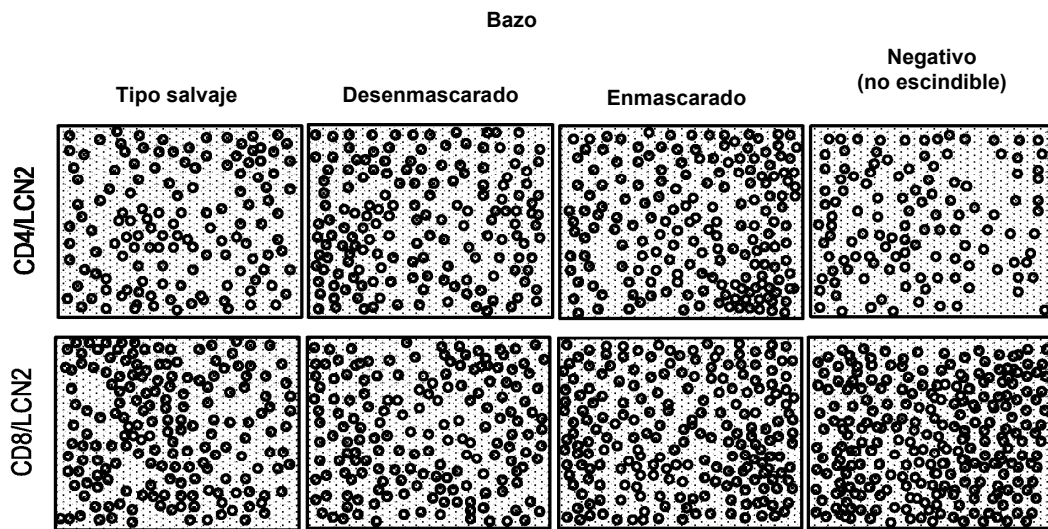


FIG. 16

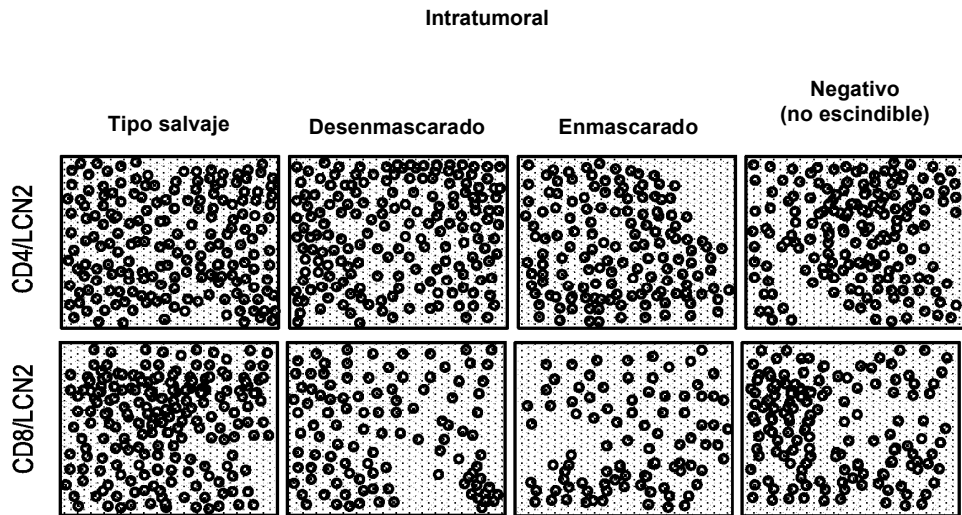
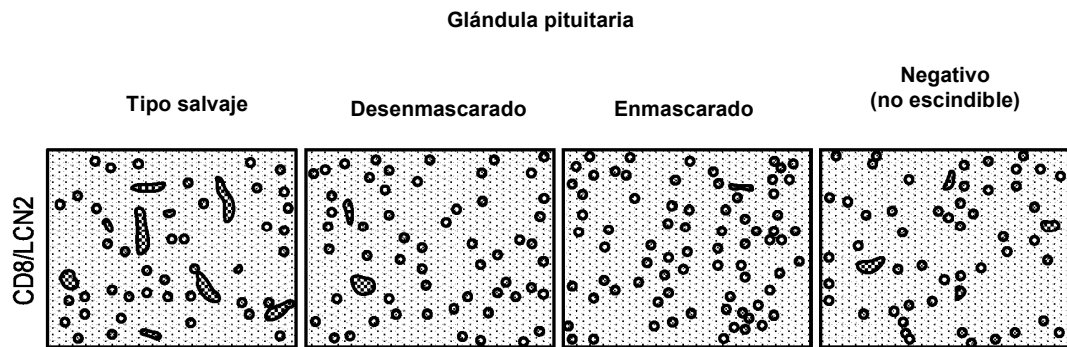


FIG. 17



**FIG. 18**



FIG. 19A

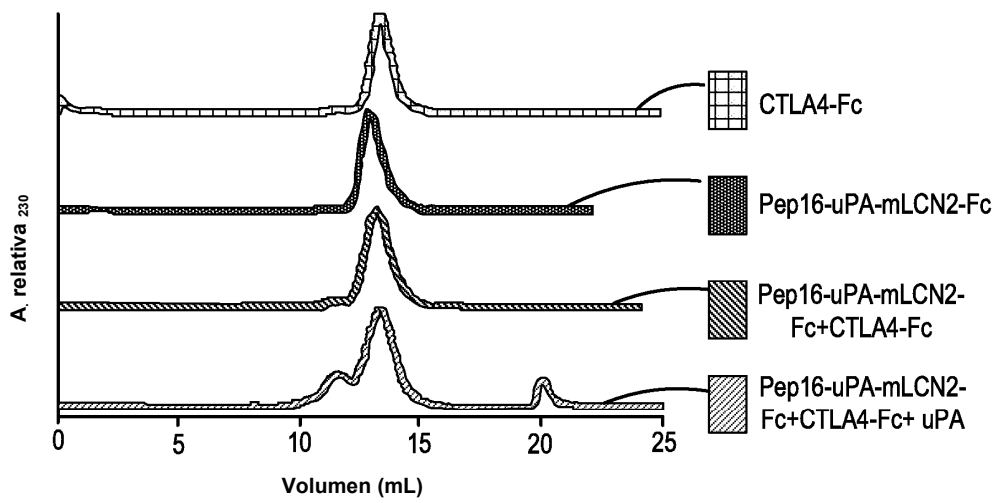


FIG. 19B

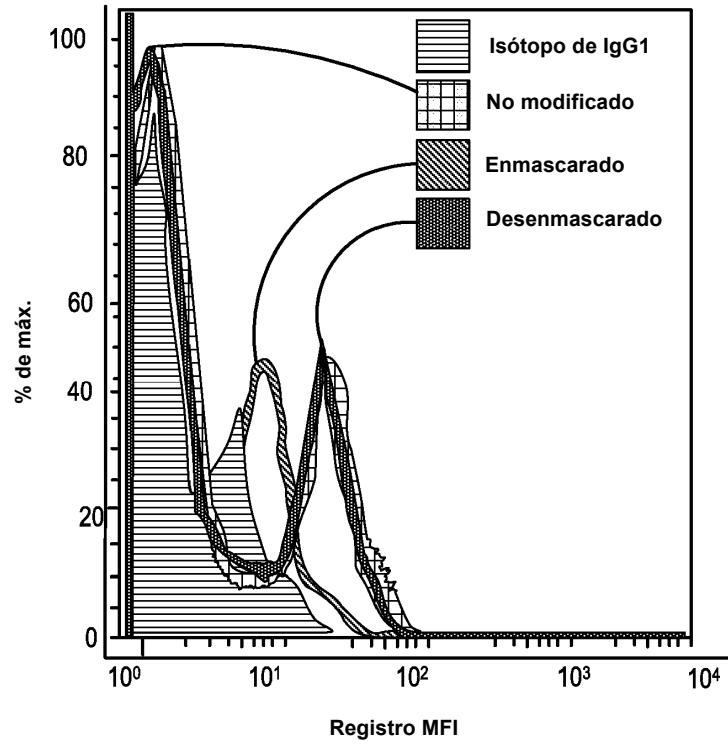


FIG. 20