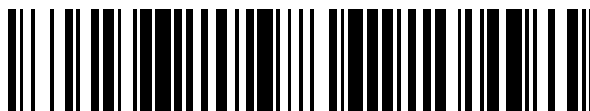


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 668**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/EP2014/065554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14741613 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3021865**

54 Título: **Miembros de la familia TNF modificados dirigidos**

30 Prioridad:

19.07.2013 EP 13306046

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

19.10.2018

73 Titular/es:

**VIB VZW (20.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE;
UNIVERSITEIT GENT (20.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (20.0%);
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (20.0%) y
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (20.0%)**

72 Inventor/es:

**TAVERNIER, JAN;
BULTINCK, JENNYFER;
PEELMAN, FRANK y
UZÉ, GILLES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 686 668 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

Miembros de la familia TNF modificados dirigidos

5 La presente invención se refiere a una citocina modificada de la superfamilia TNF con actividad reducida de su receptor, en la que dicha citocina modificada se entrega específicamente a las células diana. Dicha citocina modificada es una variante monocatenaria del TNF humano, preferentemente, una o más de las cadenas presentan una o más mutaciones, lo que produce una baja afinidad hacia el receptor, en la que dicha citocina mutante se entrega específicamente a las células diana. El direccionamiento se realiza mediante la fusión de la citocina
10 modificada de la superfamilia TNF con un único resto de direccionamiento, preferentemente, un anticuerpo o molécula similar a anticuerpo. Además, la invención se refiere al uso de dicha citocina modificada dirigida de la superfamilia TNF para tratar el cáncer.

15 La superfamilia TNF consiste en citocinas proinflamatorias con funciones cruciales en el sistema inmunitario mediante la regulación de la muerte, la proliferación y la diferenciación celulares. Además, se ha descrito que los miembros de la familia ejercen funciones sobre el metabolismo óseo, el sistema nervioso, sobre la neovascularización y la carcinogénesis. Contiene 19 ligandos, proteínas transmembrana de tipo II (de extremo N intracelular y extremo C extracelular), que son biológicamente activas como homotrimeros autoensamblantes de enlace no covalente. Aunque la mayoría de los ligandos de la superfamilia TNF se sintetizan como proteínas unidas a membrana, se
20 pueden generar formas solubles mediante escisión proteolítica. Todos ellos se unen a una o más moléculas de la superfamilia del receptor TNF a través de su dominio de homología a TNF C terminal, que presenta una homología de secuencia del ~20-30 % entre los miembros de la familia. Hasta ahora, se han identificado 29 receptores de la superfamilia TNF en los seres humanos. Estos son, mayoritariamente, glicoproteínas transmembrana de tipo I (de extremo N extracelular, de extremo C intracelular) con un motivo rico en cisteína en el dominio extracelular de unión
25 al ligando. Sin embargo, existen algunas excepciones como TRAIL-R3 que se une a la membrana mediante un glucolípido de extremo C unido por enlace covalente. Los receptores solubles se pueden generar mediante escisión proteolítica (por ejemplo, TNF-R1 y TNF-R2) o mediante corte y empalme alternativo del exón que codifica el dominio transmembrana. Los receptores de esta superfamilia se pueden dividir en 3 grupos según sus propiedades de señalización: receptores con un dominio de muerte citoplásmica que induce la apoptosis; receptores con un motivo de interacción con TRAF que induce diversas vías de señalización tales como NF- κ B, JNK, p38, ERK y PI3K; y los receptores señuelo que carecen de dominios de señalización intracelular. El TNF induce la apoptosis mediante la interacción con TNF-R1 (p55), mientras que la unión a TNF-R2 (p75, expresado mayoritariamente en células
30 inmunitarias) promueve la proliferación. La señalización TRAIL es más compleja ya que se puede unir a dos receptores de muerte (TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5)), a dos receptores señuelo (TRAIL-R3 (DCR1) y TRAIL-R4 (DCR2)) y a la osteoprotegerina soluble (OPG). La unión a uno de los últimos tres receptores inhibe la apoptosis mediada por TRAIL ya que amarra a TRAIL lejos de los receptores de muerte (Gaur y Aggerwal, 2003; Hehlhans y Pfeffer, 2005; Huang y Sheikh, 2007).

Los miembros de la superfamilia TNF que inducen la muerte TNF, CD95L (FasL) y TRAIL son posibles agentes terapéuticos para los cánceres que expresan su receptor respectivo TNF-R1, CD95, TRAIL-R1 y TRAIL-R2. De
40 hecho, TNF se descubrió originariamente hace más de 25 años como un factor con actividad antitumoral extraordinaria al provocar necrosis hemorrágica de determinados tumores *in vivo*. Más adelante, resultó evidente que el daño selectivo atribuido a TNF de la neovascularización tumoral también define su potencial antitumoral (Lejeune et al., 2006; van Horssen et al., 2006). Lamentablemente, el uso sistémico del TNF en el tratamiento del cáncer todavía se ve obstaculizado por las propiedades de inducción de choque. Actualmente, solo se utiliza clínicamente
45 en el entorno de la perfusión de miembro aislado en combinación con quimioterapia para tratar sarcomas de tejido blando y melanoma en tránsito (Roberts et al., 2011). Por otra parte, CD95L es tóxico cuando se administra sistémicamente ya que provoca hepatotoxicidad letal debido a apoptosis de hepatocitos masiva (Galle et al., 1995). TRAIL, sin embargo, se ha demostrado que induce la apoptosis en las células cancerosas con poca o ninguna citotoxicidad contra las células no transformadas y ensayos clínicos en diversos cánceres avanzados infirman de una enfermedad estable en muchos casos. De todas formas, para obtener una actividad terapéutica global suficiente se requiere un tratamiento combinado, lo que implica posibles efectos secundarios debido a la sensibilización de las células normales a la apoptosis inducida por TRAIL (Ashkenazi y Herbst, 2008; Falschlehner et al., 2009). Se han abordado enfoques diferentes para minimizar la toxicidad tras la administración sistémica de los miembros de la superfamilia TNF que inducen la muerte, como TNF mutante con menor toxicidad y mayor eficacia (Li et al., 2012),
50 suministro de TNF o TRAIL, normalmente como una construcción monocatenario, mediante restos específicos de tumores (de Bruyn et al., 2013; Gregorc et al., 2009; Liu et al., 2006; Siegemund et al., 2012; Wang et al., 2006), CD95L soluble químico (Daburon et al., 2013) o anticuerpos específicos de TRAIL-R1-, TRAIL-R2 o CD95 agonistas (Johnstone et al., 2008; Ogasawara et al., 1993; Fox et al., 2010). Algunos de estos pueden aumentar el índice terapéutico, pero nunca en una medida que mejore drásticamente el resultado clínico.

60 Huang et al. (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, 316: 983-991) y el documento WO 2006/115800 A2 desvelan construcciones de fusión de TNF-alfa trimerizantes individuales con un anticuerpo anti-HER2/neu ScFv. De Bruyn et al. (*Cancer Letters* 2011, 332:175-183) desvelan construcciones con sFasL o TRAIL unido a un ScFv.

65 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que es posible elaborar una construcción que comprenda una citocina de la superfamilia TNF, en la que la citocina es modificada para disminuir la afinidad hacia el receptor, en la

que dicha citocina está unida a un resto de direccionamiento y, en la que, dicha construcción tiene una toxicidad sistémica fuertemente reducida y solo muestra actividad biológica significativa hacia las células a las que dirige por el resto de direccionamiento.

5 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la invención es una construcción que comprende (i) tres copias de un TNF humano, en la que la citocina resultante se modifica (denominada "citocina modificada") de modo que la afinidad hacia su receptor disminuye, (ii) una secuencia enlazadora y (iii) un resto de direccionamiento, en el que dicha secuencia enlazadora
 10 enlaza las copias de citocina al resto de direccionamiento. Una construcción, según se utiliza en el presente documento, puede ser cualquier construcción de proteínas conocida por los expertos en la materia, incluyendo, entre otros, proteínas modificadas químicamente, complejos de proteínas y proteínas de fusión. Se presentan tres copias como una citocina monocatenaria; en una realización preferida, las copias se separan por una secuencia enlazadora para facilitar la presentación de la citocina en una forma trimérica. La citocina trimérica resultante contiene una modificación que disminuye su actividad biológica en comparación con TNF de tipo silvestre. Dicha modificación
 15 puede ser una modificación que disminuye la actividad del TNF de tipo silvestre normal. Las modificaciones pueden ser cualquier modificación que reduzca la actividad, conocida para los expertos en la materia, incluido, entre otras, modificaciones químicas y/o enzimáticas como pegilación y glicosilación, fusión a otras proteínas y mutaciones. La longitud del enlazador se puede adaptar para alterar la estructura trimérica normal, lo que produce menor actividad hacia el receptor. Alternativamente, se pueden incorporar aminoácidos especiales en el enlazador para modificar la estructura; dichos aminoácidos también se pueden modificar. Como ejemplo no limitante, se puede incorporar una lisina en el enlazador para permitir la pegilación. Preferentemente, dicha modificación es una mutación que disminuye la afinidad del TNF hacia su receptor. Una afinidad reducida y una actividad biológica reducida resultante según se utilizan en el presente documento significan que el TNF modificado tiene una actividad biológica de menos
 20 del 70 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, incluso más preferentemente, menos del 60 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, más preferentemente, menos del 50 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, más preferentemente, menos del 40 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, más preferentemente, menos del 30 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, más preferentemente, menos del 20 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre, más preferentemente, menos del 10 % de la actividad biológica del TNF de tipo silvestre en comparación con el TNF de tipo silvestre que se une normalmente al receptor. Preferentemente, el TNF modificado es un mutante del TNF de tipo silvestre y la actividad se compara con la del TNF de tipo silvestre. La afinidad y/o la actividad se pueden medir a través de cualquier método conocido por los expertos en la materia. La afinidad del TNF mutante por el receptor, en comparación con la afinidad de TNF de tipo silvestre por el receptor, se puede medir mediante análisis de gráfica Scatchard y ajuste por ordenador de los datos de unión (por ejemplo, Scatchard, 1949) o mediante espectroscopia de interferencia reflectométrica en condiciones de flujo continuo, según lo descrito por Brecht et al. (1993).
 25
 30
 35

El TNF modificado está unido a un resto de direccionamiento. "Unido", según se utiliza en el presente documento, es mediante un enlace covalente. El resto de direccionamiento está unido químicamente al TNF modificado o puede ser una proteína de fusión recombinante. Preferentemente, dicha construcción de direccionamiento es una proteína de fusión recombinante. Preferentemente, dicho resto de direccionamiento dirige el TNF a un entorno de tumor, particularmente a la vasculatura tumoral (por ejemplo, a las células endoteliales del tumor, normalmente, las células neoendoteliales). Incluso más preferentemente, un resto de direccionamiento es una molécula de unión que puede dirigir la proteína de fusión hacia un sitio de unión en una célula que expresa un receptor para TNF, preferentemente, un receptor capaz de interactuar con el TNF modificado, mediante interacción específica entre el sitio de unión y la molécula de unión. En una realización preferida, dicha molécula de unión es un compuesto pequeño que se une específicamente a una molécula situada en el exterior de la célula. En otra realización preferida, dicha molécula de unión es una estructura de azúcar dirigida hacia una molécula similar a lectina expresada en la pared celular. En otra realización preferida, dicha molécula de unión es un péptido dirigido al entorno del tumor, preferentemente, a la vasculatura tumoral. Dichos péptidos son conocidos para los expertos en la materia e incluyen, entre otros, NGR (dirigido a isoformas de CD13 expresadas en vasos tumorales) y péptidos de RGD (Yang et al., 2011; documento WO2005054293). Preferentemente, dicho péptido es un péptido RGD-4C (Arap et al., 1998) que se dirige a la integrina $\alpha_v\beta_3$. En otra realización preferida, dicha molécula de unión es una proteína que comprende un dominio de unión. Los dominios de unión son conocidos para los expertos en la materia. Algunos ejemplos no limitantes de dichos dominios de unión son los dominios de unión a carbohidratos (CBD, por sus siglas en inglés) (Blake et al, 2006), anticuerpos de cadena pesada (hcAb, por sus siglas en inglés), anticuerpos de dominio simple (sdAb, por sus siglas en inglés), minicuerpos (Tramontano et al., 1994), el dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos (VHH, por sus siglas en inglés), el dominio variable de los receptores de antígenos nuevos (VNAR, por sus siglas en inglés), aficuerpos (Nygren et al., 2008), alfacerpos (documento WO2010066740), dominios de repetición de anquirina diseñados (DARPin, por sus siglas en inglés) (Stumpp et al., 2008), anticualinas (Skerra et al., 2008), knotinas (Kolmar et al., 2008) y dominios CH2 modificados genéticamente (nanoanticuerpos; Dimitrov, 2009). Preferentemente, dicho resto de direccionamiento es un nanocuerpo.
 40
 45
 50
 55
 60

En una realización preferida, el resto de direccionamiento está unido al TNF modificado en una proteína de fusión recombinante. El resto de direccionamiento se fusiona directamente al TNF mutante con la ayuda de un fragmento enlazador. Preferentemente, dicho enlazador es un enlazador GGS. Incluso más preferentemente, dicho enlazador
 65

consiste en al menos 5 repeticiones de GGS, más preferentemente, al menos 10 repeticiones de GGS, más preferentemente, al menos 15 repeticiones de GGS, más preferentemente, dicho enlazador es un enlazador que consiste en 17-23 repeticiones de GGS, más preferentemente, dicho enlazador consiste en 20 repeticiones de GGS. El resto de direccionamiento se puede fusionar en el extremo amino o en el extremo carboxi del TNF mutado; preferentemente, dicho resto de direccionamiento se fusiona en el extremo amino de la molécula de TNF mutado. Aparte del TNF mutado y el resto de direccionamiento, la construcción además puede comprender otros dominios como, entre otros, una secuencia marcadora, una secuencia señal, otra citocina o un anticuerpo.

Preferentemente, el resto de direccionamiento se dirige hacia una diana seleccionada entre el grupo que consiste en CD20, CD33, CD47, CD70, PSCA, PSMA, Her2, c-Met, EGFR, Axl, tenascina C, integrina $\alpha_v\beta_3$, dominios de EDB de extremo EDA de fibronectina, repeticiones tipo III (FNIII) de fibronectina (A1 - D), tenascina-C y CD13 y variantes de corte y empalme específicas de células tumorales de los mismos. Cuando el resto de direccionamiento se dirige a la vasculatura tumoral, las dianas particularmente previstas incluyen, entre otras, CD13, $\alpha_v\beta_3$ integrina, dominios de EDB de extremo EDA de fibronectina, repeticiones tipo III (FNIII) de fibronectina (A1 - D) y tenascina-C. De acuerdo con realizaciones particulares alternativas, dicho resto de direccionamiento se dirige a CD20. Se prevé particularmente que el resto de direccionamiento es un anticuerpo (o un nanocuerpo) ya que los anticuerpos contra estas dianas están fácilmente disponibles y/o se pueden generar fácilmente.

La mutación en la cadena de TNF puede ser cualquier mutación conocida para los expertos en la materia, como una deleción, una inserción o una mutación puntual. Al menos una cadena tiene al menos una mutación; sin embargo, se pueden combinar varias mutaciones en una cadena. Las tres cadenas pueden contener las mismas mutaciones o mutaciones diferentes. Preferentemente, dichas mutaciones disminuyen la afinidad del TNF por su receptor o uno de sus receptores. Preferentemente, dicha mutación es una mutación puntual.

En una realización preferida, la construcción se dirige hacia un marcador expresado en una célula que expresa TNFR1 y/o TNFR2. En otra realización preferida, dicho marcador es un marcador específico de tejido, incluso más preferentemente, dicho marcador es un marcador específico de tejido de neovasculatura o de tejido canceroso. Más preferentemente, dicho marcador se selecciona entre el grupo que consiste en CD20, Her2, c-Met, EGFR, tenascina C, $\alpha_v\beta_3$ integrina y CD13.

Preferentemente, el TNF modificado es un TNF mutante en donde la mutación se selecciona entre el grupo que consiste en mutaciones en las posiciones R32, N34, Q67, H73, L75, T77, S86, Y87, V91, I97, T105, P106, A109, P113, Y115, E127, N137, D143, A145. Incluso más preferentemente, dicha mutación se selecciona entre el grupo que consiste en TNF R32G, N34G, Q67G, H73G, L75G, L75A, L75S, T77A, S86G, Y87Q, Y87L, Y87A, Y87F, V91G, V91A, I97A, I97Q, I97S, T105G, P106G, A109Y, P113G, Y115G, Y115A, E127G, N137G, D143N, A145G y A145T. Incluso más preferentemente, dicha mutación se selecciona entre el grupo que consiste en Y87X, I97X e Y115X. Más preferentemente, dicha mutación se selecciona entre el grupo que consiste en TNF Y87Q, Y87F, I97A, I97S, Y115A e Y115G (numeración de acuerdo con la secuencia de TNF humana, número de acceso de genbank BAG70306, versión BAG70306.1 GI: 197692685). La mutación puede estar presente en una, dos o las tres copias del TNF trimérico. Las diferentes copias dentro de la construcción trimérica pueden poseer diferentes mutaciones; se pueden combinar varias mutaciones en una o más de las cadenas. Aparte de las mutaciones citadas, otras mutaciones pueden estar presentes en una o más cadenas.

Otro aspecto de la invención es una proteína de fusión de acuerdo con la invención para utilizar como un medicamento. La proteína de fusión de acuerdo con la invención es para utilizar en el tratamiento del cáncer.

Esto equivale a afirmar que se desvelan métodos para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita que comprenden la administración de una proteína de fusión según se describe en el presente documento a dicho sujeto. De ese modo se trata el cáncer. Esto se puede evaluar, por ejemplo, mediante la evaluación del tamaño del tumor, como se muestra en los ejemplos (véase también la figura 16).

Los sujetos adecuados para el tratamiento son, normalmente, mamíferos y, más normalmente, seres humanos. Sin embargo, el tratamiento de animales no humanos también se prevé en el presente documento. Algunos ejemplos de animales no humanos que se pueden tratar incluyen, entre otros, caballos, vacas, ovejas, cerdos, cabras, gatos, perros y otros animales domésticos.

Se pueden tratar diferentes formas de cáncer utilizando esta estrategia. Esencialmente, cualquier tumor al que se pueda dirigir (directa o indirectamente, a través del entorno del tumor) con un resto de direccionamiento, mediante lo cual se reactiva la citocina de la familia TNF modificada y que, por ende, induce la muerte celular del tumor, es adecuado para el tratamiento.

Por lo tanto, los cánceres particularmente previstos son aquellos a los que se pueden dirigir fácilmente. De acuerdo con realizaciones particulares, el direccionamiento es a la vasculatura tumoral. En consecuencia, se prevén particularmente tumores altamente vascularizados. Algunos ejemplos de dichos tumores son aquellos que se pueden tratar con enfoques antiangiogénicos, como fármacos anti-VEGF o agentes anti-angiopoyetina/Tie2. Estos incluyen, entre otros, cáncer de mama, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no

microcítico (CPNM), carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, melanoma, tumor del estroma gastrointestinal (TEGT), tumores neuroendocrinos, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides medular y cáncer de endometrio (véase, por ejemplo, Welti et al., 2013, particularmente la tabla 1 y la tabla complementaria 1 de esta).

5 De acuerdo con realizaciones particulares, el cáncer es un tumor sólido. Sin embargo, cabe destacar que también se pueden tratar cánceres hematológicos como leucemias (por ejemplo, LMC, LMA), mieloma múltiple y linfomas con los agentes antiangiogénicos (Schmidt y Carmeliet, 2011; Roccaro et al., 2006). Por tanto, de acuerdo con las realizaciones alternativas, el cáncer es un tumor de los tejidos hematopoyéticos y/o linfoides (véase también el ejemplo 12).

10 Como la angiogénesis cumple una función importante en la metástasis tumoral y en la activación de las lesiones metastásicas, de acuerdo con realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer metastásico. La mayor presencia de células neoendoteliales hará que estos cánceres sean más susceptibles a las moléculas dirigidas a marcadores de estas células (los marcadores de vasculatura tumoral descritos arriba).

Breve descripción de las figuras

20 **Figura 1:** representación de los elementos estructurales de las diferentes configuraciones de la proteína de fusión sc (monocatenario, por sus siglas en inglés) hTNF-nanocuerpo.

25 **Figura 2:** actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por las preparaciones de sc hTNF indicadas en comparación con WT (tipo silvestre, por sus siglas en inglés) hTNF sobre células HekT (panel A) o células Hek-mLR (panel B). Ambas se transfectaron de forma transitoria con el indicador de luciferasa NF-κB.

30 **Figura 3:** actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por las preparaciones de sc hTNF indicadas que poseen un enlazador con 6 repeticiones de GGS sobre células HekT (panel A) o células Hek-mLR (panel B). Ambas se transfectaron de forma transitoria con el indicador de luciferasa NF-κB.

35 **Figura 4:** actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por las preparaciones de sc hTNF indicadas que poseen un enlazador con 13 repeticiones de GGS sobre células HekT (panel A) o células Hek-mLR (panel B). Ambas se transfectaron de forma transitoria con el indicador de luciferasa NF-κB.

40 **Figura 5:** actividad de luciferasa de luciérnaga inducida por las preparaciones de sc hTNF indicadas que poseen un enlazador con 19 repeticiones de GGS sobre células HekT (panel A) o células Hek-mLR (panel B). Ambas se transfectaron de forma transitoria con el indicador de luciferasa NF-κB.

45 **Figura 6:** inducción en número de veces de los niveles de ARNm de IL-6 tras el tratamiento de células SK-BR-3 con 500 ng/ml de las preparaciones de sc hTNF indicadas en comparación con los niveles en las células no tratadas y las células estimuladas con el nanocuerpo Her2. Los datos representan el promedio ± DT de 2 experimentos independientes (n=4).

50 **Figura 7:** % de actividad de los mutantes hTNF con comparación con WT hTNF según lo medido por la toxicidad sobre las células MCF7 (una estirpe celular de cáncer de mama).

55 **Figura 8:** toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-mLR (panel B) de los TNF modificados dirigidos acoplados a mLR NB (NB de extremo C de TNF).

60 **Figura 9:** toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-hCD20 (panel B) de los TNF modificados dirigidos acoplados a hCD20 NB (NB de extremo C de TNF).

65 **Figura 10:** toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-hCD20 (panel B) de los TNF modificados dirigidos acoplados a hCD20 o Bcl110 NB de control (NB de extremo N de TNF).

Figura 11: toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-hCD20 (panel B) de los TNF modificados que contienen sc hTNF con mutaciones combinadas (NB de extremo N de TNF).

Figura 12: toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-mLR (panel B) de los TNF modificados dirigidos con cadenas trimerizantes individuales acoplados a mLR NB (NB de extremo C de TNF).

Figura 13: toxicidad sobre células MCF7 (panel A) o MCF7-hCD20 (panel B) de los TNF modificados dirigidos con cadenas trimerizantes individuales acoplados a hCD20 NB (NB de extremo N de TNF).

Figura 14: comparación de la toxicidad *in vivo* de WT hTNF contra sc hTNF modificado y WT dirigido acoplado a hCD20 o Bcl110 NB de control (NB de extremo N de TNF). (A) Hipotermia (B) Mortalidad.

Figura 15: toxicidad *in vivo* de (m)TNF de ratón sc (Y86F3x) modificado o WT acoplado a Bcll10 NB de control (NB de extremo N de TNF). (A) Hipotermia (B) Mortalidad.

Figura 16: efecto antitumoral *in vivo* de (m)TNF de ratón sc (Y86F3x) modificado o WT acoplado a mCD20 o Bcll10 NB de control (NB de extremo N de TNF). (A) Crecimiento tumoral (B) Mortalidad.

Ejemplos

Materiales y métodos para los ejemplos

Nanocuerpos

El nanocuerpo 4-10 dirigido contra el receptor de leptina murino (mLR) se describió en Zabeau et al. (2012). Su secuencia codificante se clona en el vector de expresión mamífero pMET7 (Takebe et al., 1988) en fusión con el péptido líder SlgK, el marcador HA y albúmina. Nombre del plásmido: pMET7 SlgK-HA-4.11-albúmina. El nanocuerpo anti-Her2 1R59B se describió en Vaneycken et al. (2011). Se generaron NB 2HCD25 dirigido contra CD20 humano (hCD20) y 2MC57 NB contra CD20 de ratón (mCD20) utilizando técnicas convencionales (Gharouhdi et al., 1997; Pardon et al., 2014). NB Bcll10 de control se describió en De Groeve et al. (2010).

scTNF

scTNF que consiste en tres monómeros de hTNF acoplados mediante enlazadores GGGGS (SEQ ID NO: 1) se describió en Boschert et al. (2010). Se demostró que la mutación Y87Q en hTNF anula completamente la unión a ambos receptores, TNF-R1 y TNF-R2. La mutación de I97 produce una unión reducida de hTNF a ambos receptores (Loetscher et al., 1993). Se mutó un intervalo completo de residuos dentro de hTNF (kit de mutagénesis dirigida al sitio de QuickChange, Stratagene N.º de cat. 200518) y se evaluaron los efectos tóxicos sobre células MCF7 (figura 7). Los inventores seleccionaron las siguientes mutaciones para las construcciones dirigidas: Y87Q, Y87F, I97S, I97A, Y115A, Y115G. Las secuencias codificantes de sc hTNF WT-6xGGGS, sc hTNF Y87Q3x-6xGGGS, sc hTNF I97A3x-6xGGGS, sc hTNF Y87Q1x I97A2x-6xGGGS, sc hTNF Y87Q2x I97A1x-6xGGGS, sc hTNF WT1x Y87Q2x-6xGGGS, sc hTNF WT2x Y87Q1x-6xGGGS, sc hTNF I97S3x-6xGGGS, sc hTNF Y115A3x-6xGGGS, sc hTNF Y87F3x, sc hTNF Y115G3x, sc mTNF WT y sc mTNF Y86F3x se generaron mediante síntesis génica (GeneArt). Las cadenas individuales se separan mediante un enlazador de GGGGS (SEQ ID NO: 1).

Construcción de fusión de scTNF-nanocuerpo

Se sintetizó la secuencia codificante del nanocuerpo 1R59B Her2 mediante PCR del plásmido pHEN6-1R59B con los siguientes cebadores: 5'-GTCAAGATCTGGCGGTTCCGGCGCCGCAATGGCCAGGTGCAGCTGCAG-3' directo (SEQ ID NO: 2), 5'-CAGTTCTAGACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCGAACCGCCGTCGGGAGAGGAGA CGGTGAC -3' inverso (SEQ ID NO: 3). Esta PCR introduce un GGS entre un sitio BglII y NotI en el extremo amino y un marcador FLAG en el extremo carboxi del nanocuerpo 1R59B. Se digirió el producto de PCR con BglII y XbaI. pMK-RQ-sc hTNF WT, pMK-RQ-sc hTNF Y87Q3x y pMK-RQ-sc hTNF I97A3x se digirieron con NdeI y BglII. El producto de PCR digerido y los fragmentos de genes sintéticos se clonaron en el vector pMET7 SlgK-HA-leptina digerido con NdeI-XbaI para obtener pMET7 SlgK-HA-sc hTNF WT-6xGGGS-1R59B-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF Y87Q3x-6xGGGS-1R59B-FLAG y pMET7 SlgK-HA-sc hTNF I97A3x-6xGGGS-1R59B-FLAG. Se obtuvieron vectores de control sin el nanocuerpo 1R59B mediante la inserción de los siguientes oligos hibridados que contenían GGS y el marcador FLAG entre BglII y XbaI en lugar del producto de PCR: directo: 5'GATCTGGCGGTTCCGGCGCCGAGATTACAAGGATGACGACGATAAGTAAT3' (SEQ ID NO: 4), inverso: 5'CTAGATTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCTGCGGCCGCGCAACCGCCA3' (SEQ ID NO: 5). El vector de control solo con el nanocuerpo 1R59B se obtuvo mediante la inserción de los siguientes oligos hibridados en lugar del fragmento NdeI-sc hTNF-BglII: directo: 5'-TATGATGTGCCCGACTACGCTGGCGGCAGCA-3' (SEQ ID NO: 6), 5'-GATCTGCTGCCCGCAGCGTAGTCGGGCACATCA-3' inverso (SEQ ID NO: 7). La longitud del enlazador GGS se ajustó a un enlazador GGS de 13 repeticiones y 19 repeticiones mediante el añadido de repeticiones de 7xGGGS o 13xGGGS (realizadas por síntesis génica, GeneArt) a 6xGGGS original entre el sitio BglII y NotI.

Se utilizó un enfoque similar para obtener pMET7 SlgK-HA-sc hTNF WT-6x/13x/19xGGGS-4.10-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF Y87Q3x-6xGGGS-4.10-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF I97A3x-6x/13x/19xGGGS-4.10-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF Y87Q1x I97A2x-6x/13x/19xGGGS-4.10-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF Y87Q2x I97A1x-6x/13x/19xGGGS-4.10-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF WT-6x/13x/19xGGGS-2HCD25-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF I97S3x-6x/13x/19xGGGS-2HCD25-FLAG, pMET7 SlgK-HA-sc hTNF I97A3x-6x/13x/19xGGGS-2HCD25-FLAG y pMET7 SlgK-HA-sc hTNF Y115A3x-6x/13x/19xGGGS-2HCD25-FLAG.

Para obtener las construcciones de hTNF trimerizantes individuales, sc hTNF en pMet7-SlgK-HA-sc hTNF WT-GGS-4.10-Flag se reemplazó por la digestión de NdeI-Sall del producto de PCR obtenido con el cebador directo 5'-CATATGATGTGCCCGACTACGCTGGCGGCAGCTCTAGAACCCCGAGCGATAAGCCT GTG-3' (SEQ ID NO: 8) y el cebador inverso 5'-GTCGACCGGCAATGATGCCGAAGT-3' (SEQ ID NO: 9) sobre los plásmidos pMet7-SlgK-His-hTNF WT o pMet7-SlgK-His-hTNF I97A. Esto produjo los siguientes vectores: pMet7-SlgK-HA-hTNF WT-6xGGGS-4.10-Flag y pMet7-SlgK-HA-hTNF I97A-6xGGGS-4.10-Flag.

Las construcciones de expresión de fusión de nanocuerpo-TNF con NB de extremo N de TNF humano o de ratón, monocatenario o trimerizante individual se realizaron en pMet7 y se denominaron de modo que cada subunidad sea intercambiable a través de sitios de restricción exclusivos: AgeI-nanocuerpo-Sall-GGS enlazador-NotI-TNF-XhoI-His-XbaI.

- 5 pGL3-(IL6-kB)3-luciferasadeluciérnaga fue proporcionado por W. Vanden Berghe (Vanden Berghe et al., 1998).

Producción de las proteínas de fusión de nanocuerpo-TNF para estudios in vitro

- 10 Se transfectaron células HekT con las construcciones de la proteína de fusión utilizando el método de precipitación de fosfato de calcio convencional. 48 horas después, se cosecharon los medios de cultivo de transfección y se almacenaron a -20 °C. Se determinó la concentración con un ELISA hTNF comercial (DY210, R1D systems).

Producción de las proteínas de fusión de nanocuerpo-scTNF para estudios in vivo

- 15 Se transfectaron células 293-F FreeStyle™ con las construcciones de la proteína de fusión utilizando el reactivo de transfección PEIpro™ (PolyPlus, N.º de cat. 115-375) de acuerdo con las pautas del fabricante. El contenido de endotoxina en todas las preparaciones fue inferior al límite de detección según lo evaluado por un ensayo de lisado de amebocitos de Limulus cromogénico (Lonza, N.º de cat. 50-647U).

20 *Estirpes celulares*

- 25 Se cultivaron células Hek, HekT, Hek-mLR, MCF7, MCF7-hCD20, MCF7-mLR y B16BI6-mCD20 en DMEM complementado con 10 % de FCS. La estirpe celular 293-F FreeStyle™ se obtuvo de Invitrogen, Life Technologies (N.º de cat. R790-07) y se mantuvo en medio de expresión de 293 FreeStyle™ de Gibco, Life Technologies (N.º de cat. 12338). La estirpe celular SK-BR-3 (ATCC: HTB-30) de cáncer de mama humano se obtuvo de ATCC y se mantuvo en medio 5A de McCoy complementado con 10 % de FCS.

- 30 La estirpe celular Hek-mLR se generó del siguiente modo: se cotransfectaron de forma estable células Flp-In-293 (Invitrogen) con un plásmido que contenía los casetes de expresión para resistencia a la neomicina y mEcoR y con una construcción de pXP2d2-rPAP1-indicador de luz (Eyckerman et al. 2001). Se aislaron los clones transfectados estables en medio que contenía G418 (400 µg/ml) y se seleccionó un clon con alta actividad de luciferasa inducida por LIF (1 ng/ml). El vector de expresión pcDNA5/FRT que contenía mLR se integró de forma estable en esta estirpe celular utilizando la reacción de Flp-In recombinasa (Invitrogen) y después de la selección sobre higromicina (100 µg/ml) durante 10 días.

- 35 La estirpe celular MCF7 (ATCC: HTB-22) de cáncer de mama humano se obtuvo de ATCC. Las estirpes celulares MCF7-hCD20 y MCF7-mLR se generaron del siguiente modo: se cotransfectaron de forma estable células MCF7 con un plásmido que contenía el casete de expresión para hCD20 o mLR y con un plásmido que contenía el gen de resistencia a la neomicina. Se seleccionaron las células transfectadas estables con medio que contenía G418 (1 mg/ml), seguido por clasificación FACS de células con expresión de hCD20 o mLR.

- 40 La estirpe celular B16BI6-mCD20 se generó del siguiente modo: se cotransfectaron de forma estable células B16BI6 con un plásmido que contenía el casete de expresión para mCD20 y con un plásmido que contenía el gen de resistencia a la neomicina. Se seleccionaron las células transfectadas estables con medio que contenía G418 (2 mg/ml).

- 45 La estirpe celular SK-BR-3 (ATCC: HTB-30) de cáncer de mama humano se obtuvo de ATCC y se mantuvo en medio 5A de McCoy complementado con 10 % de FCS.

Medición de las actividades de luciferasa

- 50 Se midieron las actividades específicas de TNF mediante cuantificación de la actividad de luciferasa bajo el control del promotor de NF-κB. Dos días después de la transfección del indicador de luciferasa NF-κB (pGL3-(IL6-kB)3-luciferasadeluciérnaga) mediante el método de precipitación de fosfato de calcio estándar, se estimularon las células durante 6 h con sc hTNF de control o dirigido. Se prepararon lisados (amortiguador de lisis: 25 mM Tris, pH 7,8, 2 mM EDTA, 2 mM ditiotreitól, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X-100) y se añadieron 35 µl de amortiguador de sustrato de luciferasa (20 mM tricina, 1,07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂•5H₂O, 2,67 mM MgSO₄•7H₂O, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM ditiotreitól, 270 µM coenzima A, 470 µM luciferina, 530 µM ATP, pH final 7,8) por 50 µl de lisado. Se midió la emisión de luz durante 5 s en un contador de quimioluminiscencia TopCount (Packard).

RT-PCR cuantitativa

- 60 Se cuantificó la expresión del gen inducible por TNF IL-6 mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, por sus siglas en inglés) de forma relativa a HPRT en células SK-BR-3 tratadas durante 6 horas con 500 ng/ml de sc hTNF dirigido o de control. Se purificó el ARN total con columnas RNeasy (Qiagen) y se utilizaron cantidades iguales de ARN (0,5 µg) para la transcripción inversa utilizando el kit de reactivo RT Primescript (Takara Bio, Shiga, Japón), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió el ADNc diluido 10 veces a una mezcla de RT-QPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa, por sus siglas en inglés) que contenía 1x mezcla maestra SYBR Green I (04 887 352 001, Roche) y cebadores específicos del gen 1 nM. Los ensayos se realizaron por triplicado en un termociclador de sistema de PCR en tiempo real LightCycler 480

(Roche Applied Science) y se analizaron los resultados utilizando el método $\Delta\Delta\text{CT}$. Se utilizaron los siguientes cebadores:

- 5 HPRT directo: 5'TGACACTGGCAAACAATGCA3' (SEQ ID NO: 10);
 HPRT inverso: 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3' (SEQ ID NO: 11);
 IL-6 directo: 5'GACAGCCACTCACCTCTTCA3' (SEQ ID NO: 12);
 IL-6 inverso: 5'AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC3' (SEQ ID NO: 13).

10 *Análisis de toxicidad sobre células MCF7*

También se midieron las actividades específicas de TNF mediante la evaluación de la toxicidad celular sobre las células MCF7. Se colocaron en placas 1000 células en una placa de 96 pocillos de color negro y 24 horas después se estimularon con las diferentes construcciones de TNF. Después de 48-72 horas, se determinó la cantidad de células viables utilizando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo Luminescent (Promega N.º de cat. G7570) de acuerdo con las directrices del fabricante.

15 *Análisis de toxicidad in vivo*

20 Para evaluar la toxicidad de hTNF *in vivo*, se inyectaron ratones C57BL/6J hembra de 8 semanas (adquiridos de Charles River, Francia) por vía intraperitoneal con 500 ng de rhTNF o proteínas de fusión de sc hTNF-nanocuerpo en combinación con 10 mg de D-galactosamina (diluida en PBS libre de LPS, inyectado en un volumen de 500 μl). Se controló la morbilidad mediante la medición de la temperatura corporal periférica (rectal). n=2-4 por proteína de fusión.

25 Para evaluar la toxicidad de mTNF *in vivo*, se inyectaron los ratones por vía intravenosa con 10, 35, 100 o 200 μg de proteínas de fusión sc mTNF-nanocuerpo (volumen inyectado 200 μl , dilución en PBS libre de LPS). Se controló la morbilidad mediante la medición de la temperatura corporal periférica (rectal). n=2 por dosis, por proteína de fusión, excepto para 200 μg (n=1).

30 *Estudios antitumorales in vivo*

Se rasuraron ratones C57BL/6J hembra de 8 semanas y se inocularon con 6×10^5 células tumorales B16Bl6-mCD20 por vía subcutánea en el lomo (día 0). Se inició el tratamiento cuando el producto de los diámetros perpendiculares mayores fue aproximadamente 50 mm^2 (en el día 10). Se administraron PBS o 35 μg de proteínas de fusión de nanocuerpo-sc mTNF durante 8 días consecutivos (día 10-17, indicado en la figura 16A como una barra gris) mediante inyección paralesional (inyección subcutánea cerca del sitio del tumor, pero fuera del nódulo del tumor). Se midieron los tumores diariamente con un calibrador y se muestran como promedio \pm SEM. Se controló la morbilidad mediante la medición diaria del peso corporal la temperatura. n=5 por tratamiento.

40 **Ejemplo 1: proteínas de fusión de sc hTNF-nanocuerpo**

La figura 1 muestra una representación esquemática de las proteínas de fusión de sc hTNF-nanocuerpo ya sea con el nanocuerpo de extremo N o C de sc hTNF.

45 **Ejemplo 2: direccionamiento de actividad de TNF sobre células Hek que expresan mLR**

Se evaluó la inducción de la actividad del indicador de luciferasa NF- κB tras la estimulación de TNF en células HekT y en células Hek que expresan el receptor de leptina murino (Hek-mLR). Como se muestra en la figura 2A, la inducción de NF- κB inducida por WT sc hTNF se anula total (>1000 veces) o parcialmente (100 veces) mediante la mutación Y87Q3x o I97A3x, respectivamente. Además, en las células HekT que no expresan mLR, todas las construcciones de sc hTNF (WT, Y87Q3x y I97A3x) inducen actividad de NF- κB similar independientemente de la fusión al nanocuerpo mLR (figura 2A). En cambio, el acoplamiento al nanocuerpo mLR es capaz de restaurar la inducción de NF- κB de sc hTNF I97A3x en las células Hek que expresan mLR en una medida similar a WT sc hTNF (figura 2B). Se calcula que las células que expresan el mLR son 100 veces más sensibles que las células HekT parentales a sc hTNF I97A3x acoplado al nanocuerpo. En cambio, la mutación Y87Q triple no mostró ningún efecto de rescate sobre la respuesta de TNF en las células Hek-mLR en comparación con las células HekT (figura 2B).

50 **Ejemplo 3: comparación de diferentes combinaciones de mutantes y diferentes longitudes de enlazador**

Para optimizar las construcciones, se evaluaron construcciones de sc hTNF con diferentes mutaciones en las cadenas individuales, así como longitudes de enlazadores diferentes entre sc hTNF y el resto de direccionamiento. Los resultados se resumen en las figuras 3, 4 y 5. sc hTNF I97A3x y sc hTNF Y87Q1x I97A2x no presentan actividad sobre las células Hek que no expresan al receptor de leptina, pero tienen una actividad dependiente de la dosis notoria cuando se dirigen al receptor de leptina.

65 **Ejemplo 4: direccionamiento de actividad de TNF sobre células Hek que expresan Her2**

Se generaron proteínas de fusión utilizando el nanocuerpo de α -Her2 1R59B y sc hTNF WT, sc hTNF Y87Q3x o sc hTNF I97A3x. El enlazador entre el nanocuerpo y sc hTNF fue 6xGGS o 19xGGS. Se evaluaron estas moléculas sobre la estirpe celular de cáncer de mama SK-BR-3 con sobreexpresión de Her2 para la inducción del gen inducible por TNF IL-6, según lo determinado de forma relativa para HPRT mediante RT-PCR cuantitativa.

- 5 La figura 6 muestra la inducción de pliegue de ARNm de IL-6 tras el tratamiento con sc hTNF (500 ng/ml) en comparación con los niveles de ARNm de IL-6 en las células no tratadas y las células estimuladas con el nanocuerpo Her2. De forma correspondiente a la activación transcripcional de NF- κ B, se observa que la mutación Y87Q3x impide completamente la producción de IL-6 inducida por TNF, mientras que sc hTNF I97A3x aún puede inducir la producción de IL-6 pero en menor medida que WT sc hTNF. Cuando sc hTNF se fusiona con el
- 10 nanocuerpo, se produce menos ARNm de IL-6. Esto se puede deber al impedimento estérico ya que el efecto es más pronunciado con el enlazador 6xGGS en comparación con el enlazador 19xGGS más largo en el que es probable que haya mayor flexibilidad. Al acoplar sc hTNF I97A3x al nanocuerpo Her2, la inducción de IL-6 se puede restaurar a niveles similares a WT sc hTNF acoplado al nanocuerpo a través del enlazador correspondiente. En cambio, el direccionamiento específico del mutante Y87Q3x sc hTNF más riguroso a células que expresan Her2 no
- 15 puede restaurar la propiedad de inducción de IL-6 de sc hTNF.

Ejemplo 5: comparación de la toxicidad de los mutantes hTNF sobre células MCF7

- Debido a la actividad residual relativamente alta del mutante I97A3x sc hTNF, buscamos otras mutaciones mediante la medición de la toxicidad de diferentes mutantes de hTNF trimerizantes individuales como la actividad luciferasa en las células MCF7. La actividad de los mutantes con respecto a TNF trimerizante individual WT se muestra en la figura 7. La mayoría de las mutaciones no afecta la actividad de TNF drásticamente (>1 % de WT) y podrían ser menos prometedoras para el desarrollo de construcciones dirigidas debido a la posible toxicidad sustancial restante. Los inventores están más interesados en las mutaciones que anulan (casi) completamente la función de TNF. El uso
- 20 de mutaciones nulas ($<0,1$ % de WT) produce construcciones dirigidas que no presentan efectos secundarios, pero que tienen como una desventaja posible que la reactivación tras el direccionamiento se logra de forma menos sencilla. Las mutaciones que tienen algo de actividad residual (0,02 – 5 % de WT, particularmente 0,1 % - 1 % de WT) tienen mayor probabilidad de reactivarse y, a su vez, no son tóxicas. Se seleccionaron 6 mutaciones diferentes que cubren un intervalo de actividad de entre el 0,02 y el 5 % de TNF trimerizante individual WT para el desarrollo de las citocinas modificadas dirigidas: Y87Q (0,02 %), I97S y Y115A (0,2 %), Y87F (0,5-1 %), Y115G (1-2 %) y I97A (2-5 %).
- 25
- 30

Ejemplo 6: direccionamiento de actividad de TNF sobre células MCF7 que expresan mLR

- 35 Se evaluó la toxicidad de TNF dirigido a mLR NB sobre células MCF7 y MCF7-mLR. Se evaluaron diferentes mutaciones (I97A3x, I97S3x e Y115A3x) así como diferentes enlazadores entre sc hTNF y mLR NB (6xGGS, 13xGGS, 19xGGS). Como se muestra en la figura 8A, se redujo la toxicidad 20 veces mediante la mutación I97A3x y 500 veces mediante la mutación I97S3x e Y115A3x, lo que es similar a lo observado para el TNF trimerizante individual (figura 7). Además, en las células MCF7 que no expresan mLR, la fusión a mLR NB no altera la actividad de WT o el mutante sc hTNF (figura 8A), mientras que esta fusión reactiva a todos los mutantes sc hTNF sobre las células MCF7-mLR (figura 8B). Se calcula que las células que expresan el mLR son 100 veces más sensibles que las células MCF7 parentales a I97S3x y Y115A3x sc hTNF acoplado a NB. Sin embargo, estos TNF modificados dirigidos son todavía aproximadamente 20 veces menos activos que WT sc hTNF. En cambio, el TNF modificado dirigido I97A3x se restaura a los niveles de actividad WT sobre las células MCF7-mLR, lo que corresponde a una
- 40
- 45 reactivación de 20 veces (figura 8B).

Ejemplo 7: direccionamiento de actividad de TNF sobre células MCF7 que expresan hCD20

- Para evaluar el efecto de otros restos de direccionamiento para el direccionamiento de TNF modificado, reemplazamos mLR NB en las construcciones del ejemplo 6 por hCD20 NB y evaluamos su toxicidad sobre las células MCF7 y las células MCF7 que expresan hCD20 (MCF7-hCD20). Los resultados se muestran en la figura 9. Según lo esperado, los TNF modificado dirigidos mLR NB y hCD20 NB se comportaron de forma similar sobre las células MCF7 parentales (figura 8A y 9A).
- 50

Ejemplo 8: direccionamiento de actividad TNF sobre células que expresan hCD20 con una configuración de fusión de hCD20 NB diferente.

- Intentamos mejorar las construcciones hCD20 NB-TNF mediante la colocación de NB en frente en lugar de a continuación de sc hTNF. También evaluamos 2 mutaciones adicionales menos drásticas (Y87F3x y Y115G3x, figura 7). Los estudios de toxicidad de MCF7 y MCF7-hCD20 con estas construcciones se muestran en la figura 10. Sc hTNF acoplado a hCD20 NB produce la misma toxicidad sobre las células MCF7 que el mutante correspondiente acoplado a Bcl10 NB de control (figura 10A) y el nivel de actividad es similar al observado para los mutantes de TNF trimerizantes individuales (figura 7). Esta toxicidad reducida de los mutantes se invierte (parcialmente) tras el direccionamiento de hCD20 sobre las células MCF7-hCD20: TNF modificado acoplado a hCD20 NB produce un
- 60
- 65 aumento de la actividad de 10 veces (Y115G3x), 15 veces (Y87F3x), 100 veces (I97S3x, Y115A3x) o incluso mayor (Y87Q3x) en comparación con los sc hTNF acoplados a NB de control Bcl10 correspondientes (figura 10B). En este

experimento, cuando hCD20 NB se coloca en el extremo carboxi en lugar del extremo amino de sc hTNF, la reactivación es inferior (figura 9B).

Ejemplo 9: comparación de diferentes combinaciones de mutantes

5 A pesar de que la diferencia de TNF modificado dirigido contra TNF modificado no dirigido es de al menos 100 veces, algunas mutaciones muestran una actividad rescatada inferior que los niveles de actividad de WT (Y87Q3x) lo que podría afectar sus efectos antitumorales. Alternativamente, algunas mutaciones aún tienen algo de actividad residual (I97S3x e Y115A3x) que podría producir algo de toxicidad (sistémica) cuando se utilizan *in vivo*. Para
10 superar estos posibles inconvenientes, evaluamos construcciones adicionales mediante la mutación de diferentes residuos en las cadenas individuales de sc hTNF con el fin de observar si los niveles de actividad podrían modularse adicionalmente de ese modo. Como se muestra en la figura 11, la combinación de diferentes mutaciones en la cadena simple puede alterar la actividad residual en las células no dirigidas y en el nivel de reactivación tras el direccionamiento.

Ejemplo 10: comparación de TNF trimerizante individual dirigido contra hTNF modificado monocatenario.

Para comparar la eficacia de TNF trimerizante individual dirigido contra TNF monocatenario, WT o I97A hTNF se
20 acopló en el extremo C a mLR NB como un monómero. Se evaluó la toxicidad sobre las células MCF7 y las células MCF7 que expresan mLR (MCF7-mLR) y se muestra en la figura 12. También en la forma trimerizante individual, la mutación I97A es tóxica sobre las células MCF7, pero en menor medida que WT hTNF (figura 8A y figura 12A). Además, cuando se acopla en el extremo C al nanocuerpo de mLR, el TNF trimerizante individual, pero no el TNF monocatenario, se vuelve menos tóxico sobre las células MCF7 y este es el caso para WT y I97A (figura 8A y figura 12A). Muy probablemente, los 3 nanocuerpos presentes en el trímero de hTNF formado con las construcciones de
25 TNF-mLR NB trimerizante individual impiden estéricamente la unión de hTNF a su receptor. Sin embargo, esta actividad reducida se puede invertir mediante direccionamiento a mLR sobre las células MCF7-mLR (figura 12B). De manera interesante, esto ofrece un nivel adicional de modulación de la actividad: se pueden combinar diferentes mutaciones, así como utilizar el impedimento estérico para afectar la actividad residual y el nivel de reactivación tras el direccionamiento.

30 Para evaluar si este es un fenómeno general, los inventores acoplaron WT y Y115A hTNF trimerizante individual en el extremo N a Bcl10 o el nanocuerpo hCD20 y evaluamos su toxicidad sobre las células MCF7 y MCF7-hCD20. Como se muestra en la figura 13A, este acoplamiento no afecta la toxicidad de WT o Y115A3x hTNF trimerizante individual. Además, tras el direccionamiento, Y115A3x hTNF trimerizante individual se vuelve tan activo como WT hTNF trimerizante individual no dirigido (figura 13B).

Ejemplo 11: evaluación de toxicidad *in vivo* de hTNF modificado dirigido.

La evaluación de la toxicidad de los mutantes de hTNF de forma preclínica no es evidente ya que TNF presenta una
40 especificidad de especie notoria en los ratones. A diferencia de mTNF, hTNF solo induce letalidad en dosis extremadamente altas (Brouckaert et al. 1992). Aunque por mucho tiempo se creyó que el motivo de esta especificidad de especie era provocado por la no interacción de hTNF con el TNF-R2 murino, estudios farmacocinéticos han demostrado que hTNF se depura más rápidamente que mTNF en los ratones y que la exposición a hTNF limitada resultante es la responsable de su falta de morbilidad (Ameloot et al. 2002).

45 Sin embargo, cuando se tratan con un agente sensibilizante como D-galactosamina, la especificidad de especie se anula y dosis extremadamente bajas (≤ 500 ng) de hTNF son tan letales como mTNF (Broeckeaert et al., 1992). Por lo tanto, para evaluar la toxicidad *in vivo* de los diversos hTNF modificados dirigidos, se inyectaron ratones por vía intraperitoneal con 500 ng de hTNF recombinante (r), sc hTNF WT o sc hTNF mutante (Y87Q3x o Y115A3x). Se acoplaron hTNF modificado y sc WT en el extremo N a Bcl10 o a hCD20 NB. Como se muestra en la figura 14, sc
50 WT hTNF es al menos tan tóxico como rhTNF ya que provoca hipotermia grave y mortalidad 10 h después de la inyección. hTNF modificado dirigido Y87Q3x y Y115A3x no provocaron signos de morbilidad (piloerección, temblores, letargo, pérdida de la preparación o caída de la temperatura corporal; véase la figura 14A para esta última).

Ejemplo 12: evaluación de toxicidad y efecto antitumoral *in vivo* de mTNF modificado dirigido.

55 Como ya se ha mencionado, la toxicidad *in vivo* de hTNF no se puede evaluar fácilmente en los ratones. Por lo tanto, y debido a los experimentos antitumorales anticipados en ratones singénicos inmunocompetentes, los inventores decidieron mutar los residuos de mTNF homólogos a los seleccionados para hTNF (véase el ejemplo 5). Como se ilustra en la figura 15, Bcl10NB-sc mTNF WT provocó morbilidad grave (figura 15 A) y 100 % de mortalidad
60 (figura 15B) cuando se inyectó por vía intravenosa en dosis de hasta 10 μ g. En cambio, Bcl10NB-sc mTNF Y86F3x no indujo la mortalidad (figura 15B) ni provocó signos de toxicidad (piloerección, temblores, letargo, pérdida de la preparación o caída de la temperatura corporal; véase la figura 15A para esta última), ni siquiera cuando se inyectó como un bolo intravenoso de 200 μ g. Sin embargo, cuando se inyectó diariamente de forma paralesional en una dosis de 35 μ g en ratones que presentaban tumores B16Bl6-mCD20, sc mTNF Y86F3x acoplado a nanocuerpo
65 pudo reducir/prevenir el crecimiento tumoral, especialmente cuando estaba dirigido a mCD20 (figura 16A). El efecto del TNF mutante no dirigido sobre el crecimiento tumoral (figura 16A) se debe a la alta dosis (35 μ g) utilizada, ya que

las dosis inferiores se asemejan más a los animales tratados con PBS (no se muestran los datos). El tratamiento diario con NB-sc mTNF Y86F3x no provocó ningún signo de morbilidad o mortalidad, mientras que los ratones que presentaban tumores tratados con NB-sc mTNF WT perecieron después de 1 o 2 inyecciones (figura 16B).

5 Referencias

- Ameloot, P., Takahashi N., Everaerd, B., Hostens, J., Eugster, H.P., Fiers, W. y Brouckaert, P. (2002). *Bioavailability of recombinant tumor necrosis factor determines its lethality in mice. Eur J Immunol*, 32, 2759-65.
- Arap, W., Pasqualini, R. y Ruoslahti, E. (1998). *Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. Science*, 279, 377-380.
- Ashkenazi, A. y Herbst, R.S. *To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. J Clin Invest* 118, 1979-1990 (2008).
- Blake, A.W., McCartney, L., Flint, J., Bolam, D.N., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. y Knox, J.P. (2006) *Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes. J. Biol. Chem.* 281, 29321-29329.
- Boschert, V. et al. *Single chain TNF derivatives with individually mutated receptor binding sites reveal differential stoichiometry of ligand receptor complex formation for TNFR1 and TNFR2. Cell Signal* 22, 1088-1096 (2010).
- Brecht et al., *Peptide immobilization and characterization of binding specificity. J Biol Chem* 268: 15425-15434
- Brouckaert, P., Libert, C., Everaerd, B. y Fiers W (1992). *Selective species specificity of tumor necrosis factor for toxicity in the mouse. Lymphokine Cytokine Res*, 11, 193-6.
- Brown, K.C. (2010). *Peptidic tumor targeting agents; the road from phage display selections to clinical applications. Curr. Pharm. Des.* 16, 1040-1054.
- Daburon, S. et al. *Functional characterization of a chimeric soluble Fas ligand polymer with in vivo anti-tumor activity. PLoS One* 8, e54000 (2013).
- de Bruyn, M., Bremer, E. y Helfrich, W. *Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer. Cancer Lett* 332, 175-183 (2013).
- Dimitrov, D.S. (2009) *Engineered CH2 domains (nanoantibodies). mAbs* 1, 26-28.
- Eyckerman, S., Waelput, W., Verhee, A., Broekaert, D., Vandekerckhove, J. y Tavernier, J. (1999). *Eur. Cytok. Netw.* 10, 549-559.
- Falschlehner, C., Ganten, T.M., Koschny, R., Schaefer, U. y Walczak, H. *TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. Adv Exp Med Biol* 647, 195-206 (2009).
- Fox, N.L., Humphreys, R., Luster, T.A., Klein, J. y Gallant, G. *Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) Receptor-1 and Receptor-2 agonists for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther* 10, 1-18 (2010).
- Galle, P.R. et al. *Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. J Exp Med* 182, 1223-1230 (1995).
- Gaur, U. y Aggarwal, B.B. *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem Pharmacol* 66, 1403-1408 (2003).
- Ghahroudi A.M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., Muyldermans, S. (1997). *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. FEBS Lett.* 414, 521-6
- Gregorc, V. et al. *Phase Ib study of NGR-hTNF, a selective vascular targeting agent, administered at low doses in combination with doxorubicin to patients with advanced solid tumours. Br J Cancer* 101, 219-224 (2009).
- Hehlhans, T. y Pfeffer, K. *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology* 115, 1-20 (2005).
- Huang, Y. y Sheikh, M.S. *TRAIL death receptors and cancer therapeutics. Toxicol Appl Pharmacol* 224, 284-289 (2007).
- Johnstone, R.W., Frew, A.J. y Smyth, M.J. *The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. Nat Rev Cancer* 8, 782-798 (2008).
- Koivunen, E., Wang, B. y Ruoslahti, E. (1994). *Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha 5\beta 1$ integrin from a phage library. J. Cell. Biol.* 124, 373-380.
- Kolmar, H. (2008) *Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. FEBS J.* 275, 2684-2690.
- Lejeune, F.J., Lienard, D., Matter, M. y Ruegg, C. *Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. Cancer Immun* 6, 6 (2006).
- Li, M. et al. *Phase II multicenter, randomized, double-blind study of recombinant mutated human tumor necrosis factor-alpha in combination with chemotherapies in cancer patients. Cancer Sci* 103, 288-295 (2012).
- Liu, Y. et al. *The antimelanoma immunocytokine scFvMEL/TNF shows reduced toxicity and potent antitumor activity against human tumor xenografts. Neoplasia* 8, 384-393 (2006).
- Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F. y Lesslauer, W. *Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. J Biol Chem* 268, 26350-26357 (1993).
- Nygren, P-A. (2008) *Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. FEBS J.* 275, 2668-2676.
- Ogasawara, J. et al. *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature* 364, 806-809 (1993).
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S.G.F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W.G.J., Kobilka, B.K. y Steyaert, J. (2014). *A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. Nature Protocols* 9, 674-693

- Roberts, N.J., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr. y Holdhoff, M. *Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. Oncotarget* 2, 739-751 (2011).
- Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC. *Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. Cancer Res.* 2006; 66(1):184-91.
- 5 - Scatchard G. *Ann New York Acad Sci* 1949; 51, 660-72.
- Schmidt T, Carmeliet P. *Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leukemia? Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011:1-8.
- Siegemund, M. et al. *Superior antitumoral activity of dimerized targeted single-chain TRAIL fusion proteins under retention of tumor selectivity. Cell Death Dis* 3, e295 (2012).
- 10 - Skerra, A. (2008) *Alternative binding proteins: anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. FEBS J.* 275, 2677-2683.
- Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (2008) *DARPin: a new generation of protein therapeutics. Drug Discov. Today* 13, 695-701.
- 15 - Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A y Sollazzo, M. (1994) *The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. J. Mol. Recognition* 7, 9-24.
- Vanden Berghe, W. et al. *p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. J Biol Chem* 273, 3285-3290 (1998).
- 20 - Vaneycken, I. et al. *Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J* 25, 2433-2446 (2011).
- van Horssen, R., Ten Hagen, T.L. y Eggermont, A.M. *TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. Oncologist* 11, 397-408 (2006).
- Wang, H., Yan, Z., Shi, J., Han, W. y Zhang, Y. *Expression, purification, and characterization of a neovasculature targeted rmhTNF-alpha in Escherichia coli. Protein Expr Purif* 45, 60-65 (2006).
- 25 - Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. *Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. J Clin Invest.* 2013; 123(8):3190-200.
- Yang, Y.H., Rajaiiah, R., Ruoslahti, E. y Moudgil, K.D. (2011). *Peptides targeting inflamed synovial vasculature attenuate autoimmune arthritis. PNAS* 108, 12857-12862.
- 30 - Zabeau, L. et al. *Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach. Biochem J* 441, 425- 434 (2012).

Listado de secuencias

- 35 <110> VIB VZW
UNIVERSITEIT GENT
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER
- 40 <120> MIEMBROS DE LA FAMILIA TNF MODIFICADOS DIRIGIDOS

<130> JT/TNFac/460
- 45 <150> EP 13306046.7
<151> 19-07-2013

<160> 13
- 50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
- 55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador
- 60 <400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
- 65 <210> 2
<211> 49

ES 2 686 668 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 2
 gtcaagatct ggcggttcgg cggccgcaat ggcccagggtg cagctgcag 49

10 <210> 3
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 3
 cagttctaga ttacttatcg tcgtcatcct tgtaatccga accgccgtcc ggagaggaga 60
 cggtgac 67

25 <210> 4
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 4
 gatctggcgg ttcggcggcc gcagattaca aggatgacga cgataagtaa t 51

40 <210> 5
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 5
 ctagattact tatcgtcgtc atccttgtaa tctcgggccg ccgaaccgcc a 51

50 <210> 6
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

55 <400> 6
 tatgatgtgc ccgactacgc tggcggcagc a 31

60 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

65 <400> 7

ES 2 686 668 T3

gatctgctgc cgccagcgta gtcgggcaca tca 33

5 <210> 8
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 8

catatgatgt gcccgactac gctggcggca gcagctctag aacccccagc gataagcctg 60

15 tg 62

<210> 9
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

25 <400> 9
gtcgaccagg gcaatgatgc cgaagt 26

30 <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

35 <400> 10
tgacactggc aaaacaatgc a 21

40 <210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador

<400> 11
ggtcctttc accagcaagc t 21

50 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador

60 <400> 12
gacagccact caccttca 20

<210> 13
<211> 20

ES 2 686 668 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 13
agtcctctt tgctgcttc 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión es una cadena simple que comprende:
- 5 (i) un TNF humano modificado, que comprende tres copias de una cadena de TNF, en el que el TNF modificado tiene afinidad reducida hacia su receptor en comparación con el TNF de tipo silvestre;
- (ii) una secuencia enlazadora; y
- 10 (iii) un resto de direccionamiento simple, en el que dicha secuencia enlazadora une las copias de TNF al resto de direccionamiento, y
- en la que la composición solo muestra actividad biológica significativa hacia células que son dianas del resto de direccionamiento.
- 15 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el TNF modificado es TNF humano que tiene una mutación en la posición Y87, opcionalmente seleccionada entre Y87Q, Y87L, Y87A e Y87F.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el TNF modificado es TNF humano que tiene una mutación en la posición I97, opcionalmente seleccionada entre I97A, I97Q e I97S.
- 20 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el TNF modificado es TNF humano que tiene una mutación en la posición Y115, opcionalmente seleccionada entre Y115A e Y115G.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el resto de direccionamiento comprende un anticuerpo o un nanocuerpo.
- 25 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el resto de direccionamiento se dirige hacia una diana seleccionada entre CD20, Her2, c-Met, EGFR, tenascina C, integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ y CD13.
- 30 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el resto de direccionamiento se dirige hacia CD20.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el resto de direccionamiento se dirige hacia Her2.
9. Una composición que comprende una proteína de fusión monocatenaria, en la que la proteína de fusión comprende
- 35 (i) un TNF humano modificado que comprende tres copias de una cadena de TNF, en el que el TNF humano tiene afinidad reducida hacia su receptor en comparación con el TNF de tipo silvestre y comprende una mutación en la posición Y87;
- 40 (ii) una secuencia enlazadora; y
- (iii) un resto de direccionamiento que comprende un nanocuerpo dirigido a CD20, en el que:
- dicha secuencia enlazadora une las copias de TNF al resto de direccionamiento y
- 45 la composición solo muestra actividad biológica significativa hacia las células que expresan CD20.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que la mutación se selecciona entre Y87Q, Y87L, Y87A e Y87F.
11. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer, comprendiendo el uso administrar una cantidad eficaz de la composición que comprende una proteína de fusión monocatenaria a un paciente que lo necesite, en la que la proteína de fusión comprende:
- 50 (i) un TNF humano modificado que comprende tres copias de una cadena de TNF, en el que el TNF humano tiene afinidad reducida hacia su receptor en comparación con el TNF de tipo silvestre y comprende una mutación en la posición Y87 o Y115;
- 55 (ii) una secuencia enlazadora; y
- (iii) un resto de direccionamiento dirigido a una diana celular, en el que:
- dicha secuencia enlazadora une las copias de TNF al resto de direccionamiento y
- 60 la composición solo muestra actividad biológica significativa hacia células que son dianas del resto de direccionamiento.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que la mutación se selecciona entre Y87Q, Y87L, Y87A e Y87F.
- 65 13. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que la mutación se selecciona entre Y115A e Y115G.

Figura 1

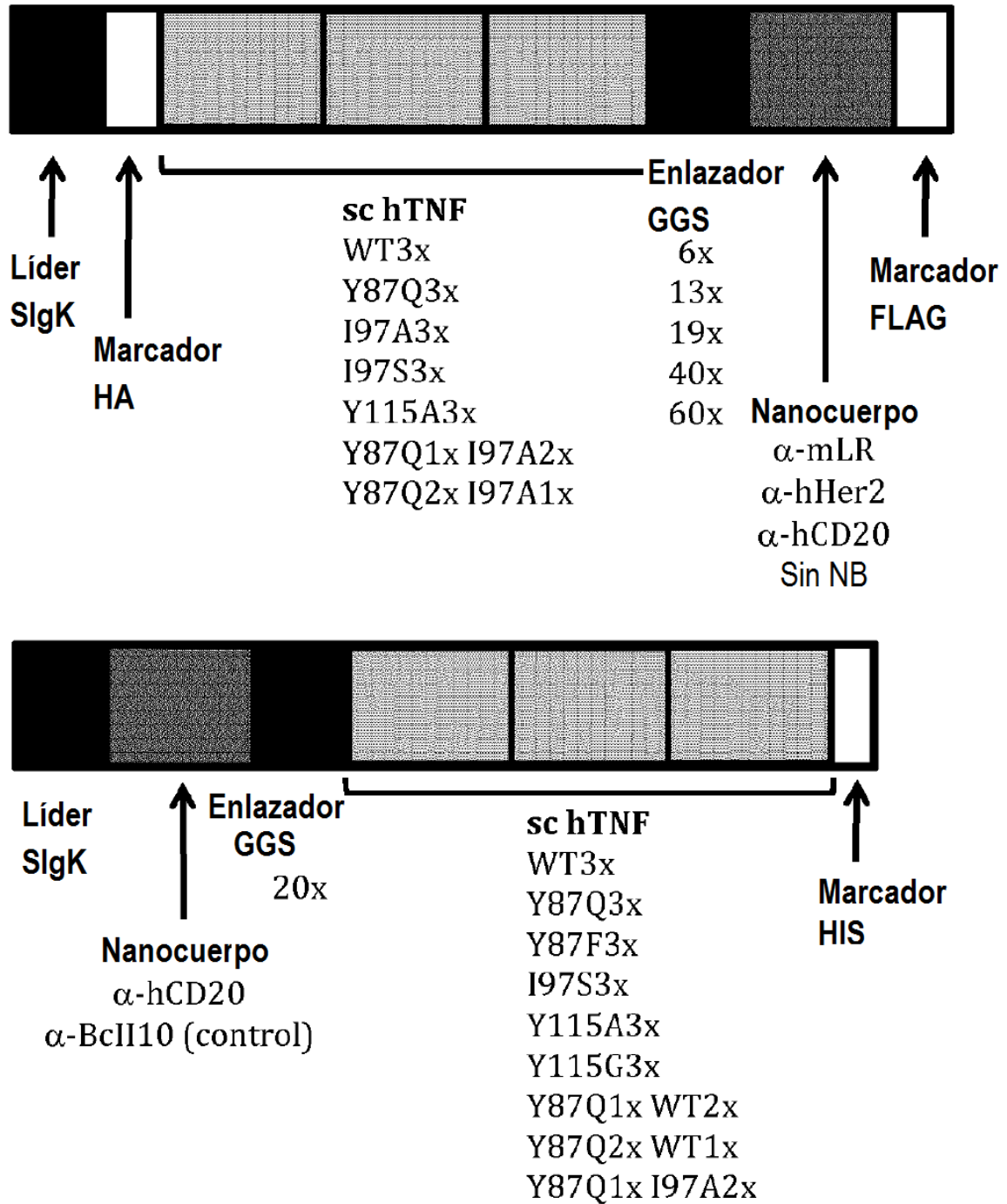


Figura 2

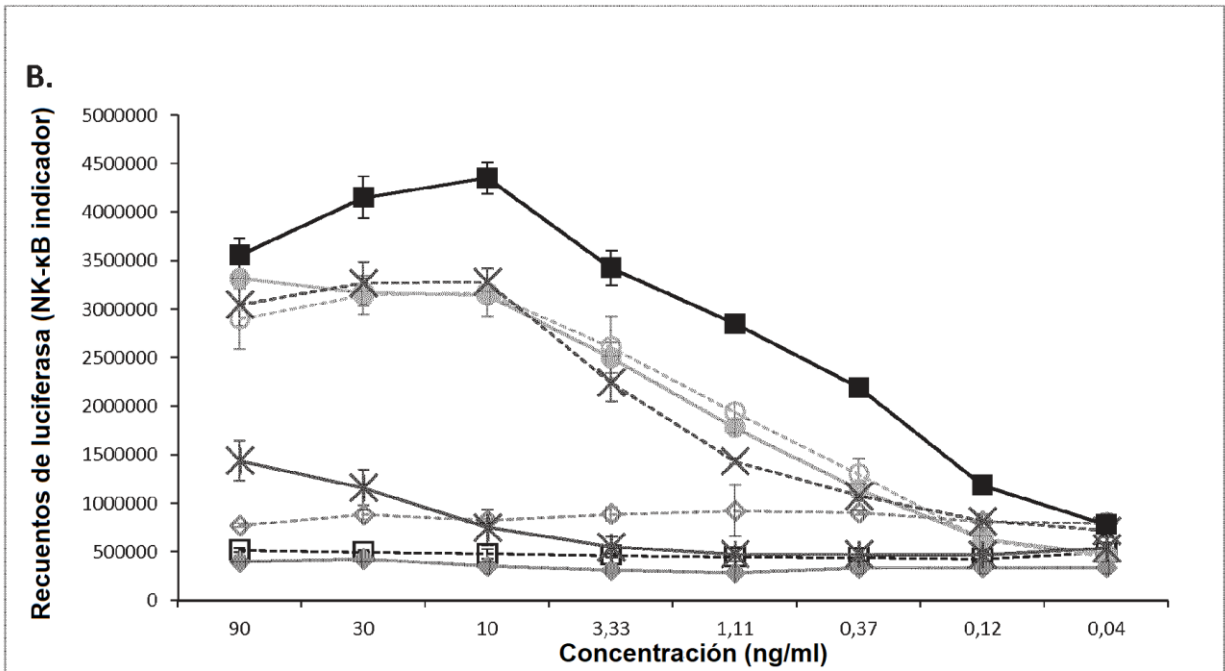
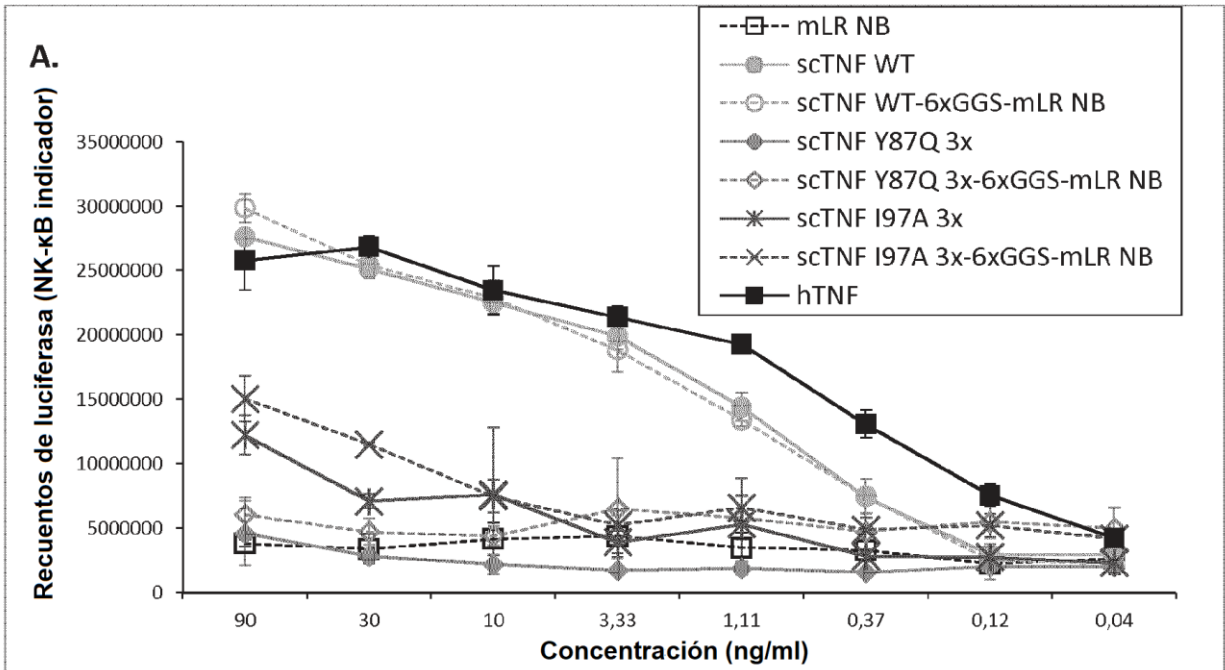
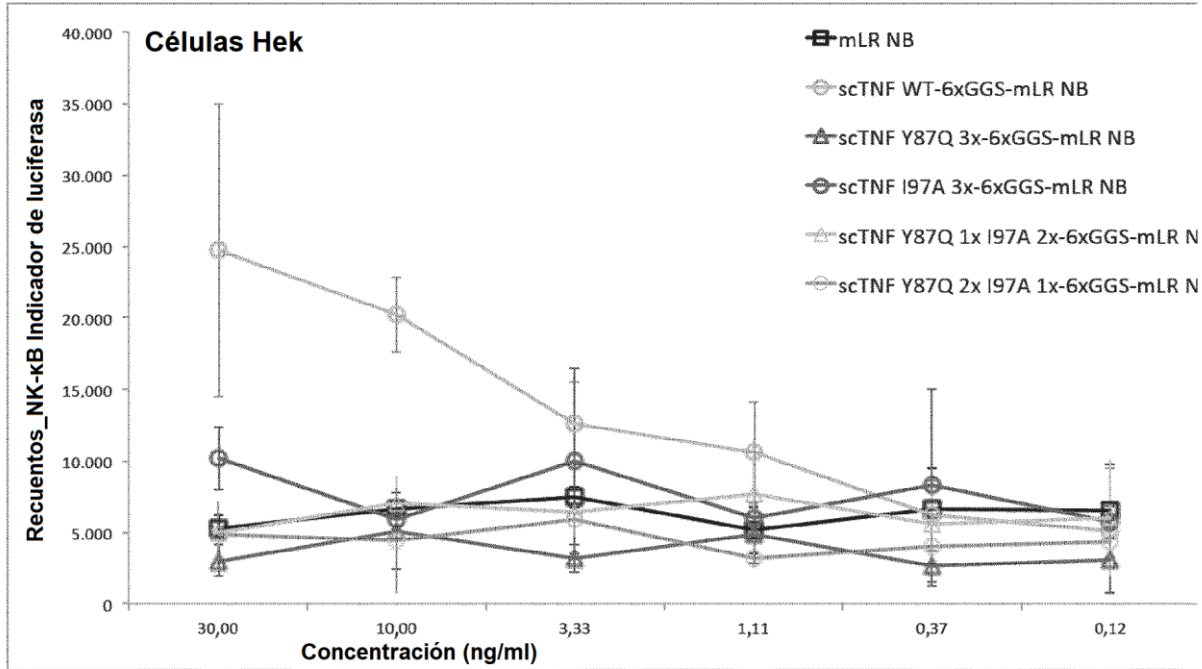


Figura 3

A



B

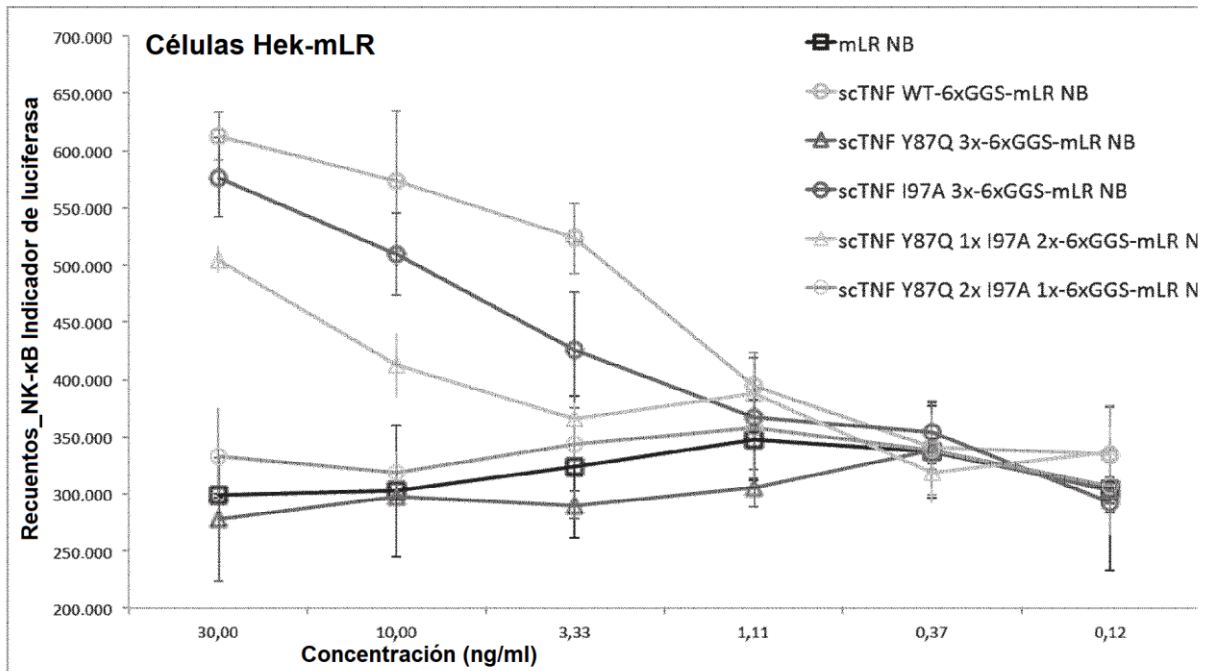
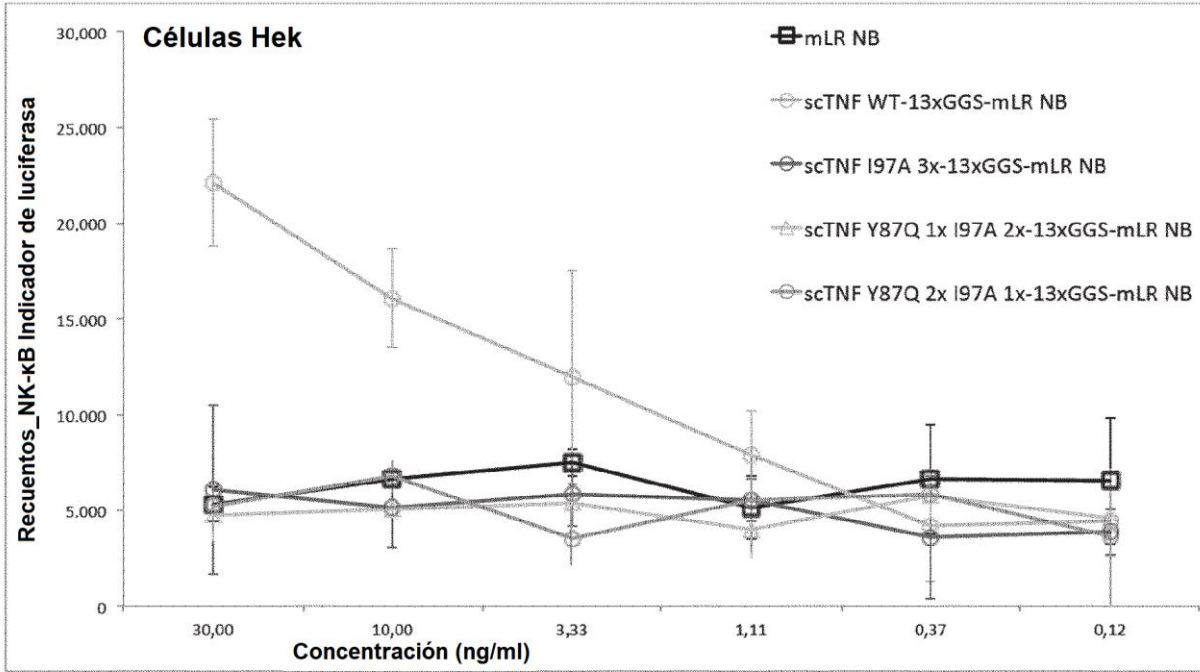


Figura 4

A



B

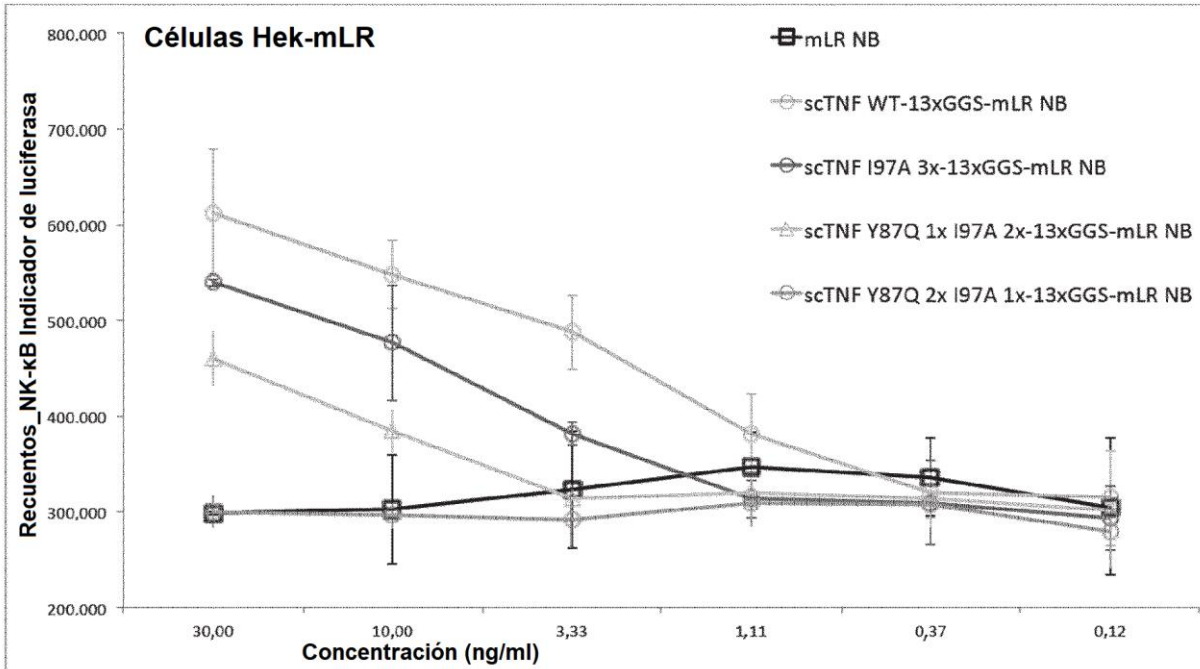
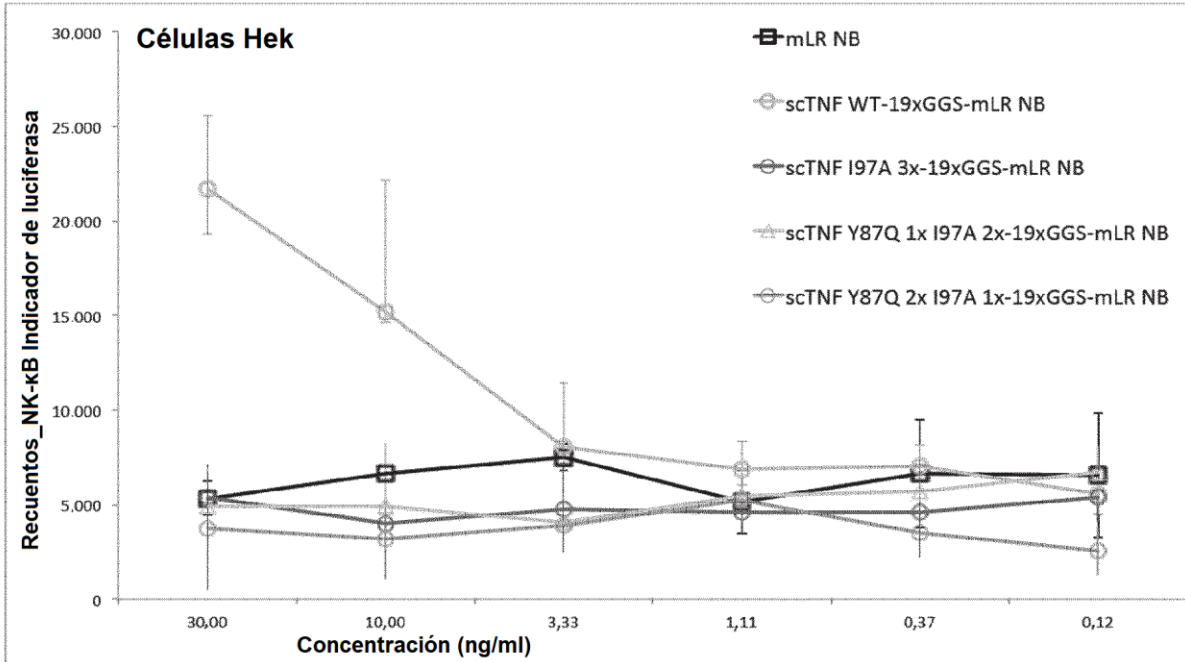


Figura 5

A



B

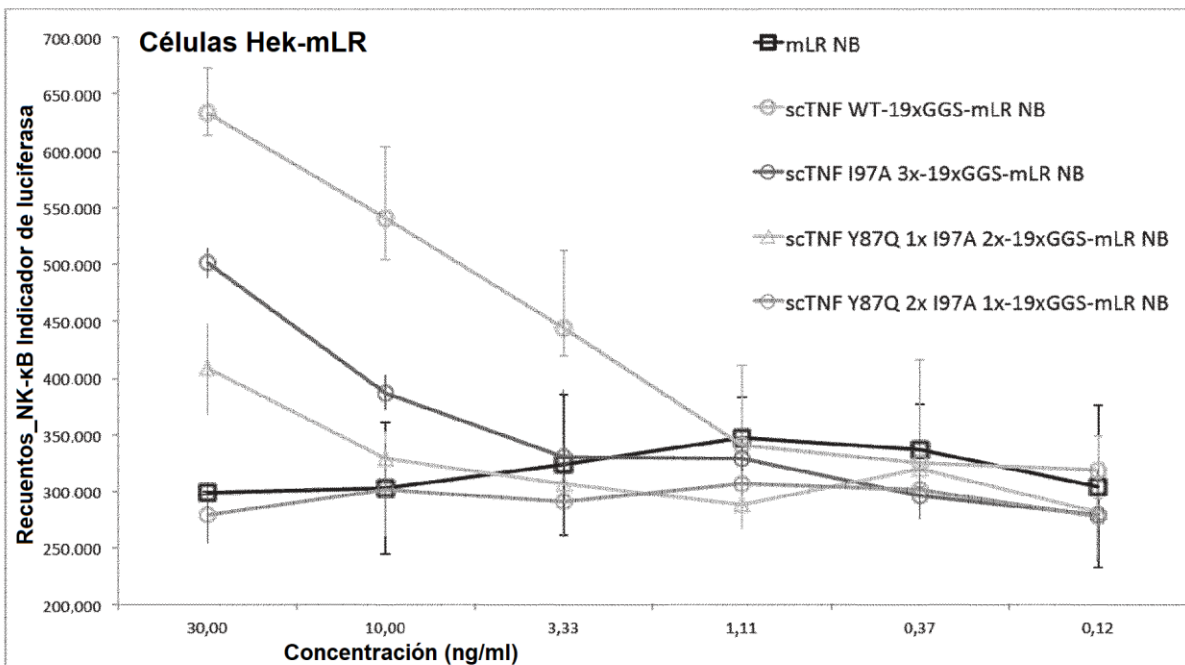


Figura 6

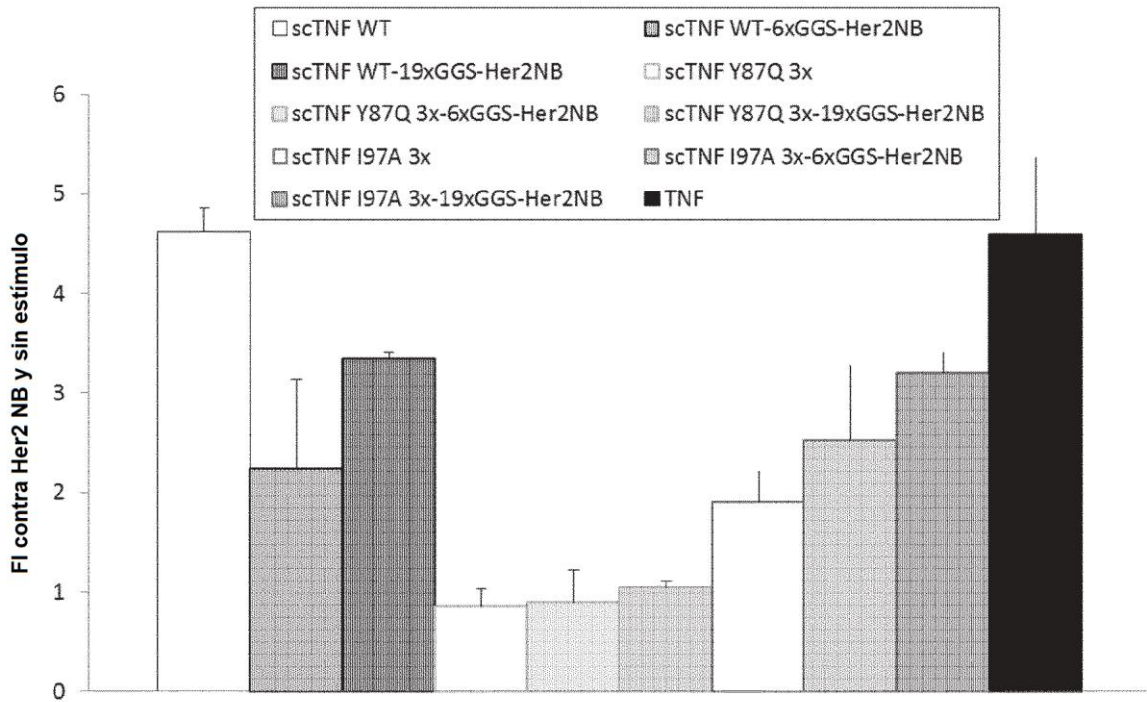


Figura 7

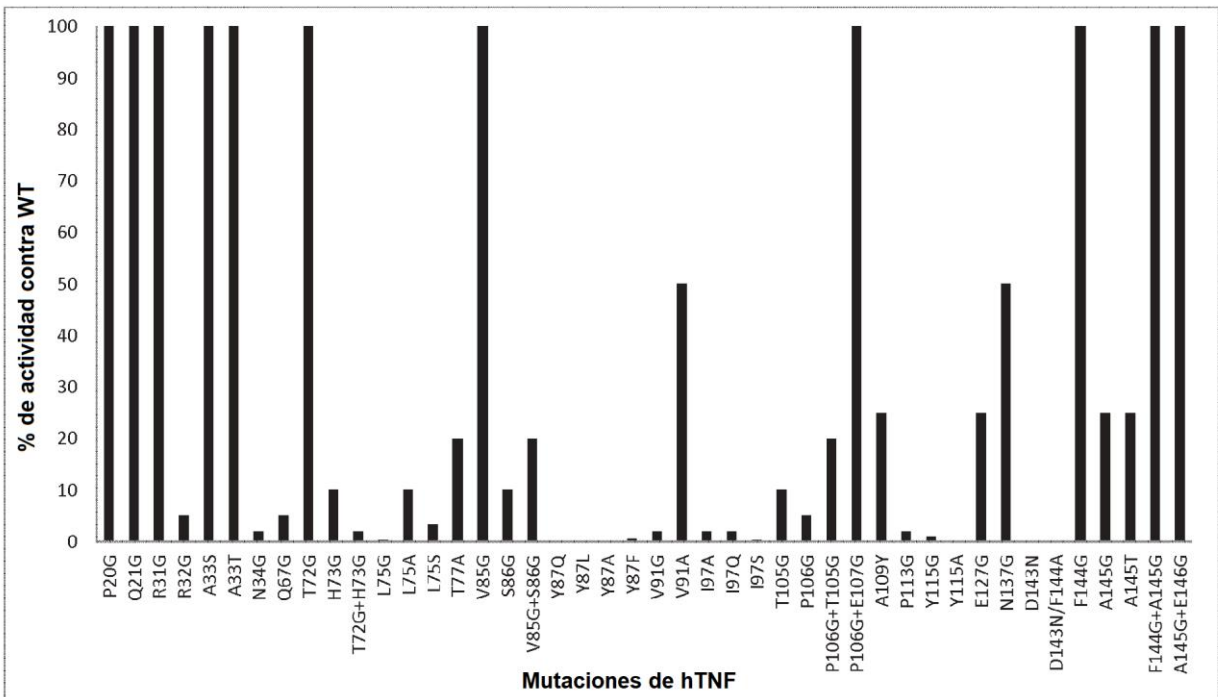
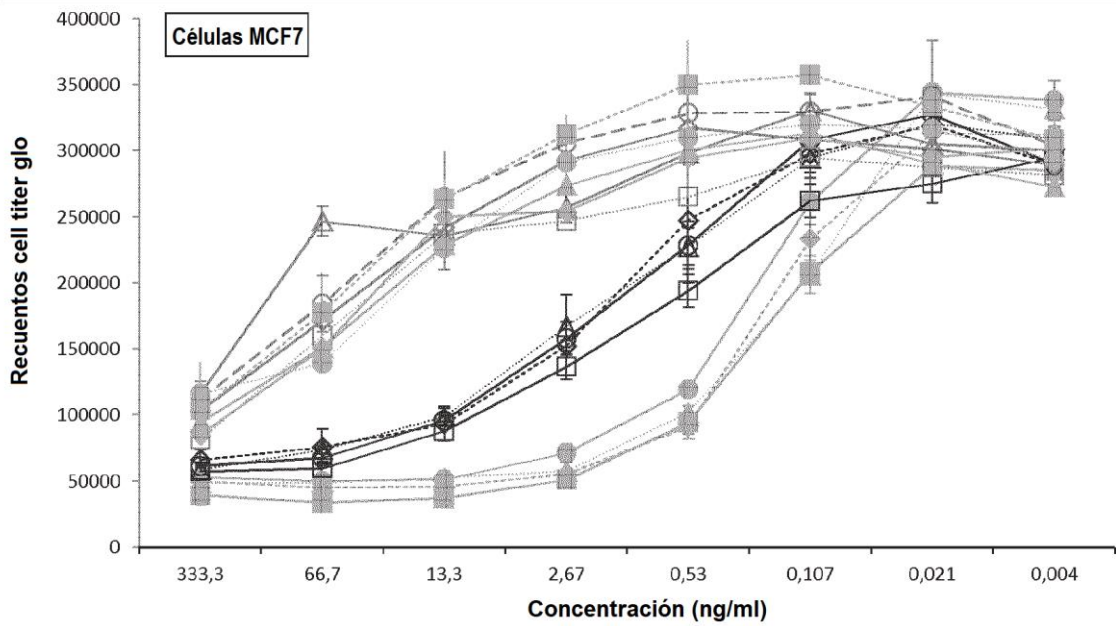
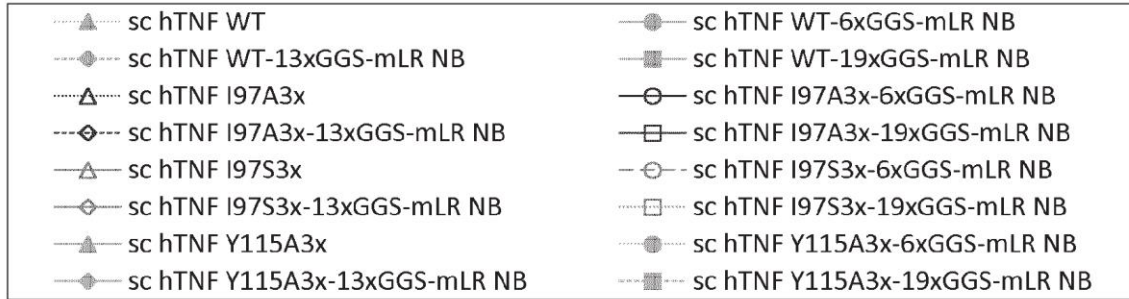


Figura 8

A



B

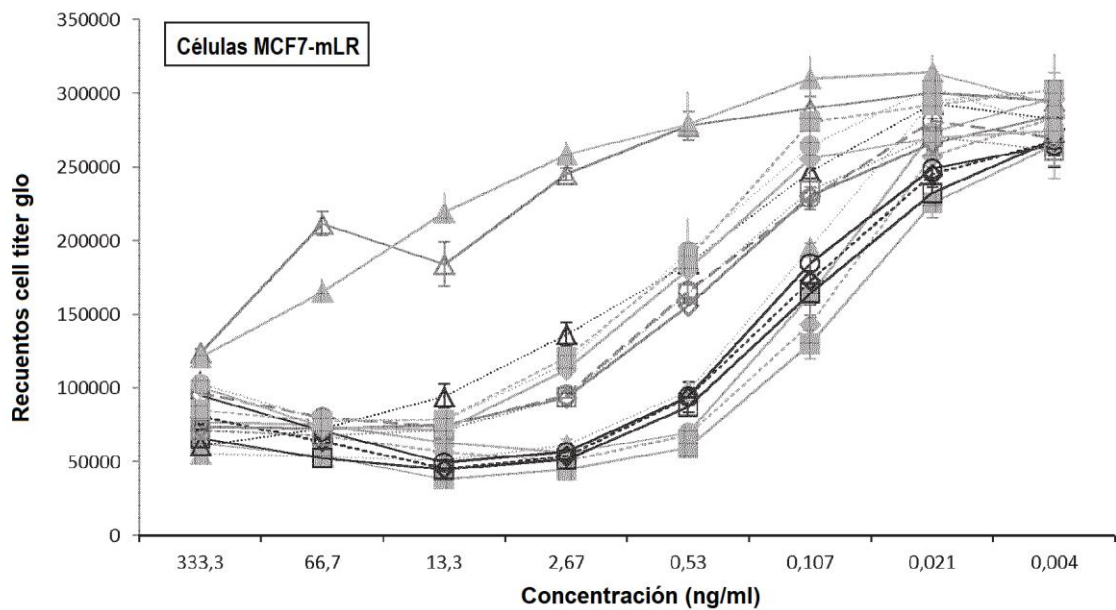
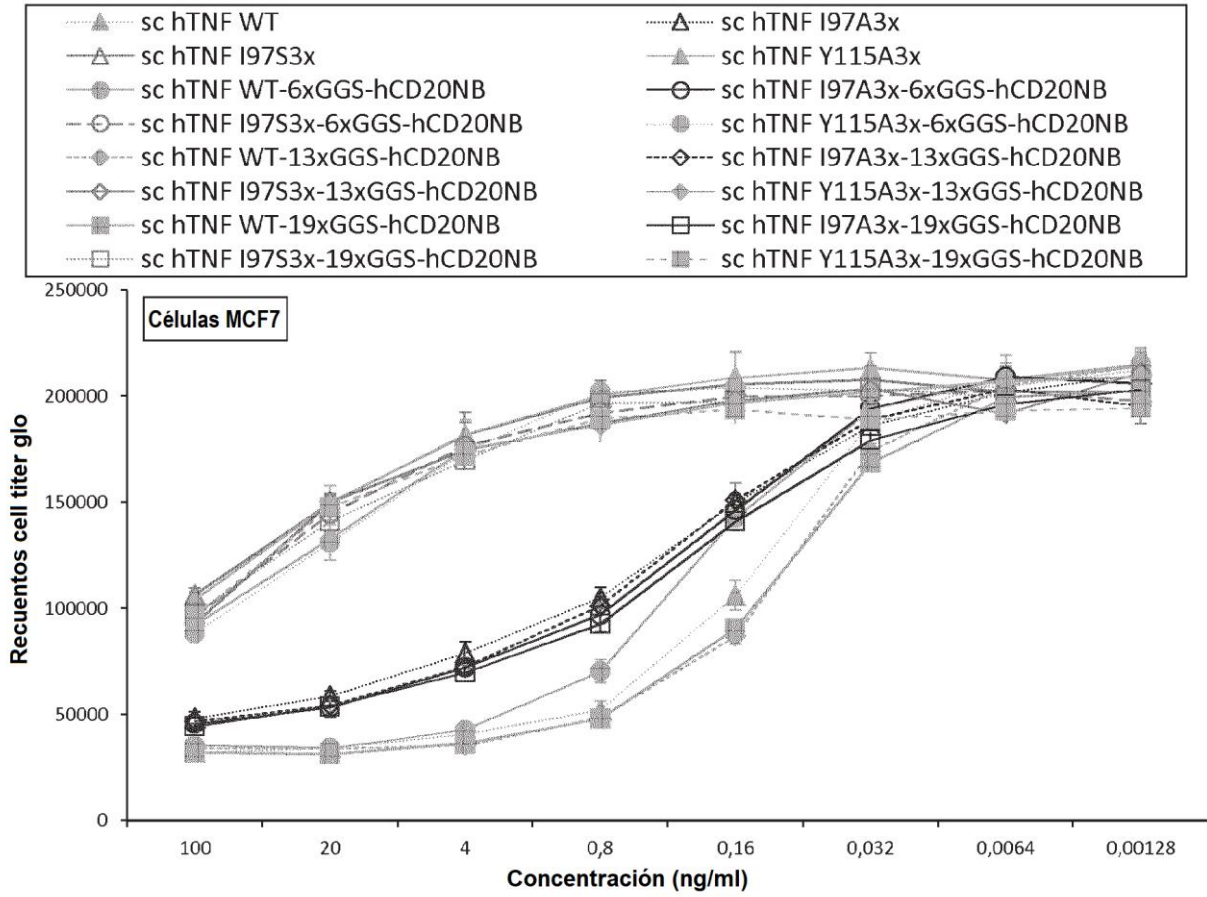


Figura 9

A



B

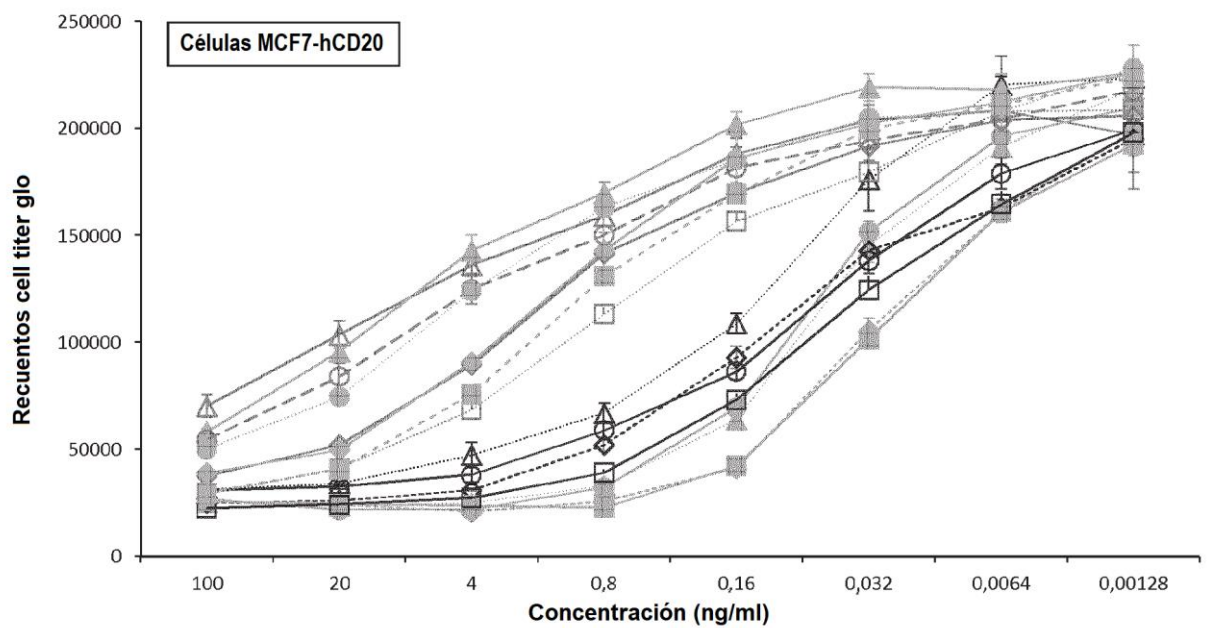
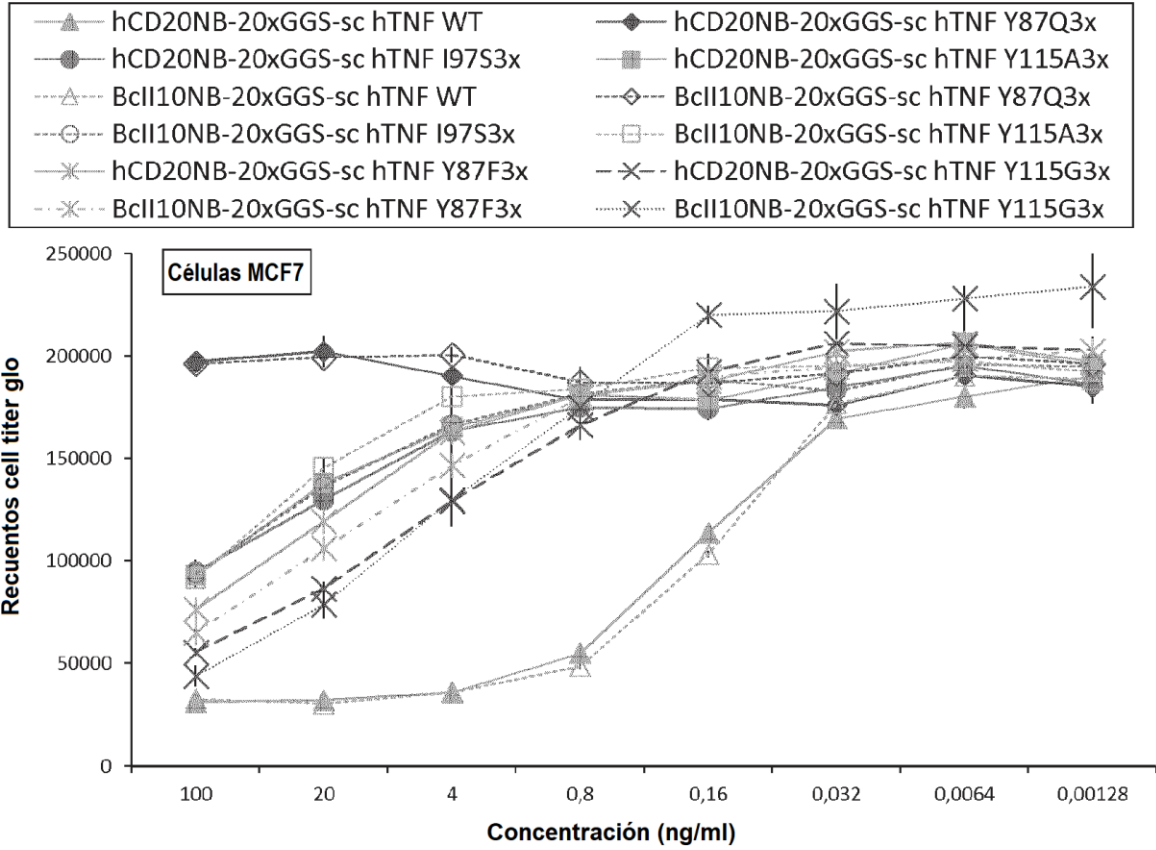


Figura 10

A



B

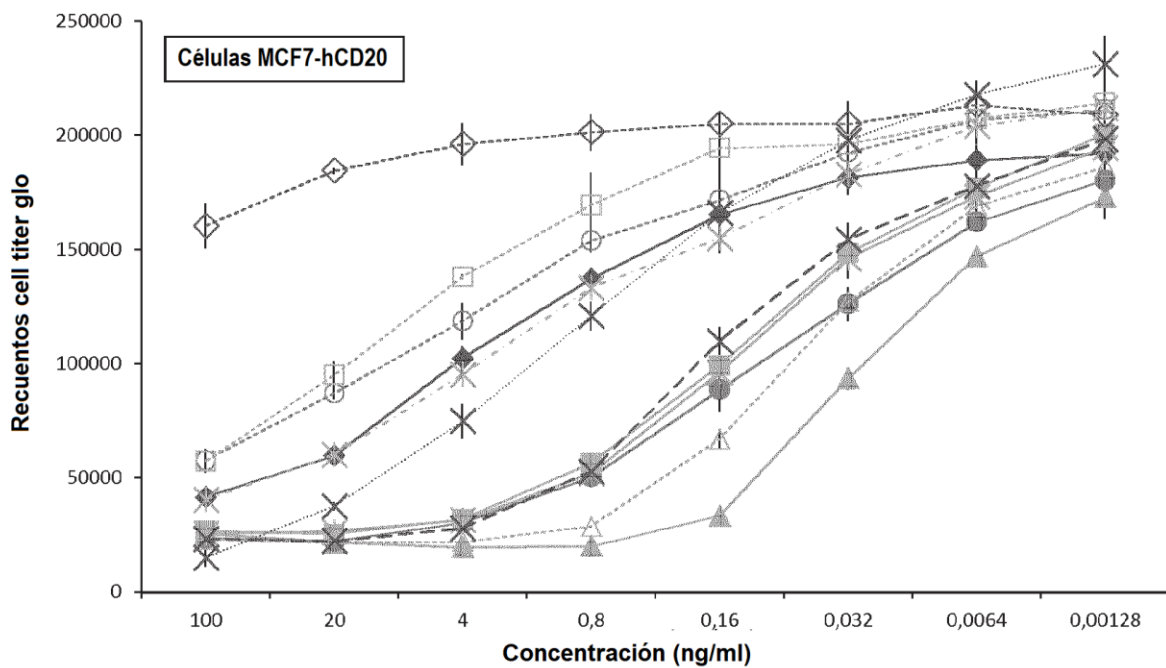
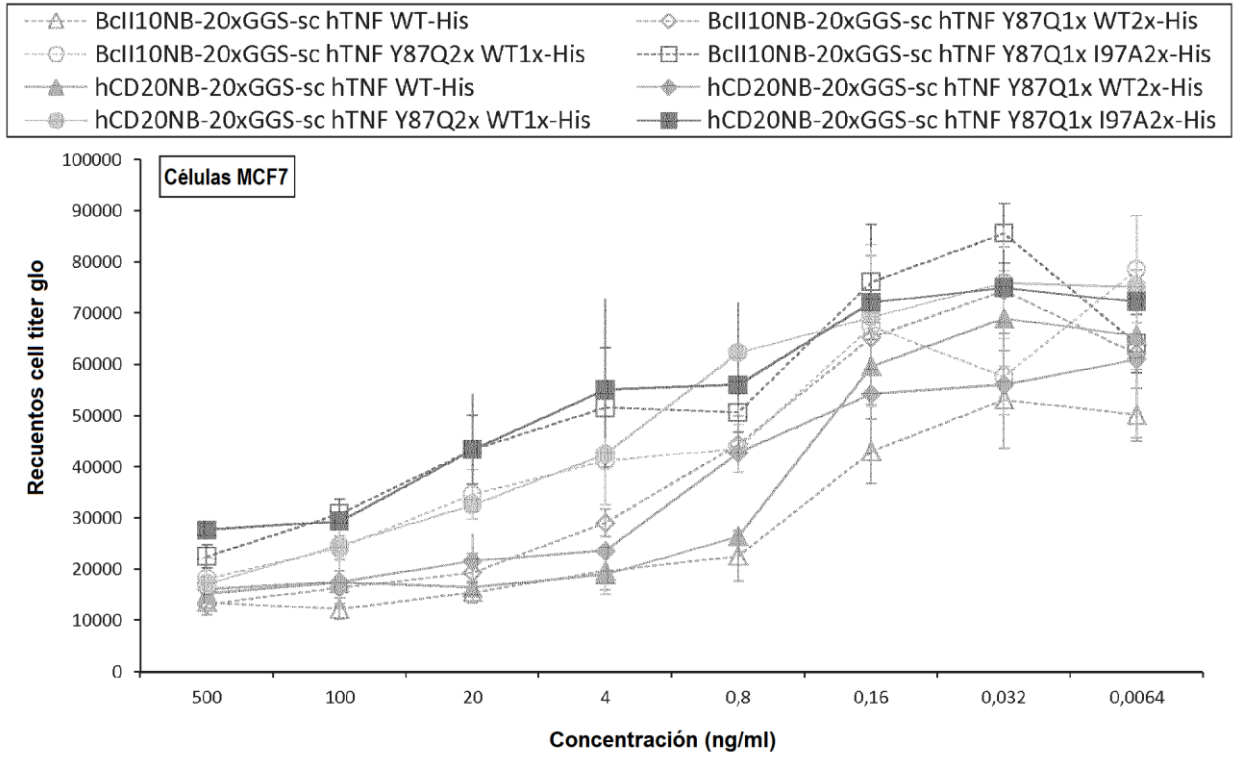


Figura 11

A



B

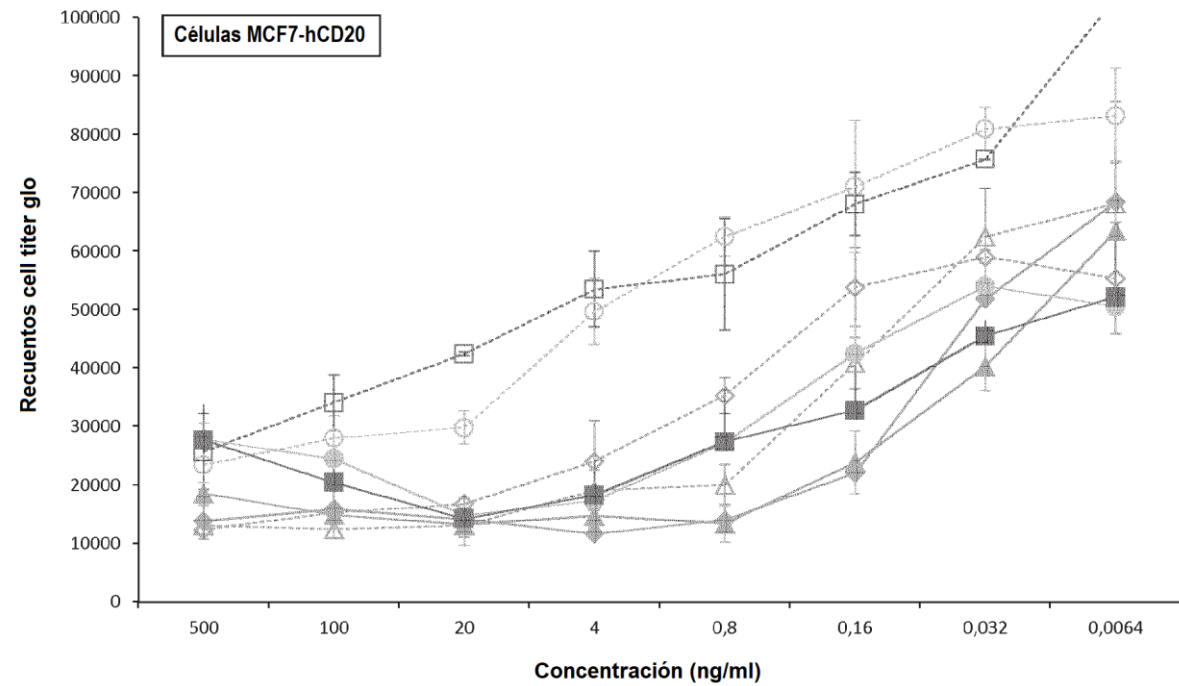
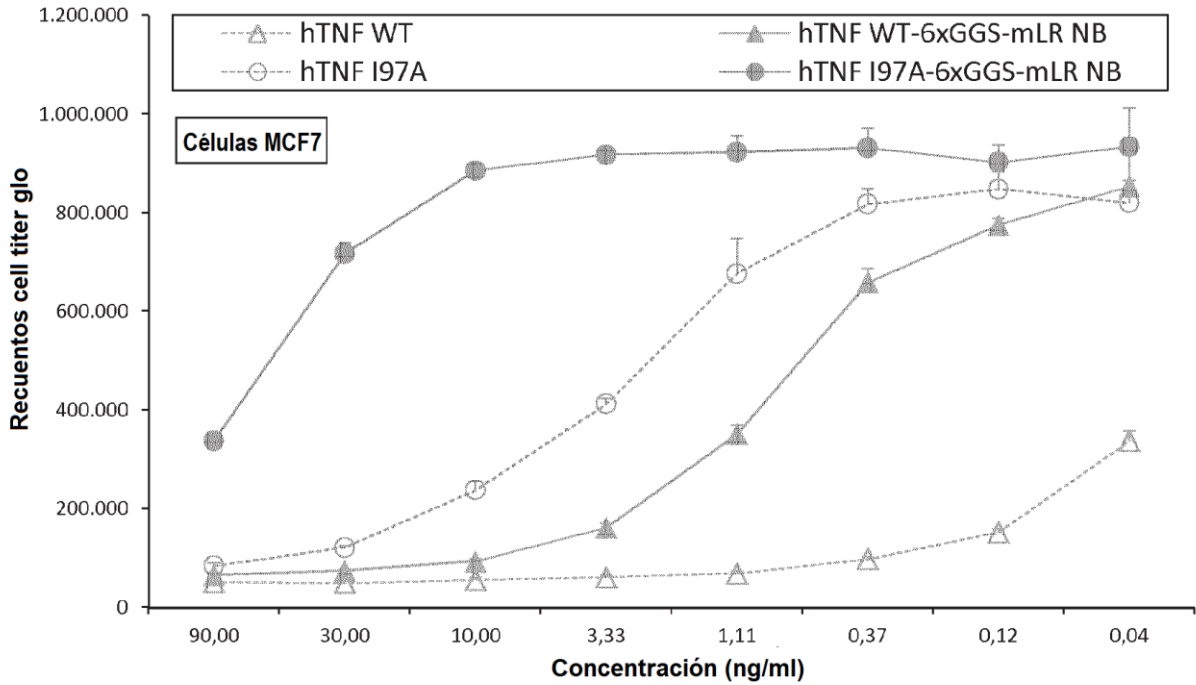


Figura 12

A



B

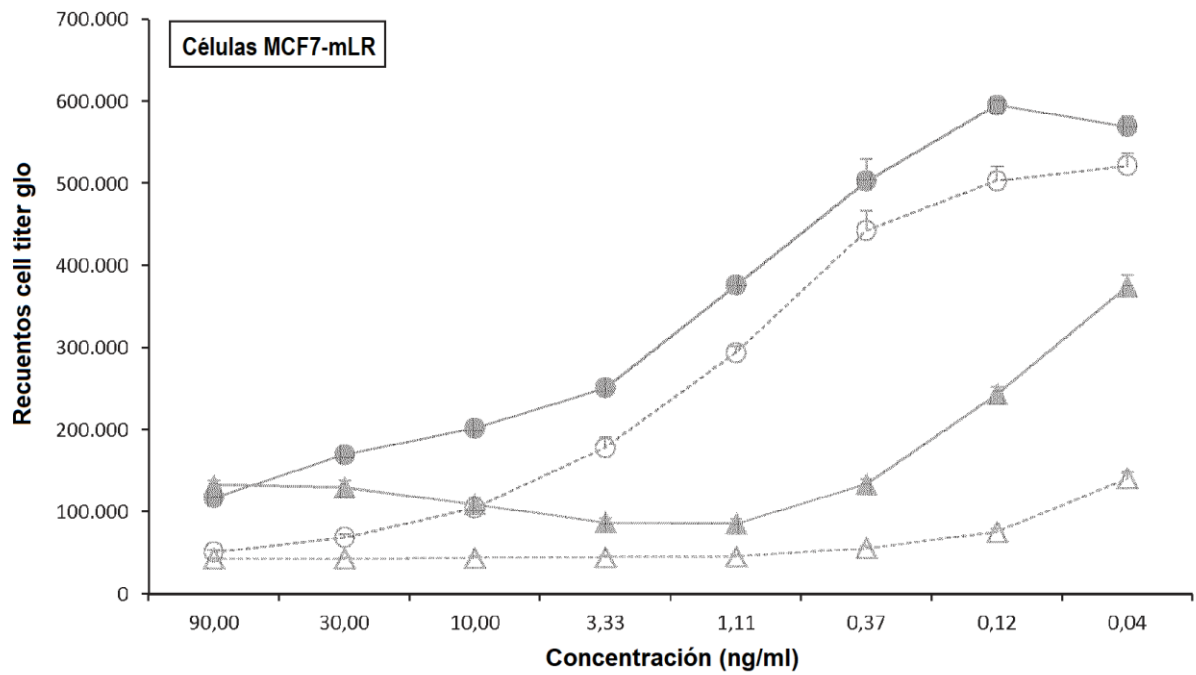
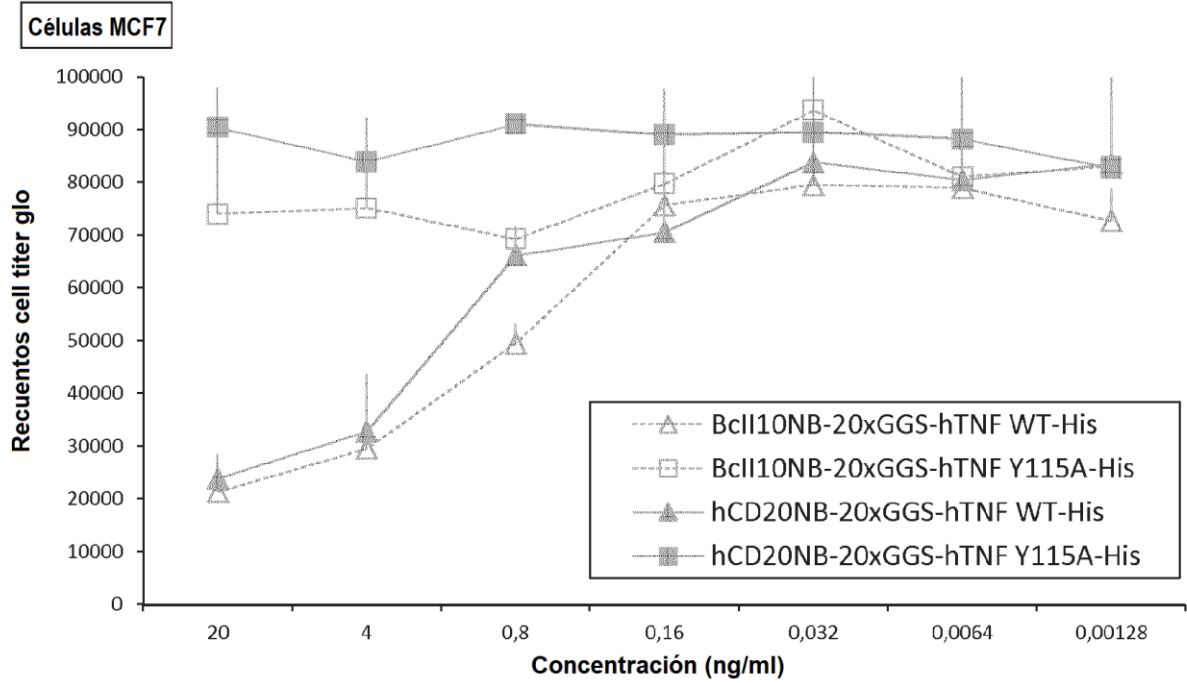


Figura 13

A



B

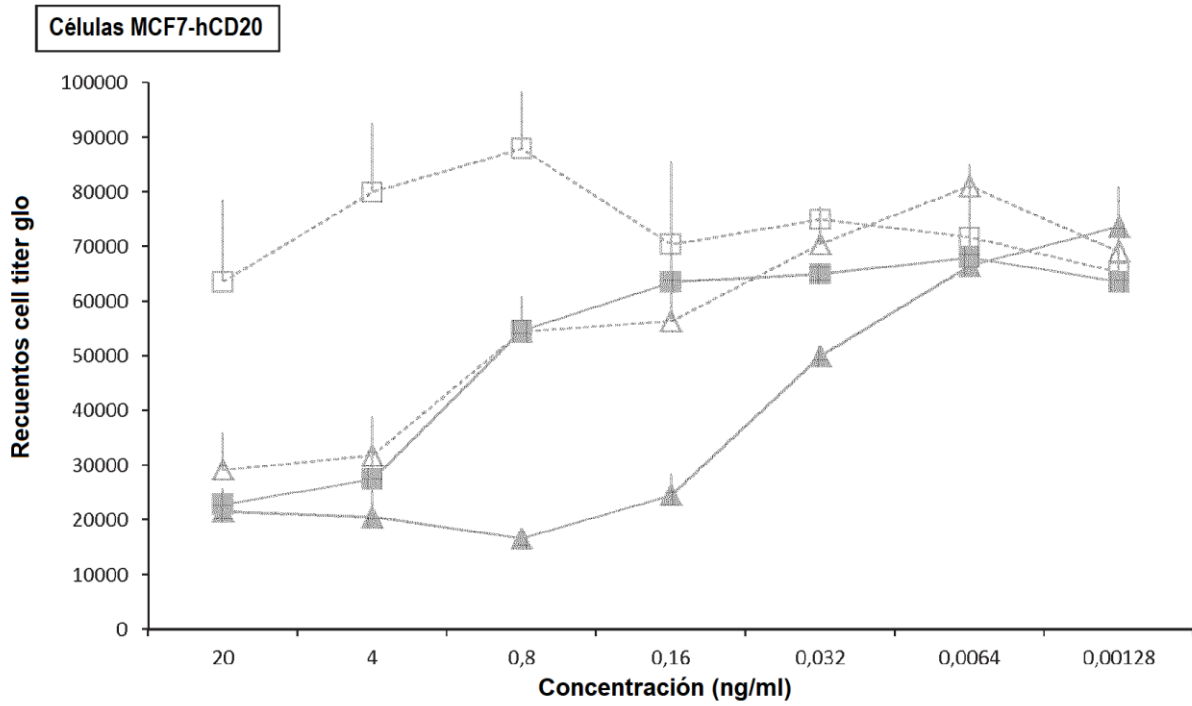
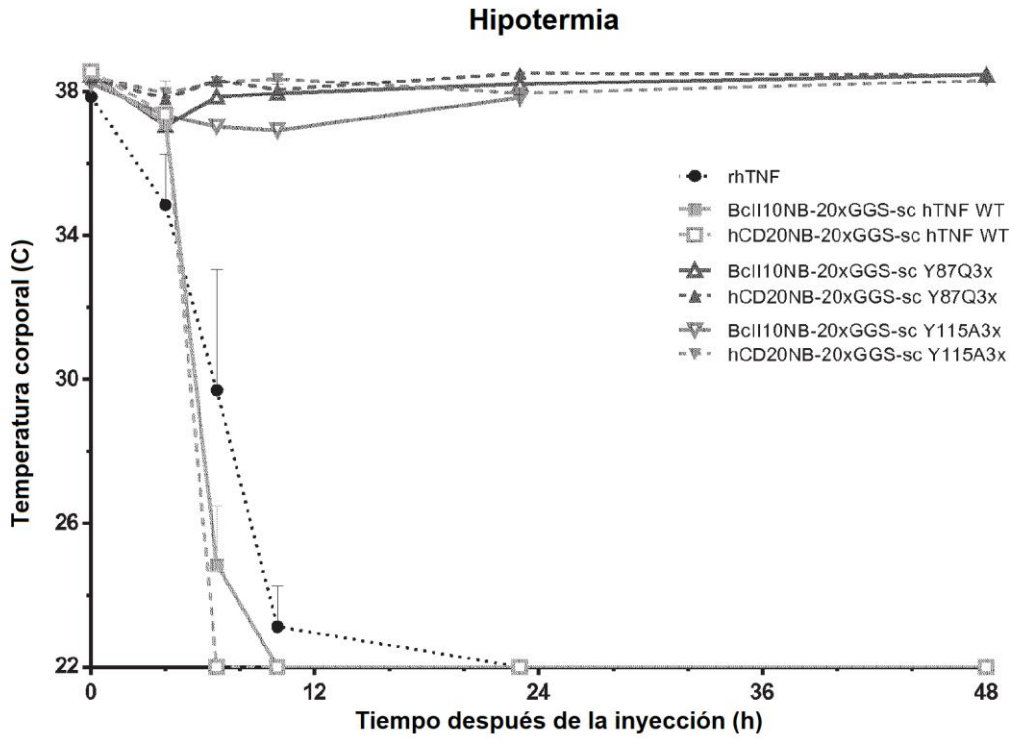


Figura 14

A



B

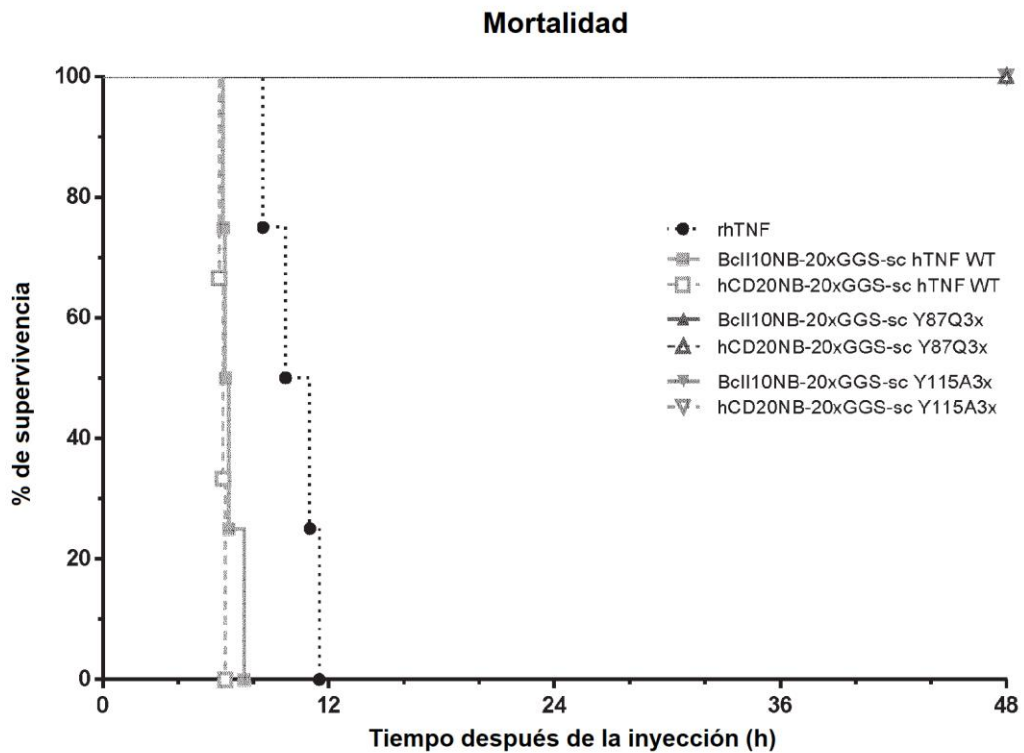
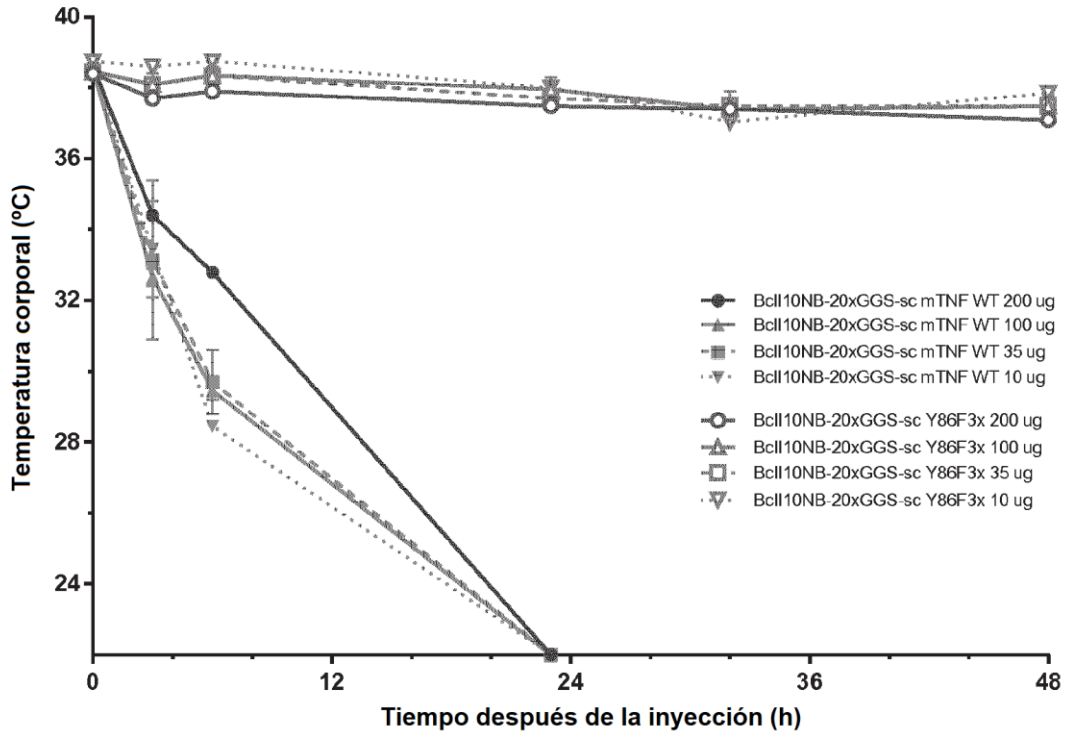


Figura 15

A



B

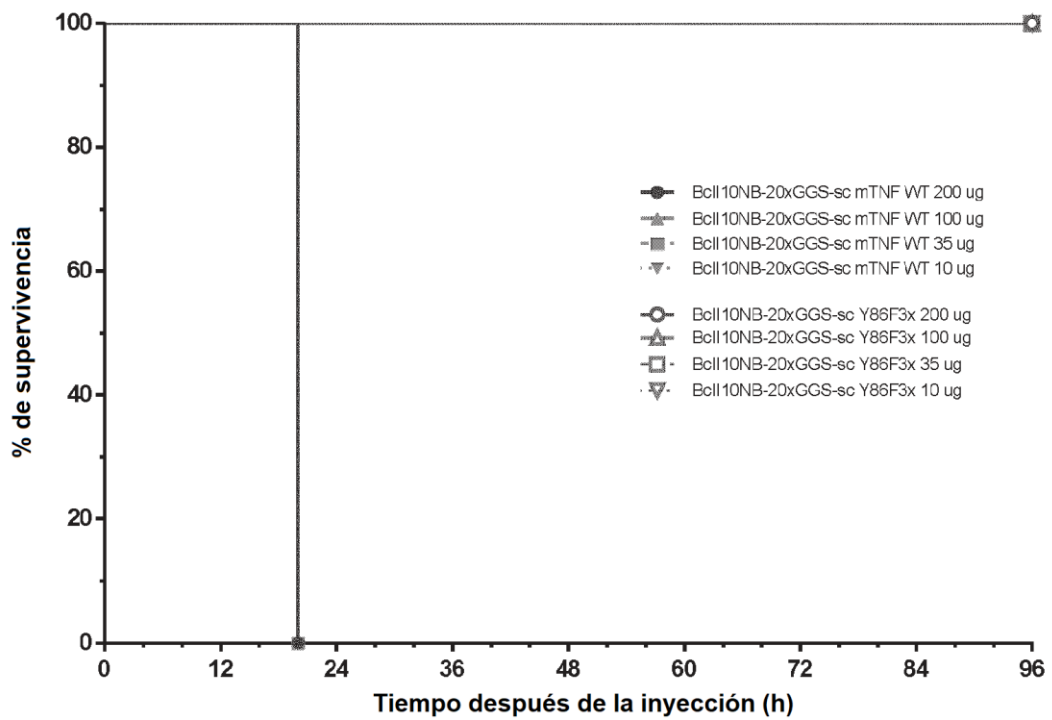
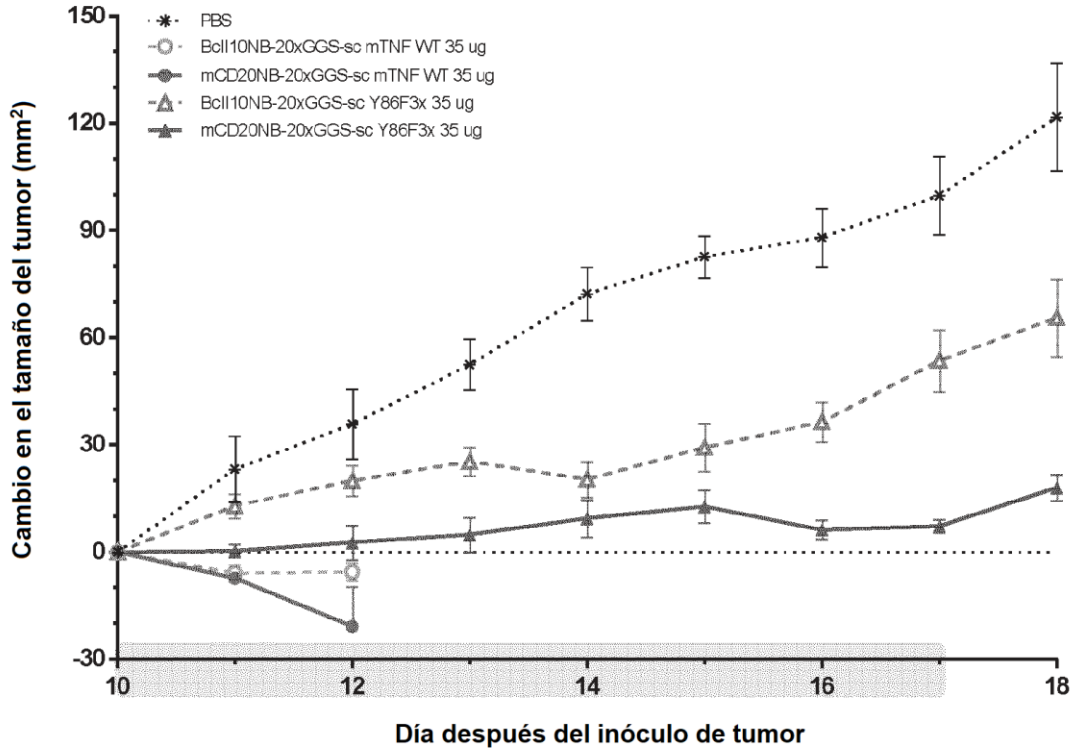


Figura 16

A



B

