

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 767**

51 Int. Cl.:
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03730172 .8**
96 Fecha de presentación: **02.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1492813**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **Nuevos agentes de unión a OX40R**

30 Prioridad:
03.04.2002 EP 02100334

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2012

73 Titular/es:
**MERCK SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:
**SOTO JARA, Claudio y
PENA ROSSI, Claudia**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 767 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

Nuevos agentes de unión a OX40R

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos péptidos capaces de modular las interacciones entre el receptor OX40 y el ligando de OX40.

Antecedentes de la invención

El sistema regulador de las células constituido por las proteínas de membrana del receptor OX40 (indicado también en la bibliografía como OX40R, OX-40, antígeno OX-40, TNFRSF4 o CD134) y del ligando OX40 (indicado también en la bibliografía como OX40L, glicoproteína gp34, ACT-4-L, TNFSF4, ligando CD134 o CD134L) tiene un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes, así como en la formación de tejido linfoide secundario, al igual que otras proteínas que pertenecen a las superfamilias de ligando/receptor del factor de necrosis tumoral (Gravesstein L y Borst J, 1998; Weinberg A, 2002). Muchas evidencias de estas actividades han sido proporcionadas por observaciones clínicas y por modelos animales, por ejemplo, mediante experimentos que se dirigen hacia un gen (Chen A y col., 1999; Kopf M y col., 1999; Murata K y col., 2000).

El receptor OX40 (OX40R, a partir de ahora) es un antígeno de la superficie celular, miembro de la familia de TNFR, expresado de forma transitoria después del acoplamiento del receptor de linfocitos T (TCR) y que actúa como un receptor coestimulador. Se considera un marcador muy específico de la activación de CD4⁺ o CD8⁺ para los linfocitos T, el cual se hiperexpresa frecuentemente en sitios de inflamación asociados a patologías inmunológicas, tal como en la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide, así como en linfocitos de infiltración tumoral y en la sangre periférica de modelos animales de la enfermedad de injerto contra hospedador.

El ligando OX40 (OX40L, a partir de ahora) es una proteína transmembranal, identificada originalmente como una proteína estimulada por la infección con virus 1 linfotrópico de linfocitos T humanos y la activación de CD40 (Miura S y col., 1991), tiene una estructura similar a TNF y es capaz de formar trímeros unidos a la célula o secretados. Está presente en linfocitos B y T activados, presentadores de antígeno, así como en células dendríticas, células del endotelio vascular y otros tejidos no hematopoyéticos (por ejemplo el corazón, el músculo esquelético y el páncreas).

OX40L interacciona con OX40R como un homotrímero con una alta afinidad (Kd = 0,2-0,4 nM), y se han analizado varios ensayos de la unión, sobre este sistema (Taylor L y col., 2002; Taylor L y Schwartz H, 2001; Al-Shamkhani A y col., 1997). Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado la estructura tridimensional, ni se han realizado estudios detallados de la estructura y la actividad, con el fin de proporcionar más detalles moleculares sobre el mecanismo de la interacción de OX40L-OX40R.

La interacción entre OX40L y OX40R tiene un efecto coestimulador para los linfocitos T efectores que expresan OX40R, dando lugar a una respuesta celular más vigorosa debido al aumento de la producción de citocinas a través de los linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2) y a un incremento de la supervivencia de las linfocitos T de memoria, a través de la inhibición de la muerte celular inducida por activación. Evidencias que lo confirman también se obtuvieron en ratones transgénicos que carecen de un gen funcional de OX40L y en modelos animales de autoinmunidad, en donde se mostró que el bloqueo de la interacción OX40R-OX40L o el agotamiento de los linfocitos T positivos para OX40R, reduce los signos clínicos de autoinmunidad.

Por otra parte, OX40L induce, después de unirse a OX40R, la expresión de varios genes, incluyendo las quimiocinas C-C RANTES, lo que confirma los resultados obtenidos en modelos de endotelio, en donde el sistema OX40R-OX40L aparece involucrado en el control de la extravasación activada de linfocitos T (Kotani A y col., 2002).

En conjunto, estos datos de la expresión y funcionales plantean la posibilidad de que las vías de transducción de señales reguladas por las interacciones de OX40L-OX40R, pueden ayudar a prolongar las respuestas proliferativas específicas de antígeno, o influir de otro modo en la persistencia, la diferenciación o la reactivación de poblaciones de linfocitos T efectores/de memoria.

El interés en el sistema OX40R-OX40L se relaciona con el hecho de que, aunque los mecanismos de señalización intracelulares aún no se han entendido completamente, el perfil de expresión de OX40R vuelve a esta proteína un objetivo peculiar para las enfermedades mediadas por linfocitos T CD4⁺ en el ámbito clínico, por ejemplo en la esclerosis múltiple, en donde es necesario eliminar los linfocitos T autorreactivos. La hipótesis es que los productos que modulan la actividad de OX40R puede que no tengan los efectos secundarios graves de terapias inmunosupresoras convencionales para enfermedades autoinmunes y el rechazo de trasplantes, que se dirigen a todos los linfocitos T.

El potencial terapéutico de la modulación de la interacción entre OX40L y OX40R fue reconocido por los resultados generados *in vivo*, obtenidos con inmunotoxinas dirigidas contra OX40L (Weinberg A y col., 1996), anticuerpos anti-OX40R (Bansal-Pakala P y col., 2001), anticuerpos anti-OX40L (Stuber E y Strober W, 1996; Yoshioka Y y col. 2000; Tsukada N y col., 2000), y las proteínas de fusión OX40L-Ig (Higgins LM y col., 1999; Weinberg A y col., 1999). Estos compuestos están pensados para ser antagonistas de la interacción entre OX40L-OX40R (para evitar la acumu-

lación de linfocitos T CD4⁺ activados, en los sitios de inflamación) o para activar OX40R (como en algunos otros estados patológicos, como el cáncer).

Diversos agentes de unión a OX40R, ya sean agonistas o antagonistas de OX40R, han sido descritos en la técnica anterior por sus efectos positivos sobre la inmunización y el tratamiento del cáncer (documentos de patentes WO 95/21915; WO 95/21251; EP 978287; WO 99/42585; WO 02/66044; EE.UU. 6312700). Sin embargo, sólo moléculas de gran tamaño, tales como el dominio extracelular completo de OX40L o anticuerpos, se describen en realidad por ser agentes de unión a OX40R eficaces. Esto se debe también al hecho de que no se han realizado estudios serios sobre la estructura-actividad, para caracterizar esta interacción, ni se puede deducir una información fiable a partir del análisis de otras estructuras proteicas de TNF/TNFR (Bodmer JL y col., 2002).

Desde que se conoce que los agentes de unión a OX40R han mostrado ser útiles como agentes terapéuticos y de diagnóstico, sería deseable identificar compuestos que, manteniendo las propiedades de unión y de competencia con OX40L de las moléculas grandes antes mencionadas, sean más fáciles de generar y formular como péptidos u otras moléculas pequeñas.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que péptidos específicos obtenidos a partir del dominio extracelular de OX40L, se pueden utilizar como agentes de unión a OX40R. Más específicamente, se ha encontrado que un péptido correspondiente a los aminoácidos 94-124 de OX40L humano, así como fragmentos de este péptido que comprenden los aminoácidos 107-116 de OX40L humano, interaccionan con OX40R humano con alta afinidad, tal y como se muestra con dos tecnologías de escrutinio diferentes y fiables. Tales péptidos, las proteínas heterólogas que comprenden sus secuencias, así como péptidos y otras moléculas diseñadas basándose en sus secuencias, se pueden utilizar como agentes de unión a OX40R que compiten con OX40L natural para diferentes usos terapéuticos. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Descripción de las Figuras

Figura 1: Diseño experimental del ensayo AlphaScreen[®] desarrollado inicialmente para demostrar la viabilidad de este enfoque para el estudio de la interacción entre OX40L-OX40R.

Figura 2: Unión dependiente de la dosis de OX40L-CD8 a OX40R-IgG₁, tal y como se detecta empleando el ensayo AlphaScreen[®]. (A) Concentraciones en aumento de OX40L-CD8 se incubaron con OX40R-IgG₁, a una concentración de 5 nM (○) o 10 nM (●) durante 30 minutos. A continuación se añadió el anticuerpo anti-CD8 biotinilado (10 nM) y 30 minutos más tarde, se añadieron perlas donantes de estreptavidina (20 mg/ml) y aceptoras de proteína A (20 mg/ml). Una hora después de estas incorporaciones, se hizo un recuento de la placa con un lector Fusion[®]. Se detectó solo una señal muy débil en ausencia de OX40R-IgG₁ (■). (B) Efecto de una concentración creciente de OX40R-IgG₁ sobre la relación señal/ruido de fondo (S/R). La relación S/R se calculó dividiendo los recuentos obtenidos en presencia de OX40L-CD8 (100 nM) por los recuentos del ruido de fondo (en ausencia de OX40L-CD8). Los datos se expresan como la media ± SEM (error estándar de la media) y todos los experimentos se llevaron a cabo 3 veces por triplicado.

Figura 3: Determinación de la K_D de OX40L-CD8 para OX40R-IgG₁. OX40R-IgG₁ (10 nM) se incubó en presencia de concentraciones crecientes de OX40L-CD8. La unión específica (□) se calculó como la diferencia entre el total de unión (■) y la unión no específica (●) determinada en presencia de suramina (1 mM). Los datos se expresan como la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.

Figura 4: Competencia por la unión a OX40L-CD8 de OX40L y suramina. OX40-IgG (10 nM), OX40L-CD8 (40 nM) y concentraciones crecientes de OX40L soluble (●) o suramina (○), se incubaron durante 30 minutos antes de la adición de anticuerpo anti-CD8 biotinilado (10 nM). Treinta minutos después se añadieron las perlas donantes de estreptavidina y aceptoras de proteína A. El gráfico representa el porcentaje de inhibición de la señal máxima de AlphaScreen[®] (obtenida en ausencia de cualquier inhibidor). Los datos se expresan como la media ± SEM de 3 experimentos realizados por triplicado.

Figura 5: Unión de fragmentos de OX40L a OX40R-IgG₁. (A) Secuencia de OX40L humano (SWISSPROT nº de cuenta P23510), con la indicación de la posición de los dominios de la proteína principal (en la parte superior de la secuencia), junto con las secuencias correspondientes a los péptidos sometidos a ensayo con el ensayo de competencia basado en AlphaScreen[®], o los péptidos obtenidos a partir de OX40L de ratón, P-OX-1 y P-OX-2 (en la parte inferior de la secuencia; los aminoácidos que no son idénticos están indicados). (B) Inhibición de la unión de OX40R-IgG₁ a OX40L-CD8 mediante los péptidos P4, P5 y un testigo sin ningún péptido.

Figura 6: Unión de los péptidos obtenidos a partir de P5, a OX40R-IgG₁. (A) Secuencia del péptido P5, alineada con el péptido obtenido a partir de OX40L de ratón, P-OX-1 (Stuber E y Strober W, 1996); "§" indica una sustitución no conservadora y "." indica sustituciones conservadoras, tal y como se indica en la Tabla I) y con la secuencia de los péptidos obtenidos a partir de P5 sometidos a ensayo con el ensayo de competencia basado en Alphascreen[®]. El péptido P5-1a es la secuencia encuadrada en P5-1. (B) Inhibición de la unión de OX40R-IgG₁ a OX40L-CD8 a través de péptido P5-1 en el ensayo de competencia basado en Alphascreen[®], en comparación con el efecto proporcionado

por otros fragmentos del péptido P5.

Figura 7: Interacción de OX40R-IgG₁ con péptidos P5 (A) y P5-1 (B), medida mediante el uso de espectroscopía de extinción de la fluorescencia. El análisis de la regresión no lineal de los cambios de la fluorescencia de OX40R-IgG₁, revela una unión saturable, con la constante de disociación para el complejo OX40R-IgG₁-péptido indicada como el valor K_d para los dos péptidos.

Descripción detallada de la invención

En vista de las evidencias descritas en la técnica anterior, no hay ninguna indicación de que una secuencia específica de péptidos en el dominio extracelular de OX40L pudiera ser útil como agente de unión a OX40R para inhibir la interacción entre OX40R-OX40L.

A través del escrutinio de una serie de péptidos obtenidos a partir del dominio extracelular de OX40L, se identificaron sorprendentemente secuencias cortas de aminoácidos que interactúan con OX40R con gran afinidad y compiten con OX40L, y se caracterizaron como inhibidores de la interacción entre OX40R-OX40L.

En consecuencia, la presente invención describe un nuevo agente de unión a OX40R que es la secuencia del péptido correspondiente a los aminoácidos 94-124 (P5; SEQ ID NO: 6) de OX40L humano.

La presente invención describe agentes de unión a OX40R que son secuencias de péptidos de OX40L humano que consisten en una secuencia peptídica correspondiente a los aminoácidos 94-124 (péptido P5; SEQ ID NO: 6) en donde uno o varios aminoácidos han sido eliminados, y que comprenden los aminoácidos 107-111 (péptido P5-1a; SEQ ID NO: 13) de OX40L humano. En particular, estos péptidos tienen entre 5 y 10 aminoácidos y, más en particular, tienen la secuencia correspondiente a los aminoácidos 107-116 (péptido P5-1; SEQ ID NO: 8) o 107-111 (péptido P5-1a; SEQ ID NO: 13) de OX40L humano.

Se ha mostrado (o deducido) que el péptido P5, así como los fragmentos de P5 definidos anteriormente, se unen a la proteína OX40R humana en los ejemplos de la presente solicitud de patente. Esta actividad de unión se ha sometido a ensayos *in vitro*, empleando formas recombinantes de OX40L y OX40R, y se ha demostrado que las secuencias peptídicas reivindicadas pueden competir efectivamente con OX40L. Por lo tanto, en la presente invención se proporcionan nuevos medios para inhibir interacciones indeseables entre OX40R-OX40L y la señalización celular asociada a enfermedades humanas.

Fragmentos del dominio extracelular de ACT-4-L humano, que es un nombre alternativo de OX40L, se dieron a conocer como potenciales agentes de unión a OX40R que están asociados a dominios funcionales o estructurales en el dominio extracelular de OX40L (documento WO 95/21915). Sin embargo, no se han presentado pruebas en la bibliografía sobre dominios funcionales o estructurales de OX40L humano, que se correspondan al péptido P5, o a sus fragmentos, tales como los péptidos P5-1 y P-5-1a, que tengan actividad competidora frente a OX40L. Péptidos diseñados basándose en la secuencia del dominio extracelular de OX40L de ratón, se han utilizado como antígenos para generar anticuerpos anti-OX40L (Stuber E y Strober W, 1996), pero, también en vista de la conservación limitada de OX40L humano y de ratón en esta región (figs. 5A y 6A), no se puede deducir que cualquiera de estas secuencias pueda competir eficazmente con OX40L humano para la unión a OX40R humano.

La presente solicitud de patente muestra con éxito que, incluso si no se puede predecir inequívocamente el dominio funcional o estructural, mediante la comparación con otras parejas de ligando-receptor, pertenecientes a las mismas familias de proteínas (Bodmer JL y col., 2002), o mediante el uso de algoritmos bien conocidos para la predicción de la estructura proteica, tales como PREDATOR, PHD o HNN (asequible, por ejemplo, en http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html), tales péptidos son sorprendentemente eficaces como agentes de unión a OX40R, capaces de inhibir la interacción entre OX40R-OX40L.

El término "péptido" se aplica normalmente a una cadena polipeptídica que contiene de 4 a 40 o más aminoácidos contiguos, por lo general 4 a 20 aminoácidos contiguos. Tales péptidos se pueden generar por métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo la escisión proteolítica parcial de una proteína más grande, la síntesis química o la ingeniería genética.

El término "activo", define el compuesto que muestra las propiedades de unión a OX40R, mostradas para los péptidos de la presente invención.

Las propiedades del péptido P5 y de sus fragmentos específicos, ejemplificados por los péptidos P5-1 y P5-1a, se pueden mantener o incluso potenciar, en sus mutantes activos. Esta categoría de moléculas incluye análogos de estas secuencias en donde uno o varios residuos de aminoácidos han sido sustituidos de manera conservadora, siempre que muestren la misma actividad biológica caracterizada en la presente invención, a niveles comparables o incluso superiores, según lo determinado por medios conocidos en la técnica o descritos en los Ejemplos siguientes.

De acuerdo con la presente invención, los cambios preferidos en estos mutantes activos son conocidos comúnmente como sustituciones "conservadoras" o "seguras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son las que tienen aminoácidos que tienen propiedades químicas suficientemente similares, para preservar la estructura y la fun-

ción biológica de la molécula. Está claro que las inserciones y las deleciones de aminoácidos también se pueden hacer en las secuencias definidas anteriormente, sin alterar su función, sobre todo si las inserciones o deleciones solo implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de diez y, preferentemente, menos de tres, y sin eliminar o cambiar de posición los aminoácidos que son esenciales para la conformación funcional de una proteína o un péptido.

La bibliografía proporciona muchos modelos en los que la selección de sustituciones conservadoras de aminoácidos se puede realizar sobre la base de estadísticas y estudios físico-químicos de la secuencia y/o de la estructura de la proteína natural (Rogov SI y Nekrasov AN, 2001). Experimentos de diseño de proteínas han mostrado que el uso de subgrupos específicos de aminoácidos puede producir proteínas plegables y activas, lo que ayuda en la clasificación de las sustituciones de aminoácidos "sinónimos", que se pueden acomodar más fácilmente en la estructura de la proteína (Murphy LR y col., 2000). Los grupos de aminoácidos sinónimos y de los grupos sinónimos más preferidos, son los definidos en la Tabla I.

Estos compuestos alternativos tienen la intención de comprender moléculas con cambios en las secuencias seleccionadas de OX40L humano que no afectan a las características básicas descritas en la presente solicitud de patente, especialmente en la medida en que implican su capacidad de unión y de inhibición de OX40R. Compuestos similares pueden ser el resultado de la técnica convencional de mutagénesis dirigida al sitio del ADN codificante, de tecnologías combinatorias a nivel de secuencia de ADN codificante (tal como el barajado de ADN, la presentación/selección de fagos) o de aminoácidos, de estudios de diseño asistido por ordenador, o de cualquier otra técnica conocida adecuada para ello, que proporciona un conjunto finito de péptidos mutados que se corresponden sustancialmente, los cuales se pueden obtener y examinar de forma rutinaria por un experto en la materia con las enseñanzas presentadas en el estado de la técnica y en los Ejemplos de la presente solicitud de patente.

La presente solicitud de patente describe nuevos agentes de unión de OX40 que son polipéptidos o péptidos de fusión que comprenden la secuencia de aminoácidos P5, P5-1, P5-1a, o cualquiera de sus mutantes activos según la definición anterior, y una secuencia de aminoácidos que pertenece a una secuencia proteica que no sea la de OX40L humano. Esta última secuencia heteróloga debe proporcionar propiedades adicionales sin alterar considerablemente la actividad de unión a OX40R. Ejemplos de tales propiedades adicionales son un procedimiento de purificación más sencillo, una semivida más larga en los fluidos corporales o en una localización extracelular. Esta última característica es de particular importancia para definir un grupo específico de proteínas de fusión o quiméricas incluidas en la definición anterior, ya que permite que los péptidos caracterizados como agentes de unión a OX40R en esta solicitud de patente, estén localizados en el espacio en donde no sólo se facilita el aislamiento y la purificación de estos péptidos, sino que también es donde interaccionan de forma natural OX40L y OX40R.

Secuencias proteicas adicionales que pueden estar comprendidas en proteínas de fusión, que incluyen el agente de unión a OX40R de la invención, se pueden elegir entre proteínas que se unen a la membrana, dominios extracelulares de proteínas unidas a la membrana, la región constante de inmunoglobulinas, dominios de multimerización, proteínas extracelulares, proteínas que contienen el péptido señal, proteínas que contienen la señal de exportación.

La elección de una o varias de estas secuencias para fusionarla con el agente de unión a OX40 depende del uso específico de dicho agente. Como procedimiento general, estas proteínas de fusión pueden ser producidas mediante la generación de segmentos de ácido nucleico que la codifican, utilizando técnicas comunes de ingeniería genética y la clonación en un vector replicable de origen vírico o plasmídico que se utilizan para modificar una célula hospedadora procariota o eucariota, usando vectores episomales o integrados de forma no homóloga, así como tecnologías basadas en la transformación, la infección o la transfección. Estos vectores deben permitir la expresión de la proteína de fusión, incluyendo el agente de unión a OX40R en la célula hospedadora procariota o eucariota, bajo el control de sus propias secuencias reguladoras del inicio/final de la transcripción, que se escogen para que estén constitutivamente activas o sean inducibles en dicha célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida en estas células se puede aislar a continuación para proporcionar una línea celular estable. En particular, siempre que las células modificadas expresen los agentes de unión a OX40R de la invención, se emplean o se administran directamente, las células preferidas son células humanas que expresan normalmente OX40L, en particular, linfocitos B humanos.

Cuando la secuencia proteica adicional, como en el caso de las proteínas que contienen la secuencia extracelular, la señal de exportación o el péptido señal, permite que se secrete el dominio de unión a OX40R, en el espacio extracelular, el agente puede ser más fácil de recoger y purificar a partir de células cultivadas, en vista a un procesamiento posterior o, alternativamente, las células se pueden utilizar o administrar directamente.

Cuando la proteína adicional, tal y como en el caso de la secuencia de proteínas unidas a la membrana, permite la inmovilización del agente de unión a OX40R sobre la superficie de la célula, el agente se puede recoger y purificar menos fácilmente a partir de las células cultivadas, en vista a un procesamiento adicional, pero las células se pueden utilizar o administrar directamente proporcionando el agente en una forma que se corresponde a la de OX40L natural, mejorando posiblemente sus propiedades.

Por último, puesto que la interacción entre OX40L-OX40R se sabe que implica la multimerización de las proteínas, en particular la trimerización (Al Shamkhani A y col., 1997); por lo tanto, la proteína de fusión también puede incluir la secuencia que permite la multimerización de la proteína resultante, tal como las regiones constantes de la immuno-

5 globulina, los dominios extracelulares de proteínas unidas a la membrana o los dominios de trimerización que se conoce en la técnica que están presentes en proteínas similares a TNFR (documento WO 00/39295) o en otras proteínas (documentos WO 01/49866, WO 99/10510, WO 01/98507). Otras secuencias proteicas útiles que se pueden incluir, son las que ofrecen medios de purificación mediante cromatografía de afinidad (Constans A, 2002; Lowe CR y col., 2001).

Los polipéptidos y los péptidos de la presente invención pueden estar en formas alternativas que se pueden preferir según el método de uso y/o la producción deseada, por ejemplo, como fracciones activas o como sales.

10 El término "fracción" se refiere a cualquier fragmento de la cadena polipeptídica del propio compuesto, aislado o en combinación con moléculas o residuos relacionados ligados a ella, por ejemplo, residuos de azúcares o fosfatos, o agregados del polipéptido o del péptido original. Dichas moléculas pueden resultar también de otras modificaciones que no alteran normalmente la secuencia principal, por ejemplo, la derivatización química *in vivo* o *in vitro* de péptidos (acetilación o carboxilación), las realizadas mediante la modificación del patrón de fosforilación (introducción de residuos de fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina) o de glicosilación (mediante la exposición del péptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo, enzimas de mamíferos para la glicosilación o la deglicosilación) de un péptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas posteriores del procesamiento. Por ejemplo, P5 y P5-1 contienen un sitio de glicosilación potencial (aminoácidos 114-116 en OX40L humano) y este se puede modificar en consecuencia durante la expresión recombinante en la célula hospedadora o durante la síntesis química.

Los "precursores" son compuestos que se pueden convertir en los compuestos de la presente invención mediante procesamiento metabólico y enzimático, antes o después de la administración a las células o al organismo.

20 El término "sales" en esta memoria, se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de los péptidos, polipéptidos o análogos de los mismos, de la presente invención. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica, e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Cualquiera de estas sales debe tener una actividad sustancialmente similar a los péptidos y polipéptidos de la invención o a sus análogos.

30 El término "derivados" tal y como se usa en esta memoria, se refiere a derivados que se pueden preparar a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos de aminoácidos o en los grupos N o C-terminales, de acuerdo con métodos conocidos. Dichos derivados incluyen, por ejemplo, ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y los derivados de N-acilo de grupos amino libres o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo, tales como por ejemplo grupos alcanóilo o aroílo.

35 También se describen en esta memoria nuevos agentes de unión a OX40R que constan de péptidos miméticos (también llamados peptidomiméticos) de los péptidos P5, sus fragmentos específicos ejemplificados por los péptidos P5-1 y P-5-1a, los mutantes activos correspondientes tal y como se definieron anteriormente, en los que el naturaleza del péptido o del polipéptido se ha modificado químicamente a nivel de cadenas laterales de aminoácidos, quiralidad de aminoácidos y/o esqueleto del péptido. Estas alteraciones están destinadas a proporcionar agentes de unión a OX40R que tengan propiedades terapéuticas, de diagnóstico y/o farmacocinéticas similares (si no mejoradas).

40 Por ejemplo, si es un problema que el péptido sea susceptible a la escisión con peptidasas, después de la inyección en el sujeto, la sustitución de un enlace peptídico especialmente sensible por un péptido mimético no escindible, puede proporcionar un péptido más estable y, por lo tanto, más útil como agente terapéutico. Del mismo modo, la sustitución de un residuo de L-aminoácido es una forma convencional de hacer que el péptido sea menos sensible a la proteólisis, y finalmente más similar a compuestos orgánicos distintos de los péptidos. También son útiles los grupos de bloqueo amino-terminales, tales como t-butiloxicarbonilo, acetilo, teílo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelaílo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, metoxiazelaílo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4-dinitrofenilo. En la técnica se conocen muchas otras modificaciones que proporcionan una mayor potencia, una actividad prolongada, facilidad de purificación y/o una semivida incrementada (documento WO 02/10195; Villain M y col., 2001). Una alternativa preferida, los grupos "sinónimos" para aminoácidos incluidos en péptidomiméticos, son los definidos en la Tabla II.

50 Las técnicas para la síntesis y el desarrollo de péptidomiméticos, así como miméticos no peptídicos, son bien conocidas en la técnica (Sawyer TK, 1997; Hruby VJ y Balse PM, 2000; Golebiowski A y col. 2001; Kim HO y Kahn M, 2000). En la bibliografía también se describen diversas metodologías para la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas, utilizando sistemas de traducción tanto *in vitro* como *in vivo*, para investigar y/o mejorar la estructura y la función de las proteínas (DA Dougherty, 2000).

55 Nuevos agentes de unión a OX40R pueden ser péptidos identificados mediante métodos de diseño de fármacos asistido por ordenador, que emplean la estructura y/o la secuencia de los péptidos P5, sus fragmentos específicos ejemplificados por los péptidos P5-1 y P5-1a, o los mutantes activos correspondientes, tal y como se han definido anteriormente. Las estructuras tridimensionales de OX40L y OX40R, como moléculas separadas o como un comple-

- jo, no se han resuelto todavía, pero la información prevista en esta solicitud de patente, una vez que esta información esté disponible, permitirá estudiar la interacción entre OX40L y OX40R con una mayor eficacia, empleando estas y otras tecnologías de simulación (Cochran A y col., 2001; Kraemer-Pecore CM y col., 2001). Tales análisis asistidos por ordenador se pueden explotar para desarrollar fármacos peptídicos o no péptidomiméticos mejorados, en forma de moléculas o péptidos orgánicos sintéticos (por ejemplo, que tienen entre 4 y 20 aminoácidos). Una vez que estos compuestos han sido escrutados y se ha confirmado que son capaces de unirse a OX40R y competir con OX40L, entonces se determinará su utilidad empleando modelos celulares o animales.
- Conjugados o complejos útiles de los agentes de unión a OX40R de la presente invención, se pueden generar empleando moléculas y métodos conocidos en la técnica (tal y como se muestra para los anticuerpos anti-OX40R en el documento WO 95/21251) para mejorar su detección (con marcadores radiactivos o fluorescentes, biotina), su eficacia terapéutica (con agentes citotóxicos) y/o su entrega, con polietilenglicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Pillai O y Panchagnula R, 2001).
- Los péptidos P5, sus fragmentos específicos ejemplificado por los péptidos P5-1 y P5-1a, los mutantes activos correspondientes y las proteínas de fusión que los contienen, se pueden preparar por síntesis química conocida o por técnicas basadas en ADN recombinante.
- Otro objeto de la invención son los ácidos nucleicos que codifican los agentes de unión a OX40R de la invención, incluyendo secuencias de nucleótidos sustancialmente iguales.
- Las "secuencias de nucleótidos sustancialmente iguales" incluyen todas las demás secuencias de ácidos nucleicos que, en virtud de la degeneración del código genético, también codifican las secuencias de aminoácido dadas.
- La invención también incluye vectores de origen vírico o plasmídico que permiten la expresión del ácido nucleico que codifica los agentes de unión a OX40R de la invención y células hospedadoras procariontas o eucariotas, transformadas con tales vectores. Se puede aislar una línea celular estable, enriquecida sustancialmente en estas células transformadas, también basándose en las características de la expresión del agente de unión a OX40R, que se puede secretar o expresar en la superficie de la membrana, por ejemplo, en linfocitos B humanos.
- Los agentes de unión a OX40R de la invención se pueden producir por el método en el que las células hospedadoras descritas anteriormente, se cultivan en un medio de cultivo apropiado, y se recoge el agente de unión a OX40R.
- La secuencia de ADN que codifica las proteínas de la invención se puede insertar y se liga en un vector adecuado. Una vez formado, el vector de expresión se introduce en una célula hospedadora adecuada, que a su vez expresa el(los) vector(es) para producir la proteína deseada.
- La expresión de cualquiera de las proteínas recombinantes de la invención, tal y como se mencionan en esta memoria, se puede llevar a cabo en células eucariotas (p. ej., levaduras, células de insecto o de mamífero) o en células procariontas, utilizando los vectores de expresión apropiados. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica.
- Por ejemplo, las moléculas de ADN que codifican las proteínas obtenidas a través de cualquiera de los métodos anteriores, se insertan en vectores de expresión construidos de forma adecuada, mediante métodos bien conocidos en la técnica. El ADN bicatenario se liga a vectores plasmídicos mediante la formación de una cola de homopolímeros o por ligación con restricción que implica el uso de enlazadores de ADN sintético o de técnicas de ligación con extremos romos: las ligasas de ADN se utilizan para unir moléculas de ADN, y las uniones no deseadas se evitan mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina.
- Con el fin de ser capaz de expresar la proteína deseada, un vector de expresión debe incluir también secuencias de nucleótidos específicas que contienen información reguladora de la transcripción y la traducción, ligadas con el ADN que codifica la proteína deseada, de tal forma que permita la expresión de los genes y la producción de la proteína. En primer lugar, a fin de que el gen se transcriba, debe estar precedido por un promotor reconocible por la polimerasa de ARN, a la que se une la polimerasa y se inicia de este modo el proceso de transcripción. Hay una gran variedad de promotores de este tipo en uso, que funcionan con diferentes eficiencias (promotores fuertes y débiles).
- Para los hospedadores eucariotas, se pueden emplear diferentes secuencias reguladoras de la transcripción y traducción, en función de la naturaleza del hospedador. Se pueden obtener a partir de fuentes víricas, tales como adenovirus, virus del papiloma bovino, virus simio o similares, en donde las señales reguladoras están asociadas con un gen particular que tiene un alto nivel de expresión. Ejemplos son el promotor TK del virus herpes, el promotor temprano de SV40, el promotor del gen gal4 de la levadura, etc. Las señales reguladoras del inicio de la transcripción se pueden seleccionar de modo que permitan la represión y la activación, por lo que se puede modular la expresión de los genes.
- La molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la invención se inserta en el(los) vector(es), que tiene ligadas funcionalmente las señales reguladoras de la transcripción y la traducción, que es capaz de integrar las secuencias del gen deseado en la célula hospedadora.

Las células que han sido transformadas de forma estable con el ADN introducido, se pueden seleccionar también introduciendo uno o varios marcadores que permiten la selección de las células hospedadoras que contienen el vector de expresión. El marcador también se puede proporcionar fototrofia a un hospedador auxotrófico, la resistencia a biocidas, por ejemplo, antibióticos, o metales pesados tales como el cobre o similares. El gen marcador seleccionable puede estar ligado directamente a las secuencias de ADN del gen que se va a expresar, o introducido en la misma célula mediante cotransfección.

Elementos adicionales de los vectores también pueden ser útiles para obtener una producción óptima de proteínas de la invención, en particular para la selección de una célula en particular que contiene un vector plasmídico o vírico: la facilidad con la que las células receptoras, que contienen el vector pueden ser reconocidas y seleccionadas por las células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desea en un hospedador en particular; y, si es deseable que sea capaz de "lanzar" el vector entre las células hospedadoras de diferentes especies.

Una vez que se ha preparado para la expresión el(los) vector(es) o la secuencia de ADN que contiene la(s) estructura(s) artificial(es), la(s) estructura(s) artificial(es) de ADN se pueden introducir en una célula hospedadora apropiada por cualquiera entre una variedad de medios adecuados: transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, etc.

Las células hospedadoras pueden ser procariotas o eucariotas. Se prefieren los hospedadores eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, tales como células de ser humano, mono, ratón y de ovario de hámster chino (CHO), ya que proporcionan modificaciones post-traduccionales a las moléculas de proteínas, incluyendo un plegamiento correcto o una glicosilación en los sitios correctos. También las células de levadura pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de péptidos, que incluyen la glicosilación. Existe una serie de estrategias con ADN recombinante que utilizan secuencias de promotores fuertes y un número elevado de copias de plásmidos que se pueden utilizar para la producción de las proteínas deseadas en la levadura. La levadura reconoce las secuencias líderes en productos génicos clonados de mamíferos y secreta péptidos que son portadores de las secuencias líderes (es decir, pre-péptidos).

Después de la introducción del (de los) vector(es), las células hospedadoras se cultivan en un medio selectivo, que selecciona el crecimiento de células que contienen el vector. La expresión de la(s) secuencia(s) de los genes clonados da como resultado la producción de las proteínas deseadas.

Estos objetos de la invención se pueden lograr mediante la combinación de la información proporcionada por la presente solicitud de patente, sobre los agentes recombinantes de unión a OX40R, con el conocimiento de técnicas comunes de la biología molecular. Muchas revisiones (Makrides SC, 1999) y libros que ofrecen enseñanzas sobre la manera de clonar y producir proteínas recombinantes empleando vectores y células hospedadoras procariotas o eucariotas, como algunos de los títulos en la serie "A Practical Approach", publicado por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Ejemplos de tecnologías de síntesis química, que son más indicadas para la producción del agente de unión a la OX40R de la invención, cuando se encuentra en forma de péptido, son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. A modo de síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido que corresponde al extremo C-terminal del péptido que se va a sintetizar, está unido a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y a través de una repetición alternativa de las reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y los grupos funcionales de la cadena lateral protegidos con grupos protectores adecuados, se condensan uno a uno, desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal, y otra en donde los aminoácidos unidos a la resina o al grupo protector de los grupos amino de los péptidos, se liberan, extendiéndose de esta manera la cadena peptídica.

Los métodos de síntesis en fase sólida están clasificados en gran parte por el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado. Los grupos protectores utilizados normalmente, incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), MbH (4,4'-dimetoxidibenzhidrido), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzosulfonilo), Trt (tritilo), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl2-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO2 (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino, y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo. Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se retira por corte del soporte sólido. Esta reacción de corte del péptido se puede realizar con fluoruro de hidrógeno o con ácido trifluorometano sulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.

Los agentes de unión a OX40R obtenidos mediante ADN recombinante o tecnologías de síntesis química, se someten finalmente a una o a varias etapas de purificación. La purificación puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos para este fin, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similar. Por ejemplo, se puede utilizar HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). La elución se puede realizar usando un disolvente a base de agua-acetonitrilo, utilizado comúnmente para la purificación de proteínas. La invención incluye preparaciones purificadas de los agentes de unión a OX40R de la invención. Las preparaciones purificadas, tal y como se utilizan en esta memoria, se refieren a las preparaciones que

son por lo menos el 1%, preferiblemente al menos el 5%, en peso seco de los compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención descritos anteriormente (proteínas, péptidos, compuestos orgánicos) pueden ser un medicamento, siendo antagonistas de OX40L humano, y basándose en la bibliografía sobre la actividad de OX40L, un inductor de la expresión de RANTES (Kotani A. y col., 2002), y antagonistas de RANTES humano.

- 5 Los agentes de unión a OX40R de la invención se pueden utilizar como ingrediente activo en composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamación o infección.

10 El agente de unión a OX40R de la invención, una vez unido a OX40R, actúa como antagonista de OX40L, el potencial terapéutico de esta molécula está en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y esclerosis múltiple), inflamaciones o infecciones, en donde es beneficiosa una inhibición de la activación de los linfocitos T CD4⁺. Este último efecto también se puede utilizar para reducir la población de linfocitos T CD4⁺ que expresan OX40R.

15 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con los linfocitos T CD4⁺, que comprenden uno de los agentes de unión a OX40R de la invención como ingrediente activo. Estas composiciones farmacéuticas se pueden formular en combinación con vehículos, excipientes, estabilizadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dependiendo de las propiedades del agente, la composición farmacéutica puede ser útil para enfermedades relacionadas con linfocitos T CD4⁺, tales como enfermedades autoinmunes, inflamaciones o infecciones.

20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de unión a OX40R de la presente invención incluyen todas las composiciones en las que dicho compuesto se encuentra en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, una cantidad eficaz para lograr el resultado médicamente deseable en el animal tratado. Las composiciones farmacéuticas pueden contener soportes adecuados farmacéuticamente aceptables, vehículos biológicamente compatibles adecuados para la administración a un animal (por ejemplo, solución salina fisiológica) y eventualmente comprenden agentes auxiliares (tales como excipientes, estabilizadores o diluyentes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizar farmacéuticamente.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular en cualquier forma aceptable para satisfacer las necesidades de la forma de administración. El uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración, se describen en la bibliografía (Luo B y Prestwich GD, 2001; Cleland JL y col., 2001). Modificaciones de los compuestos de la invención para mejorar la penetración a través de la barrera hematoencefálica, también son útiles. Otros métodos de transporte biomimético y de entrega racional de fármacos en el campo de la entrega transvascular de fármacos, son conocidos en la técnica (Ranney DF, 2000).

30 Cualquier modo aceptado para la administración se puede utilizar y está determinado por los expertos en la materia. Por ejemplo, la administración puede ser a través de varias vías parenterales, tales como la vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, oral o bucal. La administración parenteral puede ser por inyección en bolo o por perfusión gradual en el tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica, y se pueden preparar de acuerdo con métodos de rutina. Además, la suspensión de los compuestos activos se puede administrar como suspensiones aceitosas para inyección adecuadas. Como disolventes o vehículos lipófilos adecuados, se incluyen los aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las suspensiones acuosas para inyección que pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener agentes estabilizantes. Las composiciones farmacéuticas incluyen soluciones adecuadas para la administración mediante inyección, y contienen desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 99 por ciento, preferentemente desde aproximadamente 20 hasta 75 por ciento de principio activo junto con el excipiente. Las composiciones que se pueden administrar por vía rectal incluyen supositorios.

40 Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, del tipo de tratamiento simultáneo, si es que hubiera alguno, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosificación se ajustará al sujeto individual, tal y como lo entiende y lo puede determinar un experto en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar a través de múltiples dosis o en una sola dosis. La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar sola o junto con otros agentes terapéuticos dirigidos contra la enfermedad, o dirigidos contra otros síntomas de la enfermedad. Por lo general, una dosificación diaria de ingrediente activo está comprendida entre 0,01 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal.

55 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar al paciente por vía intravenosa en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica. Se pueden utilizar métodos convencionales para la entrega intracelular de péptidos, por ejemplo, entrega a través de lisosomas. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la materia. Las formulaciones de esta invención son útiles para la administración por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos que se estén administrando al mismo tiempo.

- 5 Los agentes de unión a OX40R de la presente invención, se pueden utilizar para detectar el dominio extracelular de la proteína OX40R, en forma ligada a la membrana o como proteína soluble. Es evidente que este uso se puede extender a la detección de linfocitos T CD4⁺ activados que expresan la proteína OX40R.

10 El método de detección basado en estos usos comprende una primera etapa en la que se pone en contacto una muestra con los agentes o las células, y una segunda etapa en la que la interacción entre el dominio extracelular de la proteína OX40R se detecta directamente (por medio de cualquier marcador asociado al agente o a la célula, tal y como se ha descrito anteriormente) o indirectamente (por medio de los efectos de esta unión sobre la proteína OX40R o la célula que expresa OX40R, por ejemplo), para indicar la presencia de estos elementos.

15 El agente o las células se pueden inmovilizar, antes o después de haberse puesto en contacto con la muestra, sobre soportes que permiten no sólo la detección sino también la purificación y/o la concentración del dominio extracelular de OX40R, unido a la membrana o a una proteína soluble o a células que expresan OX40R. Estos soportes se pueden utilizar en consecuencia en métodos para la detección, la purificación y/o la concentración del dominio extracelular de OX40R, unido a la membrana o a una proteína soluble o a células que expresan OX40R en una muestra, poniendo en contacto dicha muestra con los soportes, o con las células que expresan el agente de unión a OX40R de la presente invención. Este y los métodos de detección descritos anteriormente se pueden utilizar para diagnosticar un estado asociado con la presencia incrementada o disminuida de linfocitos T CD4⁺ o de la proteína soluble OX40R.

20 El agente de unión a OX40R de la presente invención, o las células que lo expresan, se puede administrar en métodos para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamaciones o infecciones.

25 La presente invención describe también un ensayo de escrutinio para la determinación de la naturaleza y la actividad de compuestos, según lo dispuesto en los Ejemplos de la presente solicitud de patente, que inhiben las interacciones entre OX40L y OX40R, que comprende:

a) La formación de una muestra que comprende los siguientes elementos:

- 30 i. Un elemento que constituye el agente de unión a OX40R, elegido entre los compuestos, las células y los soportes descritos en la presente invención;
- ii. Un elemento que constituye el resto de OX40R, escogido de entre una proteína que comprende el dominio extracelular de OX40R, una línea celular que expresa el dominio extracelular de OX40R en su superficie, y una línea celular que secreta el dominio extracelular de OX40R; y
- iii. El(los) compuesto(s) que se van a someter a ensayo como inhibidor(es) de la interacción entre OX40R-OX40L.

35 b) La detección, directa o indirecta, del efecto de los compuestos (iii) sobre las interacciones entre los elementos (i) e (ii).

c) La comparación del efecto detectado en (b) entre las muestras diferentes en términos de calidad y/o cantidad de los elementos de (a).

40 El soporte descrito anteriormente representa un elemento preferible, ya que esos tipos de escrutinios son más rápidos y eficaces, mediante el uso de un elemento de unión inmovilizado sobre soportes tales como placas de microtitulación de plástico o perlas.

45 La presente invención también proporciona nuevos equipos de reactivos que comprenden los agentes de unión a OX40R, células que los expresan, o soportes que los contienen, para la detección del dominio extracelular de la proteína OX40R (unida a la membrana o como proteína soluble) o linfocitos T CD4⁺ activados que permiten también el diagnóstico de un estado debido a la presencia incrementada o disminuida de linfocitos T CD4⁺ o de la proteína OX40R soluble, en una muestra obtenida a partir de un paciente.

50 Finalmente, la presente invención también proporciona un equipo de reactivos para la detección de compuestos que inhiben la interacción de un ligando proteico con una proteína asociada a la membrana, que comprende la porción extracelular de la proteína asociada a la membrana y el ligando proteico, como proteínas de fusión que tienen diferentes secuencias de marcadores.

La referencia a etapas de métodos conocidos, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales, no es de ninguna manera una admisión de que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención estén descritos, se haya informado o sugerido sobre los mismos en la técnica relevante.

Una vez entendidas las características de los métodos y los productos descritos en la presente solicitud, se puede deducir fácilmente la necesidad y el tipo de etapas adicionales mediante una revisión de la técnica anterior, así como con las siguientes figuras y ejemplos no limitantes que describen los detalles básicos y algunas aplicaciones de la invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Diseño experimental para la detección de las interacciones entre OX40L-OX40R utilizando un ensayo de competencia basado en AlphaScreen®.

Métodos

Proteínas

10 La proteína de fusión OX40R-IgG₁ humana se ha descrito anteriormente (Godfrey y col., 1994). La proteína recombinante se preparó construyendo un vector de expresión de mamífero basado en pCEP4 (Invitrogen) en el que el ADNc que codifica la porción extracelular de OX40R humano (aminoácidos 1-208 de SWISSPROT n° P43489) estaba fusionado en marco de lectura con el extremo 5' del ADNc que codifica la región constante de IgG₁ humana (región bisagra, CH2 y CH3; aminoácidos 98-330 de SWISSPROT n° P01857). La OX40R-IgG₁ recombinante se expresa como una proteína secretada debido a la secuencia señal de OX40R.

15 Las células HEK293-EBNA se transfectaron, utilizando la técnica de fosfato de calcio con la estructura artificial de expresión, que contiene un gen marcador seleccionable con higromicina. Las células se sembraron con una densidad de 2×10^5 células/ml en medio de crecimiento (DMEM/F-12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino al 10% y L-glutamina 4 mM; Sigma Chemicals). Al día siguiente, el medio fue reemplazado por DMEM/F-12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino al 2% y L-glutamina 4 mM. Una hora más tarde, las células se transfectaron y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 4 horas, luego el medio se cambió a medio de crecimiento que contenía 10% de suero fetal bovino. Dos días después de la transfección, el agente de selección (higromicina B; 300 µg/ml) se añadió al medio. Un clon que expresaba correctamente OX40R-IgG₁, se aisló entre las células seleccionadas.

25 La OX40R-IgG recombinante se purificó a partir del material sobrenadante de un cultivo celular generado a partir del clon aislado. El material sobrenadante se clarificó por centrifugación (10 minutos a 500 x g) y, posteriormente, se filtró empleando membranas de PVDF de 0,45 y 0,22 micrómetros de tamaño de poro (Millipore). En paralelo, la columna de purificación, que contenía 38 ml de resina en la que se había inmovilizado la proteína G recombinante (Pharmacia), se equilibró en tampón de carga (Tris 0,1 M, pH 7,0) empleando un sistema Bio-Logic FPLC (Biorad). Después de equilibrar con 20 volúmenes de columna (VC) de tampón de carga, la muestra se aplicó a la columna con un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó con 10 VC de tampón de carga para eliminar las proteínas no unidas específicamente a la resina. La proteína de fusión OX40R-IgG₁, inmovilizada sobre la proteína G a través del resto IgG₁, se eluyó con un gradiente escalonado empleando un tampón de elución de glicina 0,1/HCl (pH 3,0). Las fracciones resultantes se neutralizaron directamente con Tris 1 M (pH 7,6) para evitar la degradación de las proteínas en el tampón de elución ácido. Finalmente, las fracciones que contenían la proteína de fusión OX40R-IgG₁ se desalaron utilizando una columna de Sephadex G25 (Pharmacia) equilibrada en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se almacenaron en partes alícuotas a -80°C hasta el momento de utilizarlas en los ensayos.

40 Los anticuerpos biotinilados CD8 de murino-OX40L humano y CD8 anti-murino se encuentran disponibles comercialmente (Ancell), así como suramina (Sigma Chemicals). El OX40L recombinante humano soluble se preparó como una proteína de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST) en un sistema de expresión de baculovirus (Gateway®, Invitrogen) mediante la clonación de la porción extracelular de OX40L fusionada a GST en un plásmido que se utilizó después para transfectar células SF9. La expresión y la purificación se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo AlphaScreen®

45 Las perlas donantes yceptoras modificadas de AlphaScreen® se compraron (Biosignal Packard). Las proteínas de fusión OX40R-IgG₁ y OX40L-CD8 se inmovilizaron, respectivamente, sobre perlasceptoras conjugadas con proteína A y, por medio de un anticuerpo biotinilado anti-CD8, sobre perlas donantes conjugadas con estreptavidina.

50 El ensayo de la unión se realizó utilizando placas de poliestireno blanco de 384 pocillos de Costar® (Corning). Cada pocillo de una placa de 384 pocillos contenía una mezcla de reacción que tenía un volumen de 25 microlitros. Cada uno de los cinco componentes de la mezcla de reacción (OX40R-IgG₁, OX40L-CD8, anti-CD8 biotinilado, perlas donantes conjugadas con estreptavidina y perlasceptoras conjugadas con proteína A) fue añadido en un volumen de 5 microlitros. Todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo (solución salina tamponada con fosfato y BSA al 0,1%), con o sin dimetilsulfóxido (DMSO).

55 En el ensayo estándar, OX40-IgG₁ y OX40L-CD8 se incubaron juntos durante 30 minutos, y luego se añadió anticuerpo anti-CD8 biotinilado (10 nM). Después de otro período de incubación de 30 minutos, las perlas donantes de estreptavidina (20 µg/ml) y las perlasceptoras de proteína A (20 µg/ml) se añadieron a cada pocillo individual. En la

placa se hizo un recuento una hora más tarde, con un equipo de lector de Packard Fusion[®] (Biosignal Packard) con un tiempo de lectura de 1 segundo/pocillo. Debido a la sensibilidad a la luz de las perlas donantes y aceptoras, los experimentos se llevaron a cabo bajo luz azul y todos los períodos de incubación se realizaron a temperatura ambiente. La placa se leyó a una longitud de onda de excitación de 680 nanómetros combinada con una longitud de onda de emisión más corta de 520-620 nanómetros.

Análisis de datos

Todos los valores de K_D , CI_{50} y CE_{50} se calcularon utilizando el programa de Prism[®] (GraphPad Software). La transformación de los valores de CI_{50} en valores K_i se realizó mediante la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng YC y Prusoff WH, 1973).

Resultados

Los ensayos de unión de OX40L conocidos en la bibliografía incluyen el análisis basado en FACS (Taylor L y col., 2002), o un análisis basado en Biacore[®] (Al-Shamkhani A y col., 1997). Por ser estas técnicas inadecuadas para esrutinios de alto rendimiento, se creó un sistema más eficaz para establecer las posibles propiedades inhibitoras de péptidos obtenidos a partir de OX40L, sobre la interacción entre OX40R-OX40L, mediante la utilización de una tecnología disponible comercialmente, denominada ensayo de detección homogéneo de proximidad luminiscente amplificado (AlphaScreen[®]; Packard Bioscience), un método basado en el inmunoensayo luminiscente de canalización de oxígeno (LOCI; documento EP515194; Ullman E y col., 1994).

En pocas palabras, la tecnología AlphaScreen[®] proporciona una determinación fácil y fiable del efecto de compuestos sobre interacciones y actividades biomoleculares, en particular para ensayos de interacción proteína/proteína. AlphaScreen[®] se basa en el uso de perlas de poliestireno "donantes" y "aceptoras", recubiertas cada una con una capa de hidrogel que proporciona grupos funcionales para la conjugación de una molécula específica. Cuando una interacción biológica entre las moléculas inmovilizadas acerca las perlas, se inicia una cascada de reacciones químicas para producir una señal muy amplificada. Después de una excitación con láser a 680 nanómetros, un fotosensibilizador en la perla "donante" convierte el oxígeno ambiente a un estado de singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno en estado de singlete excitado, difunden a través de una distancia máxima de 200 nanómetros antes de una rápida desactivación. Si una perla aceptora está muy cerca, estas moléculas de oxígeno reaccionan con un agente quimioluminiscente (tal como los derivados de tioxeno) contenidos en las perlas aceptoras, para generar quimioluminiscencia. Los fluoróforos activados emiten posteriormente luz a 520-620 nanómetros. En ausencia de una interacción biológica específica, las moléculas de oxígeno en estado de singlete producidas por la perla donante, no se detectan, sin la proximidad de la perla aceptora. La tecnología de AlphaScreen[®] permite la detección de interacciones con afinidades en el intervalo sub-nanomolar/micromolar.

En el presente caso, el sistema experimental se sometió por primera vez a ensayo utilizando sólo las parejas de unión básicas, inmovilizadas sobre perlas de AlphaScreen[®] mediante el uso de diferentes marcadores de afinidad que tienen un enlazador biológico corto que evita el uso de grupos marcadores exógenos. La señal debe ser detectada sólo cuando las perlas donantes de estreptavidina y aceptoras de proteína A están separadas por una distancia menor que 200 nm, en virtud del complejo formado por anticuerpo anti-CD8 biotilado, OX40L-CD8 y OX40R-IgG₁ (Fig.1). El dominio extracelular de OX40R marcado con IgG₁, se incubó con OX40L-CD8 soluble, formando un complejo. Debido a los marcadores relevantes, este complejo era capaz de acoplarse a las perlas aceptoras de proteína A, en presencia de un anticuerpo anti-CD8 biotilado, y a las perlas donantes de estreptavidina, generando una señal detectable con Alphascreen[®]. En presencia de un compuesto que compite por la interacción entre OX40L-OX40R, las perlas donantes y aceptoras ya no deberían estar próximas y la señal ya no se debería detectar más.

En los experimentos iniciales realizados para determinar la viabilidad de este ensayo, la señal de Alphascreen[®] se incrementó con la adición de OX40R-IgG₁, en una forma dependiente de la dosis (Fig. 2A). Los valores calculados de CE_{50} ($-\log CE_{50} \pm SEM$, error estándar de la media) eran $7,7 \times 10^{-9}$ M ($8,11 \pm 0,04$) y $7,9 \times 10^{-9}$ M ($8,10 \pm 0,01$) empleando OX40-IgG₁ 5 o 10 nM, respectivamente. El experimento se repitió a continuación, utilizando una amplia gama de concentraciones de receptor (2,5-80 nM) con el fin de determinar la concentración óptima para el uso de este ensayo de unión. Se sometieron a ensayo siete concentraciones en total y los resultados mostraron que cada concentración generaba un aumento dependiente de la dosis, de la relación Señal/Ruido de fondo (S/R) en la señal del Alphascreen[®], después de la incubación con OX40L-CD8 (Fig. 2B). En todos los casos, no hubo diferencias significativas entre los valores calculados de CE_{50} , que se mantuvieron en el rango nanomolar.

Teniendo en cuenta estos resultados, se realizaron otros experimentos con una concentración de OX40R-IgG₁ (10 nM) y de OX40L-CD8 (40 nM) que permitía una ventana S/R adecuada para trabajar y aseguraba también que el ensayo fuera rentable utilizando sólo una concentración mínima de estas proteínas de fusión.

La K_D de OX40L-CD8 para OX40R-IgG₁ se calculó a continuación, restando la señal debida a una unión no específica, tal y como se determinó en presencia de suramina (1 mM), una molécula pequeña que inhibe las interacciones de proteínas similares a TNF con sus receptores (Alzani R y col., 1995). La unión específica de OX40L-CD8 era saturable y de alta afinidad (Fig. 3), con un valor K_D calculado de $20,7 \pm 5,2$ nM. Esto está de acuerdo con los valores de la bibliografía, cuando se midió la afinidad de la unión de OX40L-CD4 hacia OX40R utilizando un método de chip

sensor de Biacore (Al Shamkhani A y col., 1997) y, en general, similar a los valores de K_D obtenidos para otros miembros de la familia de receptores de TNF hacia sus respectivos ligandos.

5 Se investigó la capacidad de los dos competidores conocidos de las interacciones entre OX40L-OX40R (OX40L soluble humano recombinante y sin marcar, y suramina), que son ambos incapaces de generar una señal de Alphascreen® en este ensayo en ausencia de OX40L-CD8, para desplazar a OX40L-CD8 de OX40R-IgG₁. Los experimentos del desplazamiento se llevaron a cabo, teniendo en cuenta el valor aproximado de K_D , con una concentración de OX40L-CD8 (40 nM) que era 4 veces mayor que la de OX40R-IgG₁ (10 nM). Concentraciones crecientes de OX40L (3 μ M-0,1 pM) o suramina (1 mM-1 nM) se añadieron a una mezcla de reacción que también contenía OX40-IgG₁ (10 nM) y OX40L-CD8 (40 nM). Los dos compuestos compiten por la unión a OX40L-CD8 en un manera dependiente de la dosis, con valores resultantes de CI_{50} ($-\log CI_{50} \pm SEM$) de $5,9 \times 10^{-9}$ M ($8,23 \pm 0,35$) y $7,9 \times 10^{-5}$ M ($4,10 \pm 0,06$), respectivamente (Fig. 4). Estos valores se pueden transformar por la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng, YC y Prusoff, WH, 1973) a valores K_i de 2,0 nM para OX40L y 26,3 μ M para suramina. Este último valor de suramina es similar a los valores descritos para la inhibición de la unión de TNF- α al receptor de TNF (Gray PW y col., 1990).

15 Una mayor optimización del ensayo se realizó para definir mejor las condiciones para llevar a cabo el ensayo. El ensayo era capaz de tolerar, sin ninguna pérdida de señal, una concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) de hasta 1%. El ensayo se puede realizar de manera eficiente mediante la combinación de OX40-IgG₁, OX40L-CD8 y anticuerpo anti-CD8 biotinilado en una primera etapa de adición, y combinando perlas donantes de estreptavidina y aceptoras de proteína A, en una segunda etapa de adición, manteniendo un tiempo total de incubación de 60 minutos. Ambas mezclas se pueden preparar con anticipación para añadir a la placa.

20 La tecnología de Alphascreen® descrita anteriormente, desarrollada inicialmente para detectar péptidos obtenidos a partir de OX40L que inhiben competitivamente la interacción entre OX40L-OX40R, sería conveniente para escrutar también para cualquier otro inhibidor selectivo de molécula pequeña o peptídico, de dicha interacción. Puesto que este ensayo es homogéneo, muy sensible, resistente y adecuado para la automatización en un formato de 384 pocillos, el mismo enfoque es potencialmente adaptable al desarrollo de escrutinios bioquímicos para muchos otros ligandos proteicos que interaccionan con proteínas asociadas a la membrana, simplemente mediante la expresión de la porción extracelular de la proteína asociada a la membrana y el ligando proteico como proteínas de fusión con diferentes secuencias marcadoras (IgG₁ y CD8, respectivamente, en el presente caso).

Ejemplo 2: Identificación de péptidos obtenidos a partir de OX40L que se unen a OX40R

Métodos

30 *Péptidos*

Los péptidos (10-31 aminoácidos) se sintetizaron con una pureza que oscilaba de 85 a 97% por Epytop (Francia), y se almacenaron en forma liofilizada a -20°C. Los péptidos se solubilizaron en NaOH 0,1 mM en PBS antes de su uso. El nombre, la secuencia y los aminoácidos correspondientes en OX40L humano para cada péptido se muestran en la Tabla III.

35 *Ensayo de competencia basado en Alphascreen®*

40 Los componentes solubles (OX40-IgG₁, OX40L-CD8 y anticuerpo anti-CD8 biotinilado) se mezclaron en la concentración descrita anteriormente para los ensayos de competencia con OX40L y suramina (Fig. 4), junto con diferentes concentraciones de cada péptido en un volumen de 5 microlitros en una primera etapa de adición. Las perlas donantes de estreptavidina y aceptoras de proteína A se añadieron 30 minutos más tarde. Las placas se incubaron durante 2 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación, antes de realizar una lectura a una longitud de onda de excitación de 680 nm, combinada con una longitud de onda de emisión más corta de 520 a 620 nanómetros, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

Ensayo de extinción de la fluorescencia

45 El ensayo de extinción de la fluorescencia se realizó tal y como se ha descrito previamente (Golabek A y col., 2000). OX40R-IgG₁ (35 microgramos) se disolvió en 500 microlitros de PBS y el espectro de la fluorescencia se registró a 295-420 nanómetros con una longitud de onda de excitación de 290 nm, utilizando un espectrofluorómetro (Perkin Elmer LS50B) con ranuras de 5 nanómetros. Los espectros de fluorescencia de OX40R-IgG₁ humana se registraron luego en presencia de concentraciones crecientes (5-1000 nM) de péptidos P5 y P5-1, después de 15 minutos de equilibrio. El cambio de la fluorescencia a 336 nanómetros se representó frente a la concentración de péptido y las curvas resultantes se analizaron mediante ajuste de regresión no lineal, con el programa de Prism® (GraphPad).

Resultados

55 Una serie de péptidos que se superponen parcialmente fueron diseñados basándose en la secuencia del dominio extracelular de OX40L humano (Fig. 5A, Tabla III), que se corresponde a los aminoácidos 51-183 de la proteína. En esta área, se diseñaron previamente dos péptidos basándose en la secuencia de OX40L de ratón para obtener los anticuerpos anti-OX40L (Stuber E y Strober W, 1996).

Usando una primera serie de péptidos en el ensayo de competencia basado en Alphascreen® descrito en el Ejemplo 1, fue posible definir un péptido (P5), capaz de inhibir la unión de OX40R a OX40L en el rango micromolar (Figura 5B), un valor de afinidad que es farmacológicamente relevante.

5 Basándose en la secuencia del péptido P5, se sometieron a ensayo una segunda serie de péptidos que estaban parcialmente superpuestos, para reducir aún más esta molécula inhibidora (Figura 6A; Tabla III). El resultado de este escrutinio secuencial es que la región comprendida entre los aminoácidos 94 y 124 de OX40L humano (P5) no es una región mínima puesto que un péptido correspondiente a los aminoácidos 107-116 (P5-1), es capaz de inhibir la unión de OX40R con OX40L, aún en el rango micromolar ($K_d \sim 10$ y 62 microMolar, respectivamente). Los otros péptidos sometidos a ensayo no mostraron ningún efecto o mostraron efectos difícilmente medibles sobre la interacción entre OX40R-OX40L (Figura 6B).

10 Puesto que se demostró que el péptido P4, que contiene los seis aminoácidos C-terminales del péptido P5-1, se unía muy mal a OX40R, se puede concluir también que los aminoácidos N-terminales del péptido P5-1, por ejemplo, la secuencia GYFSQ (péptido P5-1a; aminoácidos 107-111 en OX40L humano; SEQ ID NO: 13), pueden representar una secuencia de péptido mínimo, funcionalmente activo como agente de unión a OX40R. Cuando se comparaba con el péptido obtenido a partir de OX40L de ratón, P-OX-1 (Stuber E y Strober W, 1996), este péptido contiene dos sustituciones no conservadoras (Fig. 6A).

15 Las secuencias de los péptidos P5 y P5-1, identificadas en este ejemplo mediante ensayos de competencia, han permitido identificar estructuras en el OX40L que desempeñan un papel esencial en la interacción entre OX40L-OX40R, lo que demuestra que secuencias de péptidos específicos pueden competir efectivamente con OX40L. Estos resultados no eran predecibles a partir del análisis del estado de la técnica sobre la relación estructura-actividad de estas proteínas, ni de otras proteínas similares a TNF/TNFR, siendo muy diversas las regiones de contacto entre proteínas pertenecientes a estas familias entre las parejas de ligandos y receptores (Bodmer JL y col., 2002).

20 La afinidad de los péptidos identificados en el Ejemplo 1 como inhibidores de la interacción entre OX40L-OX40R, se evaluó mediante espectroscopia de extinción de la fluorescencia, una tecnología que permite tales mediciones en solución, en condiciones naturales y sin perlas u otros soportes. Este método se basa en el seguimiento de los cambios en la fluorescencia intrínseca de una proteína (OX40R-IgG₁) después de su unión con otra proteína (P5 o P5-1). La incubación de OX40R-IgG₁ con concentraciones crecientes de péptidos P5 o P5-1 produjo un cambio de su fluorescencia intrínseca en forma de una curva hiperbólica, cuando los cambios en la fluorescencia de OX40R-IgG₁ se representaron frente a la concentración del péptido P5 y P5-1 (Figura 7A y 7B). Un análisis de regresión no lineal de los datos, reveló una constante de disociación aparente para OX40R de $K_D \sim 7,9$ nM y $K_D \sim 24,6$ nM para los péptidos P5 y P5-1, respectivamente. Estos valores muestran una interacción de alta afinidad entre OX40R-IgG₁ y los péptidos seleccionados, que se pueden utilizar por ello como antagonistas de OX40L.

25 Los resultados presentados en este Ejemplo indican que la interacción entre OX40R-OX40L se puede inhibir con efectividad mediante el uso de péptidos específicos obtenidos a partir de OX40L que se unen de manera eficaz a OX40R, proporcionando una nueva oportunidad para el desarrollo de fármacos dirigidos a la ruta de OX40R y que inhiben eventos fisiológicos aberrantes o indeseables bajo su control. Estos agentes de unión a OX40R se pueden caracterizar con más detalle como antagonistas de OX40L en su interacción con OX40R, empleando ensayos con animales y de biología celular conocidos en la técnica (documento WO 99/42585, Imura A y col., 1997; Nohara C y col., 2001; Pippig SD y col., 1999; Kotani A. y col., 2002) y, se pueden validar adicionalmente sometiendo a ensayo otros efectos secundarios que limitan el uso potencialmente, en modelos pertinentes (Coleman RA y col., 2001).

TABLA I

Aminoácido	Grupo de aminoácidos sinónimos	Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala, Ser	Gly, Ala
Arg	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Asn	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Asp	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Cys	Ser, Thr, Cys	Cys
Gln	Glu, Asn, Asp, Gln	Asn, Gln
Glu	Glu, Asn, Asp, Gln	Asp, Glu
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly	Gly, Ala
His	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Ile	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Leu	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Lys	Asn, Lys, Gln, Arg, His	Arg, Lys, His
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met	Ile, Val, Leu, Met
Phe	Trp, Phe, Tyr	Tyr, Phe
Pro	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Pro
Ser	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser
Thr	Gly, Ala, Ser, Thr, Pro	Thr, Ser

Trp	Trp, Phe, Tyr	Trp
Tyr	Trp, Phe, Tyr	Phe, Tyr
Val	Met, Phe, Ile, Leu, Val	Met, Ile, Val, Leu

TABLA II

Aminoácido	Grupo de sinónimos
Ser	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Arg	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Leu	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Pro	D-Pro, ácido L-l-tioazolidin-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidin-4-carboxílico
Thr	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met O), Val, D-Val
Ala	D-Ala, Gly, Aib, B-Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Val	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG
Gly	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, beta-Ala, Acp
Ile	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Phe	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, AdaA, AdaG, cis-3,4, o 5-fenilprolina, Bpa, D-Bpa
Tyr	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Cys	D-Cys, S--Me--Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Gln	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Asn	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Lys	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Asp	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Glu	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Met	D-Met, S--Me--Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val

TABLA III

Nombre del péptido	Secuencia del péptido	Correspondencia con OX40L humano
P1 (SEQ ID NO:2)	VASLTYKDKVYLVNVTDTNTSLDDFHVNGGEL	150-180
P2 (SEQ ID NO: 3)	LDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	160-183
P3 (SEQ ID NO: 4)	VSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFILTSQ	52-80
P4 (SEQ ID NO: 5)	EKGFIILTSQKEDIMKVQNNSVIINCDFYLY	72-102
P5 (SEQ ID NO: 6)	IINCDFYLYISLKGYSQEVNLSLHYQKDEE	94-124
P6 (SEQ ID NO: 7)	HYQKDEEPLFQLKKRSVNSLMVASLTYKDK	118-148
P5-1 (SEQ ID NO: 8)	GYFSQEVNIS	107-116
P5-2 (SEQ ID NO: 9)	ISLHYQKDEE	107-124
P5-3 (SEQ ID NO: 10)	GFYLYISLKGYS	99-108
P5-4 (SEQ ID NO: 11)	QEVNLSLHYQ	111-120
P5-5 (SEQ ID NO: 12)	IINCDFYLY	94-103

5

Referencias

- Al Shamkhani A y col., J Biol Chem, 272: 5275-5282, 1997.
- Alzani R y col., Biochemistry, 34: 6344-6350, 1995.
- Bansal-Pakala P y col., Nat Med, 7: 907-912, 2001.
- 10 Bodmer JL y col., Trends Bioch Sci, 27: 19-26, 2002.
- Chen A y col., Immunity, 11: 689-698, 1999.
- Cheng YC y Prusoff WH, Biochem Pharmacol, 22: 3099-3108, 1973.
- Cleland JL y col., Curr Opin Biotechnol, 12: 212-219, 2001.
- Cochran A y col., Curr Opin Chem Biol, 5: 654-659, 2001.
- 15 Coleman RA y col., Drug Disc Today, 6: 1116-1125, 2001.
- Constans A, The Scientist, 16: 37, 2002.

- Dougherty DA, *Curr Opin Chem Biol*, 4: 645-652, 2000.
- Godfrey WR y col., *J Exp Med*, 180: 757-762, 1994.
- Golabek A y col., *Biophys J*, 79: 1008-1015, 2000.
- Golebiowski A y col., *Curr Opin Drug Discov Devel*, 4: 428-434, 2001.
- 5 Gravesstein L y Borst J, *Semin Immunol*, 10: 423-434, 1998.
- Gray PW y col., *Proc Natl Acad Sci*, 87: 7380-7384, 1990.
- Higgins LM y col., *J Immunol*, 162: 486-493, 1999.
- Hruby VJ y Balse PM, *Curr Med Chem*, 7: 945-970, 2000.
- Imura A y col., *Blood*, 89: 2951-2958, 1997.
- 10 Kim HO y Kahn M, *Comb Chem High Throughput Screen*, 3: 167-183, 2000.
- Kopf M y col., *Immunity*, 11: 699-708, 1999.
- Kotani A y col., *Immunol Lett*, 84: 1-7, 2002.
- Kraemer-Pecore CM y col., *Cur Opin Chem Biol*, 5: 690-695, 2001.
- Lowe CR y col., *J Biochem Biophys Methods*, 49: 561-574, 2001.
- 15 Luo B y Prestwich GD, *Exp Opin Ther Patents*, 11: 1395-1410, 2001.
- Makrides SC, *Protein Expr Purif*, 17: 183-202, 1999.
- Miura S y col., *Mol Cell Biol*, 11: 1313-1325, 1991.
- Murata K y col., *J Exp Med*, 191: 365-374, 2000.
- Murphy LR y col., *Protein Eng*, 13: 149-152, 2000.
- 20 Nohara C y col., *J Immunol*, 166: 2108-2115, 2001.
- Pillai O y Panchagnula R, *Cur Opin Chem Biol*, 5: 447-451, 2001.
- Pippig SD y col., *J Immunol*, 163: 6520-6529, 1999.
- Ranney DF, *Biochem Pharmacol*, 59: 105-114, 2000.
- Rogov SI y Nekrasov AN, *Protein Eng*, 14: 459-463, 2001.
- 25 Sawyer TK, en "Structure Based Drug Design", compilado por Veerapandian P, Marcel Dekker Inc., pág. 557-663, 1997.
- Stuber E y Strober W, *J Exp Med*, 183: 979-989, 1996.
- Taylor L y Schwarz H, *J Imm Methods*, 255: 67-72, 2001.
- Taylor L y col., *J Leuk Biol*, 72: 522-529, 2002.
- 30 Tsukada N y col., *Blood*, 95: 2434-2439, 2000.
- Ullman E y col., *Proc Natl Acad Sci*, 91: 5426-5430, 1994.
- Villain M y col., *Chem Biol*, 8: 673-9, 2001.
- Weinberg A y col., *Nat Med*, 2: 183-189, 1996.
- Weinberg A y col., *J Immunol*, 162: 1818-1826, 1999.
- 35 Weinberg A, *Trends Immunol*, 23: 102-109, 2002.
- Yoshioka Y y col., *Eur J Immunol*, 30: 2815-2823, 2000.

Listado de Secuencias

<110> Applied Research Systems ARS holding

<120> NUEVOS AGENTES DE UNIÓN A OX40R

<130> WO498

5 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 183

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30
 Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45
 Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60
 Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
 65 70 75 80
 Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
 85 90 95
 Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
 100 105 110
 Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
 115 120 125
 Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
 130 135 140
 Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
 165 170 175
 Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 180

15

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

20

<400> 2

Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu
 20 25 30

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

5

<400> 3

Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln
 1 5 10 15

Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 20

<210> 4

<211> 29

10 <212> PRT

<213> estructura artificial sintética

<400> 4

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
 1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
 20 25

15 <210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

20 <400> 5

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
 1 5 10 15

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu
 20 25 30

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

25 <213> estructura artificial sintética

<400> 6

Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe
 1 5 10 15

ser Gln Glu Val Asn Ile ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu
 20 25 30

<210> 7

30 <211> 30

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

<400> 7

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Arg Ser
 1 5 10 15
 5 Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
 20 25 30

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

10

<400> 8

Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
 1 5 10

<210> 9

<211> 10

15 <212> PRT

<213> estructura artificial sintética

<400> 9

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu
 1 5 10

20 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

25 <400> 10

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr
 1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

30 <213> estructura artificial sintética

<400> 11

Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln
 1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

5

<400> 12

Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
1 5 10

<210> 13

<211> 5

10 <212> PRT

<213> estructura artificial sintética

<400> 13

Gly Tyr Phe Ser Gln
1 5

15 <210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> estructura artificial sintética

20 <400> 14

Leu Lys Gly Ser Phe Phe Gln Glu Val Lys Ile Asp Leu His Phe Arg
1 5 10 15

Glu Asp

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

25 <213> estructura artificial sintética

<400> 15

Ala Phe Lys Asp Lys Val Tyr Leu Thr Val Asn Ala Pro Asp Thr Leu
1 5 10 15

Cys Glu

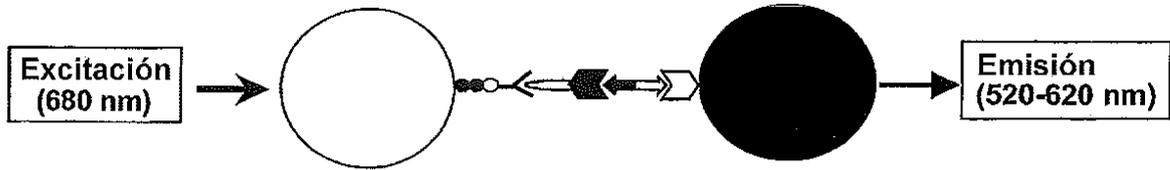
REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión a OX40R que es la secuencia del péptido correspondiente a los aminoácidos 94-124 de OX40L humano y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.
- 5 2. Un agente de unión a OX40R que es un fragmento peptídico de los aminoácidos 94-124 de OX40L humano que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, en donde dicho fragmento comprende los aminoácidos 107-116 de OX40L humano que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
3. El agente de unión a OX40R de acuerdo con la reivindicación 2, que se corresponde a los aminoácidos 107-116 de OX40L humano que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
- 10 4. Un agente de unión a OX40R que es la secuencia peptídica que se corresponde a los aminoácidos 107-111 de OX40L humano y que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13.
5. El agente de unión a OX40R que es un mutante activo de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde uno o varios de sus aminoácidos están sustituidos de forma conservadora y en donde dicho mutante activo se une a OX40R.
- 15 6. Un agente de unión a OX40R que es un polipéptido de fusión que consiste en uno cualquiera de los agentes de unión a OX40R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, fusionado a una región constante de inmunoglobulina.
7. Un agente de unión a OX40R que es una sal de un agente de unión a OX40R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8. Un agente de unión a OX40R que es un conjugado o un complejo activo de un agente de unión a OX40R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, con una molécula escogida entre marcadores radiactivos, biotina, marcadores fluorescentes, agentes citotóxicos y agentes de entrega de fármacos.
9. Un ácido nucleico que codifica un agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6.
10. Un vector de expresión de origen vírico o plasmídico que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.
- 25 11. A célula hospedadora procariota o eucariota, que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Una línea celular estable aislada, sustancialmente enriquecida en células de acuerdo con la reivindicación 11.
- 30 13. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el agente de unión a OX40R es secretado o expresado sobre la superficie de la membrana.
14. Un método para producir un agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el cultivo de células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 y la recogida de dicho agente de unión.
15. Preparaciones purificadas de los agentes de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.
16. Uso de los agentes de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, como un medicamento.
- 35 17. Una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con los linfocitos T CD4⁺, que comprende un agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, como ingrediente activo.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en combinación con soportes, excipientes, estabilizadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 40 19. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde las enfermedades relacionadas con los linfocitos T CD4⁺ son rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunes, inflamaciones o infecciones.
20. Uso de los agentes de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, o de las células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13, para la detección del dominio extracelular de la proteína OX40R como una proteína unida a la membrana o soluble.
- 45 21. Uso de los agentes de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, o de las células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13, para la detección de linfocitos T CD4⁺ activados.
22. Soportes para la detección, la purificación y/o la concentración del dominio extracelular de OX40R, como

una proteína unida a la membrana o soluble, o de linfocitos T CD4⁺ activados, teniendo dichos soportes un agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en forma inmovilizada.

- 5 23. Métodos para la detección, la purificación y/o la concentración del dominio extracelular de OX40R, como una proteína unida a la membrana o soluble, o de linfocitos T CD4⁺ activados en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con los soportes de acuerdo con la reivindicación 22, o con las células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el método se utiliza para diagnosticar un estado asociado con una presencia incrementada o disminuida de linfocitos T CD4⁺ o de proteína OX40R soluble.
- 10 25. Uso del agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, o de las células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13, para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamaciones o infecciones.
26. Un ensayo de escrutinio para determinar la naturaleza y la actividad de compuestos que modulan las interacciones entre OX40R-OX40L que comprende:
- a) la formación de una muestra que comprende los siguientes elementos:
- 15 i. un elemento que constituye el agente de unión a OX40R, elegido entre los compuestos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, las células de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 y los soportes de acuerdo con la reivindicación 22;
- ii. un elemento que constituye el resto de OX40R, escogido entre una proteína que comprende el dominio extracelular de OX40R, una línea celular que expresa el dominio extracelular de OX40R en su superficie y una línea celular que secreta el dominio extracelular de OX40R; y
- 20 iii. el(los) compuesto(s) que se van a someter a ensayo como modulador(es) de las interacciones entre OX40R-OX40L;
- b) la detección, directa o indirecta, del efecto de los compuestos (iii) sobre las interacciones entre los elementos (i) e (ii);
- 25 c) la comparación del efecto detectado en (b) entre las diferentes muestras en términos de calidad y/o de cantidad de los elementos de (a).
27. Un equipo de reactivos para la detección del dominio extracelular de la proteína OX40R o de linfocitos T CD4⁺ activados, que comprende un agente de unión a OX40R de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, una célula de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 o un soporte de acuerdo con la reivindicación 22.
- 30 28. Un equipo de reactivos de acuerdo con la reivindicación 27, para el diagnóstico de un estado debido a una presencia incrementada o disminuida de linfocitos T CD4⁺ o de la proteína soluble OX40R en una muestra obtenida a partir de un paciente.

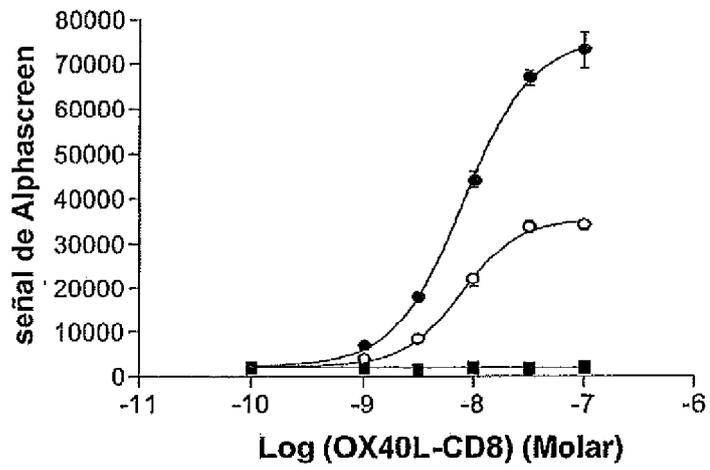
Figura 1



- | | |
|---|--|
|  Perla donante |  Perla aceptora |
|  Estreptavidina |  Proteína A |
|  Anticuerpo anti-CD8 biotinilado |  OX40R-IgG |
|  OX40L-CD8 | |

Figura 2

A)



B)

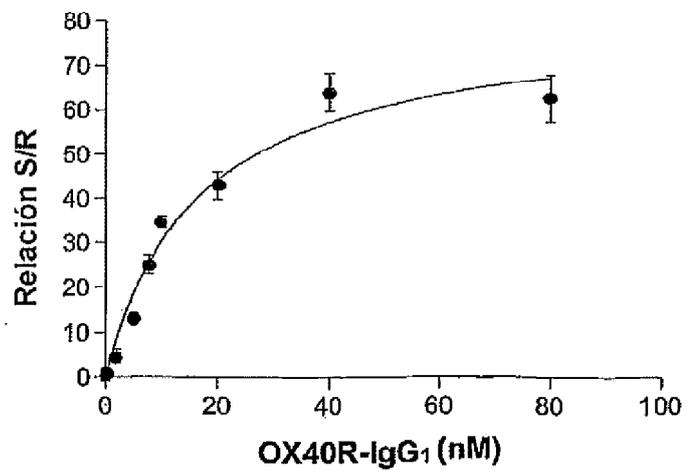


Figura 3

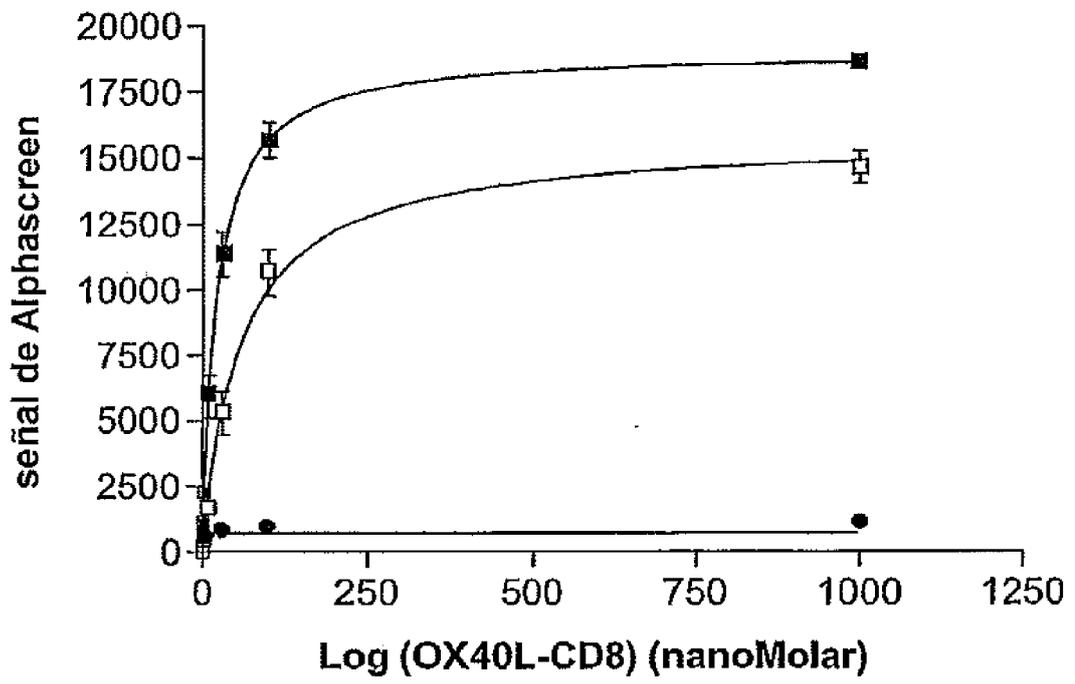


Figura 4

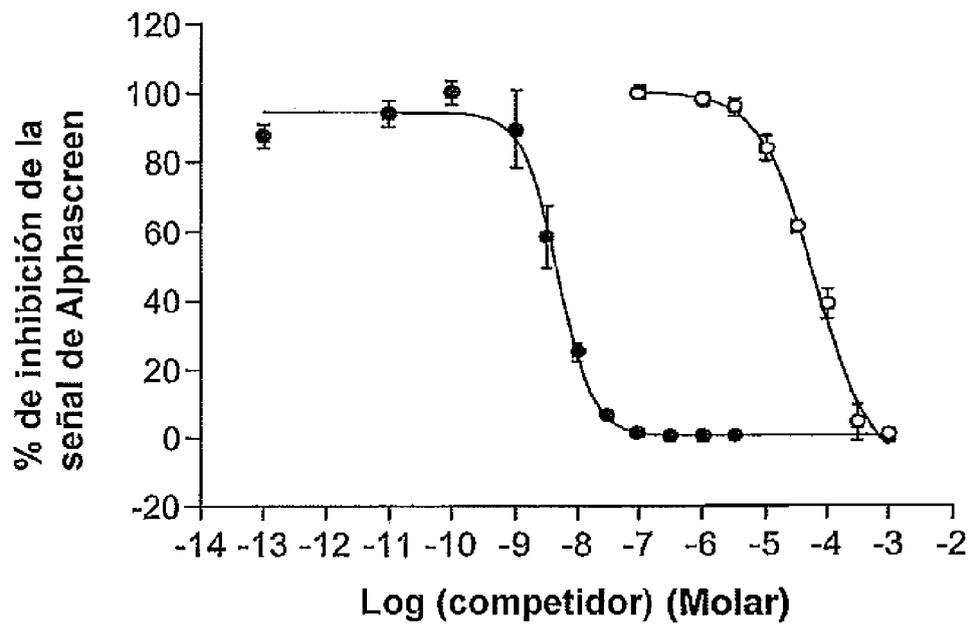


Figura 6

A)

```

P-OX-1          LKGSFFQEVKIDLHFRED
                S S . S .S
P5             IINCDGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQDDEE
P5-1          GYFSQEVNIS
P5-2          ISLHYQDDEE
P5-3          GFYLISLKGY
P5-4          QEVNISLHYQ
P5-5          IINCDGFYLI
    
```

B)

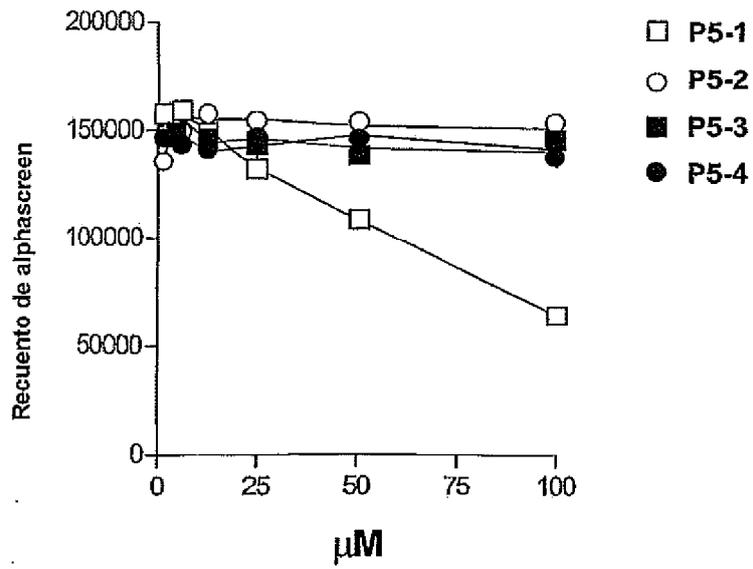
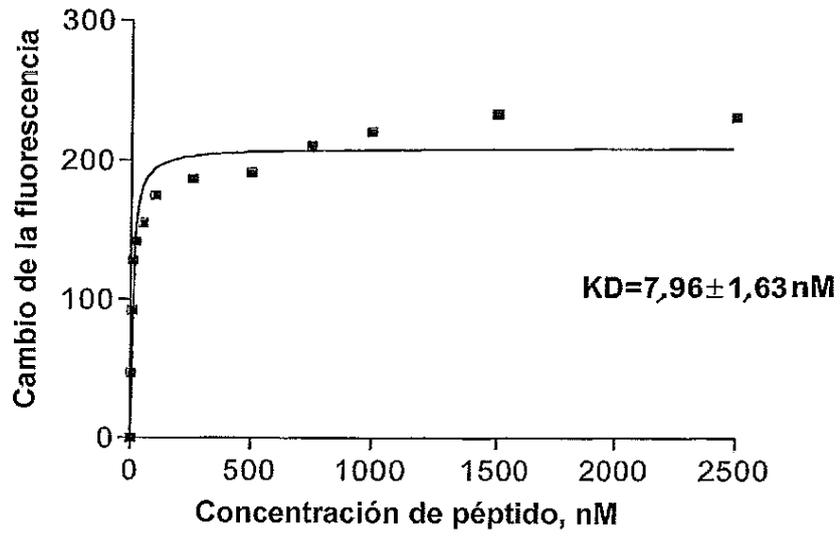


Figura 7

A)



B)

