

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 527**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06728257 .4**
96 Fecha de presentación: **10.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871880**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Proteínas quiméricas que comprenden Yersinia yop, su preparación y composiciones farmacéuticas que las contienen**

30 Prioridad:
11.04.2005 IL 16795905

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**WALLACH, DAVID y
APPEL, ELENA**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 527 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

Proteínas quiméricas que comprenden Yersinia yop, su preparación y composiciones farmacéuticas que las contienen.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una proteína quimérica que comprende un agente de dirección hacia células y una proteína externa de Yersinia, conectadas por un polipéptido de translocación. La invención se refiere, además, a la preparación y uso de tal proteína quimérica.

Antecedentes de la invención

- 10 Las citoquinas de la familia del factor de la necrosis tumoral (familia TNF) proporcionan un punto de vista único de regulación biológica. Estas citoquinas y sus receptores son expresados en casi todas las células y desencadenan una amplia gama de diferentes actividades celulares, en parte en oposición (Wallach et al., 1999. Locksley et al., 2001, y Wallach et al., 2000). Estas citoquinas ayudan a regular prácticamente todos los aspectos de la defensa inmunitaria, así como ciertos procesos relacionados con el desarrollo. Todas estas actividades están mediadas por un único conjunto de proteínas de señalización, aparentemente pocas, que son compartidas por los diferentes receptores (Wallach et al., 1999).

Las citoquinas sirven, normalmente, para intensificar la defensa. No obstante, cuando actúan en exceso, pueden ocasionar gran daño, comparable con el que pueden causar los patógenos. En efecto, en muchas enfermedades, los efectos injustificados de las citoquinas constituyen una causa patógena importante.

- 20 Las citoquinas de la familia TNF regulan una amplia gama de diferentes mecanismos de la defensa inmunitaria, tanto del tipo innato como del tipo adaptativo. La función excesiva de varias de ellas, con inclusión del TNF, el ligando Fas, el ligando CD40 y otros, ha sido implicada en la patología de diversas enfermedades. Existe, en particular, una evidencia extensa del papel patológico importante del TNF en una amplia variedad de enfermedades; enfermedades infecciosas tales como la malaria y la sepsis, enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide, las enfermedades intestinales inflamatorias y la psoriasis, y ciertos tipos de cáncer. Sin duda, se ha descubierto que el bloqueo de la acción del TNF por agentes tales como anticuerpos anti-TNF o receptores del TNF solubles, proporcionan terapia en tales situaciones (Beutler, 1999, Kollias et al., 1999 y Reinold, 2003). En algunas situaciones patológicas, que incluyen la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, una proporción bastante importante de los pacientes responden favorablemente a la terapia anti-TNF. Sin embargo, también existen pacientes con tales enfermedades que responden bastante pobremente a estos agentes, poniendo de manifiesto la necesidad de encontrar enfoques terapéuticos adicionales (Andreaskos et al., 2002).

- 35 A diferencia de muchas otras citoquinas que actúan únicamente como proteínas solubles después de su secreción por la célula que produce citoquinas, los ligandos de la familia TNF son producidos como proteínas transmembranales de tipo II unidas a las células (con la excepción de la linfotóxina que es producida como una proteína soluble secretada). Estos ligandos pueden ejercer sus efectos de esta forma, afectando solamente a las células que están situadas adyacentes a las células que producen el ligando (regulación yuxtacrina). La mayoría de ellos también son diseminados, formando moléculas solubles que circulan. Parte de esos ligandos solubles, por ejemplo el TNF, son capaces de actuar como citoquinas solubles, que sirven como reguladores paracrinos (que afectan a células situadas relativamente próximas a las células que producen el ligando) y reguladores endocrinos (que afectan a células remotas). Algunos ligandos de la familia TNF, por ejemplo el ligando Fas, no actúan eficazmente en su forma desprendida y pueden servir, incluso en tal forma, como antagonistas de la forma unida a las células (Wallach et al., 1999, y Locksley et al., 2001).

- 45 La presencia de ligandos de la familia TNF sobre la superficie de las células que los producen, proporciona medios potenciales para el impacto específico en las células que producen esos ligandos. Tales medios pueden permitir la muerte selectiva de las células que producen los ligandos en situaciones en las que el ligando desempeña un papel patogénico.

- 50 En varios aspectos, la destrucción de células que producen una citoquina puede volver a proporcionar incluso una mejor defensa contra los efectos patogénicos de esta citoquina, que el bloqueo directo de la función de las moléculas de citoquina. La destrucción de la célula que produce citoquina evita la síntesis posterior de las citoquinas y por tanto es probable que proporcione una protección más duradera que la obtenida bloqueando el efecto de las moléculas de citoquina que ya hayan sido sintetizadas,

- 55 Las células que producen una citoquina producen con frecuencia simultáneamente algunas otras citoquinas que en conjunto sirven para provocar un tipo particular de respuesta inmunitaria. Son ejemplos bien conocidos los linfocitos T de tipo Th1 y Th2, que producen grupos diferentes de citoquinas, cada una de las cuales sirve para provocar un tipo diferente de defensa inmunitaria (Jankovic et al., 2001). La destrucción de las células que producen una citoquina puede, por tanto, además de detener la síntesis de tal citoquina particular, dar por resultado también la detención de la síntesis de otras diversas citoquinas que ayudan a las primeras en sus efectos patogénicos.

Si bien el bloqueo de las citoquinas en circulación afecta a la totalidad del cuerpo, la destrucción de las células que producen citoquinas o la atenuación de la producción de citoquinas puede ser restringida al lugar determinado del cuerpo en el que residen estas células, lo que permite de este modo la abolición de los efectos perjudiciales de las citoquinas en tal sitio particular, al tiempo que mantener los efectos beneficiosos de las citoquina en otros lugares.,

5 Estudios del efecto de la terapia anti-TNF en la enfermedad de Crohn, sugieren que la destrucción de las células que producen TNF puede proporcionar, sin duda., en algunos estados patológicos, una terapia más eficaz que la obtenida con el bloqueo del TNF. Se ha descubierto que los efectos terapéuticos de anticuerpos anti-TNF en esta enfermedad, se correlacionaban con la inducción precoz de muerte por los anticuerpos, de las células que producen TNF (Lugering et al., 2001, Van Deventer, 2001, y Van den Brande et al., 2003).

10 El TNF- α es expresado por monocitos, macrófagos y células T CD8+, activados. Estas células presentan TNF- α fijado en la membrana como componente fundamental en su camino citolítico. En las enfermedades que siguen se sospecha que macrófagos activados están implicados en su patología: choque séptico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y artritis psoriatica (Singh y Suruchi, 2004), psoriasis (Asadullah et al., 2002), esclerosis lateral amiotrófica (Ghezzi et al, 1998), diabetes mellitus dependiente de insulina (Kagi et al., 1999), enfermedad de
15 injerto contra huésped (Hongo et al., 2004), y anemia de células falciformes (Belcher et al., 2000). En las enfermedades que siguen se sospecha que están involucradas en su patología células T CD8+: lupus eritematoso sistémico (Pacheco et al., 2002), artritis reactiva y otras enfermedades autoinmunitarias (Mittler, 2004). Con frecuencia, la célula T CD8+ activada es perjudicial para un órgano específico. Por ejemplo, la apoptosis hepatocítica extensa que ocurre durante la inflamación del hígado, es inducida después de la infiltración en el hígado
20 de células T CD8+ activadas.

Moléculas quiméricas que comprenden una citotoxina ligada a una molécula de dirección que se une a un constituyente de la superficie celular, pueden servir como agentes potentes de muerte celular. La elección de un resto de dirección que reconozca un constituyente superficial específico de un tipo de células, puede permitir aplicar
25 tales moléculas quiméricas citotóxicas a la destrucción selectiva de células específicas, in vivo. Por ejemplo, proteínas quiméricas de fusión que comprenden anticuerpos contra epítomos específicos del cáncer, fusionadas a exotoxina de *Pseudomonas* (PE) o a la toxina diftérica (DT) pueden dirigirse específicamente y matar células cancerosas. Tales efectos anticancerosos han sido obtenidos también con moléculas quiméricas en las que las toxinas han sido fusionadas a hormonas o a ligandos tales como IL-2, IL-4 ó IL-13, cuyos receptores son predominantes en ciertos tumores. Asimismo, han sido diseñadas moléculas quiméricas que contienen citotoxinas para dirigir las células afectadas por patógenos. Por ejemplo, células infectadas con HIV pueden ser destruidas selectivamente utilizando inmunotoxinas que comprenden un anticuerpo anti-gp120 dirigido al sitio de unión de CD4 conservado de gp120, o CD4, unido a una exotoxina de *Pseudomonas* (Brinkmann y Pastan, 1995, Pastan y
30 Kreitman, 1998 y Pastan, 2003).

Una clase de agentes posibles para dirigir citotoxinas u otros agentes de modulación hacia células que expresan ligandos de la familia TNF, son anticuerpos contra estos ligandos. En efecto, han sido empleados anticuerpos
35 contra el ligando CD40 para dirigir una toxina hacia células que producen el ligando CD40 (documento EP 1005372).

La solicitud de patente provisional de EE.UU. No. 60/582.827 describe una proteína quimérica (TBP-PE38) que comprende la parte extracelular del receptor de TNF p55 (TBP-1) fijada a los dominios de translocación de le
40 exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* y a los dominios de ribosilación de ADP (PE38 ó PEI-II). Se ha indicado que la proteína TBP-PE38 se une a células epiteliales que sobreexpresan TNF en su superficie e induce citotoxicidad en tales células.

Una diversidad de toxinas bacterianas se unen específicamente a receptores situados sobre la superficie celular y son internalizadas por endocitosis mediada por receptor. En general, la endocitosis mediada por receptor permite la fijación selectiva de proteínas extracelulares (por ejemplo, receptores) y de partículas pequeñas (por ejemplo, ligandos) (Molecular cell biology Darnell Lodish and Baltimore). Típicamente, después de la unión de una partícula a un receptor situado sobre la membrana plasmática, el complejo ligando-receptor es internalizado en un hueco revestido con clatrina que se contrae transformándose en una vesícula revestida con clatrina. Después, la capa de clatrina se despolimeriza a trisqueliones, dando por resultado una vesícula sin revestir, denominada frecuentemente
50 endosoma. El endosoma se fusiona con una vesícula sin acoplar denominada CURL (compartimento que no acopla receptores ni ligandos), caracterizado por un pH interno de 5,0 aproximadamente. El bajo pH hace que se disocien partículas desde el receptor. Una región rica en receptor crece formando una vesícula separada que recicla el receptor de nuevo a la membrana plasmática.

Las proteínas internalizadas mediante endocitosis mediada por receptor soportan varias suertes. Por ejemplo, pueden ser transferidas a los lisosomas, donde son destruidas, pueden ser procesadas mínimamente y permanecer en las células o, en otros casos, el material que ha sufrido endocitosis puede atravesar totalmente las membranas celulares y sufrir exocitosis o ser secretado desde la membrana plasmática en el sitio opuesto.

La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) se une y penetra en las células por medio de una proteína relacionada con un receptor de macroglobulina $\alpha 2$ / receptor de lipoproteínas de baja densidad. Después de internalización, la PE es

procesada proteolíticamente en el endosoma por una proteasa tal como furina y reducida a un fragmento activo de 38 kDa (PE-38), y tal fragmento es translocado al citosol donde el ADP ribosila el factor de elongación 2 ocasionando la inhibición de la síntesis proteínica.

5 Tanto el procesamiento proteolítico de PE (llevado a cabo en el endosoma o en el retículo endoplásmico por proteasas tales como furina), como la translocación de PE-38 al citosol, son necesarias para una toxicidad celular eficaz. El dominio I de PE (Fig. 1) incluye la actividad de unión de células, el dominio II la actividad de translocación, y el dominio III la actividad de ribosilación de ADP. Cada uno de estos dominios comprende unidades estructurales que pueden ser replegadas independientemente. El dominio de translocación (PEII) contiene seis hélices α consecutivas (A-F). Estudios de mapeo de supresión basados en la estructura primaria de la proteína han puesto de
10 manifiesto que el segmento amino terminal que engloba las hélices A Y B es requerido para la translocación de PE (Siegall et al., 1989). En el extremo carboxilo terminal, se han encontrado que algunos restos dentro de la hélice E eran críticos mientras que otros restos y la hélice F entera podían ser suprimidos sin pérdida aparente de la actividad de translocación. Además, la supresión de la última hélice α (F) intensificaba tanto la actividad de translocación como la citotoxicidad de PE (Taupiac et al., 1999).

15 Aun cuando existe evidencia de que la parte de la exotoxina PE que incluye PE I-II, es capaz de translocar barnasa, una enzima bacteriana, desde el endosoma hasta el citoplasma de células eucarióticas (Prior et al., 1996), no se ha informado ni demostrado la actividad de translocación del dominio II flanqueado por proteínas heterólogas.

20 La exotoxina de *Pseudomonas* y la toxina diftérica son agentes citotóxicos potentes. La exotoxina de *Pseudomonas* y la toxina diftérica inhiben la síntesis de proteínas afectando a la totalidad del metabolismo celular en una extensa variedad de células. Por el contrario, se conoce otro tipo de toxinas bacterianas que regulan caminos metabólicos específicos. Por ejemplo, cada una de las seis toxinas de la proteína externa de *Yersinia* (Yop) modula caminos de señalización específicos.

25 La *Yersinia pestis* es el agente causante de la peste bubónica. La *Yersinia pestis* es responsable de tres pandemias humanas: la peste Justiniana (siglos VI – VIII), la Muerte Negra y la peste moderna. La *Yersinia enterocolitica* y la *Yersinia pseudotuberculosis* son organismos patógenos transportados en los alimentos, que causan gastroenteritis. La patogenicidad de *Yersinia* resulta de su capacidad para superar la defensa inmunitaria del mamífero hospedador.

30 La proteína externa de *Yersinia*, P (YopP) es una toxina producida por *Y. enterocolitica*. La YopP es esencial para el establecimiento de la infección sistémica en el ratón e inhibe la producción de TNF- α y desencadena apoptosis en los macrófagos infectados (Cornelis, Nature 2001). La distribución citosólica de YopP, que implica translocación a través de la envoltura bacteriana de doble membrana y de la membrana de la célula huésped, es desencadenada mediante una maquinaria de secreción proteínica activada (sistema de secreción proteínica de tipo III), que es activada por contacto con la célula huésped. Tal maquinaria de secreción proteínica es absolutamente necesaria para la distribución de YopP al citosol.

35 Se piensa que la proteína YopP activa la apoptosis por medio de una de dos vías, o bien por activación del camino BID/caspasa 8 y prevención de la liberación de factores anti-apoptóticos, o a través de un camino menos "directo" que implica inhibición de la proteína NF- κ B. La YopP evita la fosforilación del inhibidor de NF- κ B por IKK, y por consiguiente inhibe la emigración de NF- κ B hacia el núcleo. La YopP ocasiona también inhibición del camino de señalización de la proteína quinasa activado por mitógenos (MAPK), inhibiendo las MAPK quinasas (MAPKs) aguas
40 arriba. Como resultado de estas acciones inhibitorias de YopP los activadores de la transcripción tales como la proteína de unión de elemento de respuesta de cAMP (CREB) y la activación del factor de transcripción (ATF)-1, así como también NF- κ B, no pueden estimular la transcripción de genes que están involucrados en la síntesis de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α (Orth et al., 1999, Orth. 2002 y Palmer et al, 1999).

45 La YopP parece ser una proteasa, posiblemente de la familia de-SUMOilación (donde SUMO representa "modificador pequeño relacionado con ubiquitina"). La estructura secundaria predicha de YopP es similar a la de la cisteína proteasa procedente de adenovirus (AVP). Las mutaciones de la triada catalítica (His109, Glu128 y Cys172 de la YopP) incapacita a la proteína YopP para inhibir tanto el camino de MAPK como el de NF- κ B.

Sumario de la invención

50 La invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de un agente de dirección hacia células específicas y la secuencia de aminoácidos de una proteína externa de *Yersinia*, P (YopP) conectadas mediante un polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica, o de uno de sus fragmentos, desde el endosoma hasta el citosol de una célula diana, en la que el agente de dirección hacia células específicas es la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF.

55 En una realización de la presente invención, el agente de dirección hacia células específicas de la proteína quimérica, es la proteína de unión de TN, 1 (TBP-1) o la proteína de unión de TNF, 2 (TBP-2).

- En otra realización de la invención, la YopP de la proteína quimérica de la presente invención posee actividad apoptótica reducida o nula tal como los serogrupos O: 3, O: 9 y O:8 de la YopP mutados en el resto de arginina 143.
- 5 En otra realización de la invención, el polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica de la presente invención, incluye el dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas* o uno de sus fragmentos, tal como un dominio de translocación que es deficiente en el dominio de la última hélice α (F) o del dominio de translocación, designado PEItr, que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la exotoxina de la *Pseudomonas aeruginosa* de la Fig. 3 (SEQ ID NO: 3).
- 10 Todavía, en otra realización de la invención, la proteína quimérica de la presente invención comprende uno o dos sitios de escisión de furina. Más específicamente, un sitio de escisión de furina, tal como el de la exotoxina de PE, está situado en el extremo N-terminal de dicho polipéptido que permite la translocación, mientras que el otro sitio de escisión de furina, tal como el de la toxina diftérica (por ejemplo, RVRR), está situado en el extremo N-terminal de dicha proteína Yop.
- 15 Todavía, en otra realización, la proteína quimérica de la presente invención consiste en TBP-1, el fragmento del dominio de translocación de la exotoxina de la *Pseudomonas aeruginosa*, PEItr, el sitio de escisión de furina DT, y YopP, designado en esta memoria TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma.
- En un aspecto de la invención, la diana celular de la proteína quimérica de la invención es una célula linfocítica tal como un macrófago o un monocito.
- En otro aspecto de la invención, la diana celular de la proteína quimérica de la invención es una célula epitelial.
- 20 En otra realización, la invención proporciona una secuencia de DNA que codifica dicha proteína quimérica, que puede codificar, además, un péptido señal para secreción en células eucarióticas.
- Todavía en otra realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende dicha secuencia de DNA y, opcionalmente, el DNA está ligado funcionalmente a un promotor que posee una actividad que es independiente de NF- κ B, tal como el promotor EF-1 α .
- 25 Todavía en otra realización, la invención proporciona una célula huésped, por ejemplo una célula procariótica o eucariótica tal como HeLa, CHO, HEK 293, Levadura y células de insecto que comprenden dicho vector de expresión.
- En un aspecto de la invención, se proporciona un método de producción de dicha proteína quimérica, que comprende cultivar dicha célula huésped y aislar dicha proteína quimérica producida.
- 30 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende dicha proteína quimérica y un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de dicha proteína quimérica para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en la que la actividad de un ligando del receptor de TNF/NGF, tal como TNF, está implicada en la patogénesis o en el curso de la enfermedad.- Son ejemplos de dichas enfermedades la malaria, las sepsis, la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad intestinal inflamatoria, y el cáncer.
- 35 En una realización, la invención se refiere al uso de dicha proteína quimérica para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en la que están involucrados macrófagos o monocitos activados en la patogénesis o en el curso de la enfermedad. Son ejemplos de dichas enfermedades el choque séptico, la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, la psoriasis, la esclerosis lateral amiotrófica, las diabetes mellitus dependientes de insulina, la enfermedad del injerto contra el huésped y la anemia de las células falciformes.
- 40 Además, se describe en esta memoria el uso de dicha proteína quimérica, para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en la que está implicada la activación de NF- κ B en la patogénesis o en el curso de la enfermedad y, preferiblemente, cuando la activación de NF- κ B en la enfermedad está inducida por NIK mediante el camino canónico.
- 45 Un aspecto que se describe en esta memoria es un método para el tratamiento de una enfermedad en la que el ligando del receptor de TNF/NGF, tal como TNF, está implicado en la patogénesis o en el curso de dicha enfermedad, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello, una cantidad de dicha proteína quimérica, eficaz desde el punto de vista terapéutico.
- 50 También se describe en esta memoria un método de tratamiento de una enfermedad en la que macrófagos o monocitos activados están implicados en la patogénesis o en el curso de dicha enfermedad, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello, una cantidad de dicha proteína quimérica, eficaz desde el punto de vista terapéutico.

También se describe en esta memoria un método de tratamiento de una enfermedad en la que la activación de NF- κ B está implicada en la patogénesis o en el curso de dicha enfermedad y, preferiblemente, en la que la activación de NF- κ B está inducida por NIK por medio del camino canónico, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad de dicha proteína quimérica, eficaz desde el punto de vista terapéutico.

- 5 Todavía en otra realización, la invención proporciona un método in vitro para reducir la expresión anormal de un ligando tal como el TNF, sobre la superficie celular de una célula diana, tal como una célula monocítica o de macrófago, cuyo método comprende exponer la célula diana a una proteína quimérica que comprende la parte extracelular de un receptor del ligando expresado sobre la superficie de la célula diana, tal como TBP-1, e Yop conectadas mediante un polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica desde el endosoma hasta el citosol de la célula, tal como PEItr o de uno de sus fragmentos.

La invención está caracterizada también en las reivindicaciones.

Descripción breve de las figuras

- 15 Las Figs 1A-B muestran representaciones esquemáticas de la proteína quimérica TBP-YopP (Fig. 1A) y de la exotoxina de Pseudomonas (PE) (Fig. 1B).. la proteína I de unión de **TBP-1-TNF**; el dominio II truncado de **PEItr** de la exotoxina de Pseudomonas; el sitio de furina de la toxina diftérica **DT**; la proteína externa P de Yersinia-**YopP**. La Fig. 1C muestra la secuencia de DNA que codifica la proteína quimérica TBP-YopP (SEQ ID NO: 1).

La Fig. 2 muestra la secuencia de DNA del fragmento que codifica el dominio II truncado de la exotoxina de Pseudomonas, PEItr (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de PEItr (SEQ ID NO: 3).

- 20 Las Figs. 4A-4C muestran la expresión recombinante de YopP en células HEK293 (células embrionarias humanas del riñón, número de la ATCC CRL.1573) que albergan vectores que codifican YopP y un gen informador, ambos genes controlados por el promotor EF1- α (Fig. 4A) o el promotor CMV (Fig. 4B) Vectores que codifican YopP o β -galactosidasa (bDal), ambos marcados a v5 y controlados por el promotor EF1- α (en el vector pEF6, Invitrogen) fueron transfectados conjuntamente en células 293 (Fig. 4 A). 48 horas después de la transfección las células fueron lisadas y sometidas a análisis de transferencia Western usando anti v5 para la detección. 1, 2,5 y 5 μ g del plásmido YopP-v5/EF6 y 0,1 μ g del plásmido β -Gal/EF6 fueron usados para la transfección. Los vectores que codifican YopP o proteína fluorescente verde (GFP), ambos marcados para His-T7 y controlados por el promotor CMV (en el vector pcDNA3-HisA, Invitrogen), fueron transfectados conjuntamente en células 293 (Fig. 4B). 48 horas después de la transfección, las células fueron lisadas y sometidas a análisis de transferencia Western usando para la detección anti T7. 1, 2,5 y 5 μ g del plásmido His-YopP/pcDNA3-HisA y 0,1 μ g del plásmido His-GFP/pcDNA3-HisA se usaron para la transfección. La Fig. 4C muestra una representación esquemática de los sitios principales de unión del factor de transcripción de los promotores EF-1 α y CMV. Se observó que la expresión de YopP partiendo del promotor CMV, que puede estar reprimida en ausencia de la proteína NF- κ B activada, está por debajo de un nivel detectable (Fig. 4B), pero se observa actividad de YopP que inhibe la proteína NF- κ B, ya que cantidades crecientes del vector de expresión de YopP inhiben la expresión de GFP desde el promotor CMV. El promotor EF-1 α , que es independiente de la actividad de NF- κ B, es más apropiado que el promotor CMV para la expresión de YopP, y que la expresión del gen informador procedente de este promotor no es afectada por YopP (Fig. 4A). En todos los experimentos posteriores con células eucarióticas, YopP o sus derivados de fusión son expresados bajo el control del promotor EF-1 α .

- 40 Las Figs. 5A-5C muestran la inhibición mediada por YopP de la activación de NF κ B en células 293. La Fig. 5A muestra la inhibición de YopP de la activación de NF- κ B mediada por TNF en células 293. Las células 293 que albergan el gen informador de luciferasa controlado por el promotor tat inducible por NF- κ B, fueron tratadas con TNF con objeto de inducir la activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B fue efectuada en presencia de YopP ectópica. La Fig. 5B muestra la inhibición de YopP de la activación de NF- κ B mediada por NIK, en células 293. Células 293 que albergan el gen informador de luciferasa controlado por el promotor tat inducible por NF- κ B, fueron transfectadas con NIK para inducir la activación de NF- κ B en presencia de YopP ectópica. La expresión de luciferasa aumentó cuando la NF- κ B es inducida o bien por tratamiento de las células con TNF o por sobreexpresión de NIK, En presencia de YopP la inducción de NF- κ B fue inhibida independientemente del agente utilizado para la activación. La Fig. 5C muestra (de izquierda a derecha) lisados de células transfectadas con un vector que codifica NIK solo, células transfectadas conjuntamente con vectores que codifican NIK e YopP o células transfectadas con vector vacío, que habían sido sometidas a análisis de transferencia Western y se detectaron metabolitos intactos p100 ó p52 con anticuerpo anti-p52. La Fig. 5C muestra que la YopP no inhibe la activación de NF- κ B mediada por NIK a través del camino alternativo.

- 55 Las Figs. 6A-6B muestran la expresión y actividad de TBP-YopP en células eucarióticas. La Fig. 6A muestra la inhibición de la activación de NF- κ B inducida por TNF en células eucarióticas que expresan transitoriamente TBP-YopP. La capacidad de TBP-YopP para inhibir la activación de NF- κ B mediada por TNF fue explorada en células 293 transfectadas con un vector informador que expresa luciferasa controlado por un promotor que depende de

NF- κ B (promotor tat). Además del plásmido informador, las células 293 fueron transfectadas conjuntamente o bien con un vector de expresión que codifica TBP-YopP, YopP o bien vector vacío (pEF6A). Los resultados indican que ambas proteínas, la TBP-YopP quimérica y la YopP, inhibían por igual la expresión de NF- κ B y la expresión de luciferasa. La Fig. 6B muestra la proteína TBP-YopP expresada en células eucarióticas. Células 293 fueron transfectadas con un vector de expresión que codifica TBP-YopP, YopP ó vector vacío. Después de la transfección las células fueron lisadas y 25 μ l de lisado (o aproximadamente 100 ng de proteína) fueron cargados en cada calle de un ensayo de SDS-PAGE. Las calles 2, 3 y 4,5 y 6,7 (de izquierda a derecha) indican muestras duplicadas de células transfectadas con el vector solo (vector pEF6A), con vector que codifica TBP-YopP y vector que codifica YopP, respectivamente. Las proteínas resueltas en el ensayo de SDS-PAGE fueron sometidas a análisis de transferencia Western y la detección de las proteínas recombinantes fue llevada a cabo con anticuerpos específicos de v5 y TBP-1 humana. La Fig. 6B muestra que las proteínas TBP-YopP e YopP emigran con pesos moleculares aparentes de, aproximadamente, 63 kDa y 37,2 kDa, respectivamente.

Las Figs. 7A-7C muestran la proteína TBP-YopP expresada en células bacterianas de *E. coli*. Células de *E. coli* fueron transformadas con el vector de expresión pET-5 que codifica TBP-YopP, o el vector pET-5 que codifica otra proteína quimérica que comprende TBP-1 y un fragmento de la exotoxina de *Pseudomonas* que incluye el dominio catalítico y el dominio de translocación (TBP-PE38 descrito en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/582827 presentada el 28 de Junio de 2004). Después de la transformación e inducción del isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), *E. coli* que alberga pTBP-YopP fue sometido a lisis y el lisado se fraccionó en proteínas solubles y cuerpos de inclusión (IB) insolubles. Muestras de los cuerpos de inclusión disueltas en urea 8M, o lisado total (sin fraccionar) fueron cargadas en SDS-PAGE en una concentración de 30 μ g por calle y resueltos. Las proteínas en los geles fueron sometidas a tinción con azul de coomassie. Diferentes lotes de TBP-YopP se muestran en las Figs. 7A y B.. La Fig. 7C expone los mismos lisados de la Fig. 7B, pero sometidos a transferencia Western (se cargó 1 μ g de proteína por calle) y analizados utilizando anti-TBP-1 policlonal, de conejo, para detectar la proteína quimérica. La figura muestra que la proteína quimérica TBP-YopP se encuentra en los cuerpos de inclusión y que emigra sobre SDS-PAGE con un peso molecular aparente de 63 kDa, aproximadamente. Las flechas indican la posición que corresponde a TBP-YopP. Total- lisado total de *E. coli*; IB- cuerpos de inclusión, MW- patrones de peso molecular.

Las Figs. 8A-8B indican la actividad de unión de TNF de TBP-YopP producida en células bacterianas. La Fig. 8A muestra la actividad de unión de TNF de TBP-YopP replegada, cruda, y de TBP-PE38 comparada con la de una TBP-1 no quimérica purificada por HPLC. La unión a TNF de las proteínas TBP-YopP, TBP-PE38 ó TBP-1, fue determinada usando placas revestidas con TNF. La cantidad que se indica de proteínas quiméricas o TBP-1 replegadas se cargó en placas revestidas con TNF, y se detectó la unión a las placas mediante anticuerpo anti-TBP-1. Se indica que, por ejemplo, una cantidad de 500 ng de TBP-YopP replegada, cruda, es casi tan activa como 20 ng de TBP-PE38 ó 5 ng de TBP-1. La Fig. 8B muestra el % de proteína quimérica replegada, cruda, que posee actividad de unión de TNF. Por ejemplo, usando la actividad de TBP-1 como la actividad de unión de TNF de 100%, se encontró que el 0,7% y el 25% de TBP-YopP replegada y de TBP-PE38, respectivamente, tenía actividad de unión de TNF.

Las Figs. 9A-9B muestran la citotoxicidad de las proteínas quiméricas TBP en células semejantes a monocíticas activadas. El efecto citotóxico de TBP-YopP replegada (Fig. 9 A) y de TBP-PE38 (Fig. 9B) determinados sobre una línea celular activada que tiene características de células semejantes a monocíticas (THPI), fue evaluado en presencia o en ausencia TBP-1 en competencia. Las concentraciones particulares de TBP-YopP y de TBP-PE38 ensayadas, toman en consideración que la proteína TBP-PE38 expone aproximadamente 36 veces más actividad de unión de TNF que la TBP-YopP (véase la Fig. 8B). Se ha encontrado que solamente la TBP-YopP tenía efecto citotóxico sobre las células THPI activadas y que tal efecto citotóxico era específico dado que éste era inhibido por competición con TBP-1. La TBP-1 competidora se aplicó en un exceso de 100 veces inmediatamente antes de la proteína quimérica. TBP-PE38 (1) y (2) son dos lotes diferentes de TBP-PE38 replegada.

Las Figs 10A-10B exponen la citotoxicidad de proteínas quiméricas TBP en células epiteliales. El efecto citotóxico de TBP-YopP (Fig. 10 A) o de TBP-PE38 (Fig. 10B) fue determinado en un modelo de células epiteliales HeLaM9, una línea celular producida para sobreexpresar el TNF superficial (Pocsik et al., 1995), en presencia o ausencia de TBP-1 en competencia. Las concentraciones particulares de TBP-YopP y de TBP-PE38 ensayadas toman en cuenta que la TBP-PE38 pone de manifiesto una actividad de unión de TNF aproximadamente 36 veces mayor que la de TBP-YopP (véase la Fig. 8B). Se descubrió que solamente la TBP-PE38 tiene efecto citotóxico sobre la línea de células epiteliales y que tal efecto citotóxico era específico dado que éste era inhibido por competición con TBP-1. TBP-PE38 (1) y (2) son dos lotes diferentes de TBP-PE38 replegada.

Las Figs. 11A-11C muestran la inhibición mediada por TBP-YopP de la fosforilación de p38 inducida por activación de células HeLaM9 privadas de alimento, con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10% (HFcs). La Fig. 11 A ilustra una representación esquemática del experimento. Células HeLaM9 fueron privadas de alimento durante 17-18 horas. Luego, se añadió TBP-YopP replegada en concentraciones de 10 μ g/ml durante 2 horas y las células fueron lisadas. Se añadió HFcs al 10% en diferentes puntos de tiempo: 5, 10, 30 y 60 minutos antes de realizar la lisis celular, como indican las flechas del esquema. Después de activación en presencia o ausencia de TBP-YopP, las células fueron lisadas y los lisados celulares fueron sometidos a análisis de transferencia Western utilizando

anticuerpo policlonal, específico de pP38 para realizar la detección de p38 fosforilado (pP38). Para normalizar la proteína cargada en el gel, las mismas transferencias fueron detectadas con anti IKK- α . Las Figs. 11B y C muestran los resultados de dos experimentos en los que fueron tratadas células como se indica en la Fig. 1 A o en el que TBP-YopP fue reemplazado por el disolvente (tampón de fosfato). Se puso de manifiesto que la fosforilación del P38 aumenta por la adición de suero y que tal fosforilación pP38 mediada por suero disminuye en presencia de TBP-YopP. – células privadas de alimento sin tratar, y 5', 10', 30' y 60', activación de células durante 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos con HFcs al 10%, respectivamente.

Las Figs.12A-12B muestran el efecto de la proteína quimérica de TBP sobre células primarias de macrófago activadas. El efecto citotóxico de las concentraciones indicadas de TBP-YopP (Fig. 12A) o TBP-PE38 (Fig. 12B) fue determinado en células primarias de macrófago activadas, en presencia o ausencia de TBP-1 en competencia. Se añadió TBP-1 humana recombinante en exceso de 100 veces inmediatamente antes de la proteína quimérica. Los macrófagos primarios fueron activados por tratamiento con LPS 0111-B4 de *E. coli* en las concentraciones indicadas. Las concentraciones particulares de TBP-YopP y de TBP-PE38 ensayadas, tienen en cuenta que la TBP-PE38 pone de manifiesto una actividad de unión de TNF aproximadamente 36 veces mayor que la de TBP-YopP (véase la Fig. 8B). Se ha descubierto que ninguna de las proteínas quiméricas tenía efecto citotóxico sobre los macrófagos primarios activados.

Las Figs. 13A-13B ponen de manifiesto el efecto de TBP-YopP y de TBP-PE38 sobre la secreción de TNF por macrófagos primarios activados. El experimento se llevó a cabo según se describe en el Ejemplo 5. El TNF secretado en el medio de cultivo macrófagos primarios activados con LPS, en presencia o ausencia de las proteínas quiméricas, fue monitorizado en un ensayo biológico utilizando la línea celular L929 sensible al TNF (clon L929 de tejido conjuntivo murino, ATCC Número CCL-1). Se recogió el medio de cultivo, se diluyó dos, cuatro y ocho veces con medio de reciente aportación, se aplicó a las células L929, y se monitorizó la muerte de las células dependiente de TNF. Se encontró que la secreción de TNF por macrófagos activados era inhibida por la proteína TBP-YopP pero no por la TBP- PE38 (Fig. 13B).

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de un agente de dirección hacia células específicas y la secuencia de aminoácidos de una proteína externa de Yersinia, P, (YopP) conectadas por un polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica o de uno de sus fragmentos, desde el endosoma al citosol de la célula diana, en la que el agente de dirección hacia células específicas es la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF.

Según la invención, el agente de dirección hacia células específicas puede ser de un receptor de la familia de TNF/NGF. La presencia natural de formas solubles de receptores, ha sido descrita para casi todos los miembros de la familia TNF/NGF, que incluyen los dos receptores de TNF, CD27, CD30, Fas y otros. En una realización de la invención, la proteína quimérica comprende o bien una forma soluble natural o una forma soluble artificial de un receptor de la familia TNF/NGF. Puede utilizarse el dominio extracelular total de un receptor particular de la familia TNF/NGF o fragmentos, muteínas, proteínas de fusión u otro de sus derivados funcionales. En una realización de la invención, la proteína quimérica comprende la parte extracelular de los receptores de TNF; proteína de unión de TNF, 1 (TBP-1). En otra realización de la invención la proteína quimérica comprende TBP-2.

La proteína quimérica según la presente invención comprende una proteína externa de Yersinia tal como la YopP y, más preferiblemente, una YopP que posee actividad apoptótica reducida o que no posee esta actividad, tal como los serogrupos O:3, O:9 y O:8 de YopP mutados en el resto de Arginina-143, que se mostró que exhibían menos actividad apoptótica que la del serogrupo O:8 de YopP (Ruckdeschel et al., 2001).

Según la presente invención, el polipéptido que permite la translocación incluye cualquier polipéptido capaz de permitir el acceso de una proteína al citosol. Tales polipéptidos que permiten la translocación pueden derivarse de toxinas bacterianas, por ejemplo, toxina botulínica, toxina del ántrax, toxina diftérica, toxina ricínica y, preferiblemente, exotoxina de *Pseudomonas*. En una realización de la invención, se emplea para permitir la translocación, el polipéptido de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (véase la secuencia de DNA de la Fig.2, SEQ ID NO:2 y la secuencia de aminoácidos de la Fig. 3, SEQ ID NO: 3) que es deficiente en el dominio de la última hélice α (PEIItr).

La proteína quimérica de la invención puede incluir uno o más sitios de escisión de furina. En una realización de la presente invención, se encuentran presentes en la proteína quimérica dos sitios de escisión de furina diferentes, a saber, uno situado en el extremo N terminal del polipéptido de translocación y el otro situado en el extremo N-terminal de Yop y que proceden de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* y de toxina diftérica.

En una realización de la invención se desarrolla una proteína quimérica que consiste en TBP-1, el fragmento del dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* PEIItr, el sitio de escisión de furina DT e YopP (denominada TBP-YopP).

La presente invención proporciona TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma, capaces de unir TNF e inhibir la actividad de NF- κ B y/o de inhibir la liberación de TNF de una célula.

5 Se ha descubierto que la proteína quimérica según la presente invención, se une, penetra y actúa en células linfoides, por ejemplo, macrófagos y monocitos, y en células epiteliales. Se ha encontrado que la proteína TBP-YopP se une e induce citotoxicidad en una línea celular activada que tiene características de células monocíticas (THPI). Se encontró que la actividad monocítica de TBP-YopP era inducida específicamente a través del TNF superficial de las células THPI. Por el contrario, la proteína TBP-PE38, otra proteína quimérica (descrita en la solicitud provisional de patente de EE.UU. 60/582827 presentada el 28 de Junio de 2004) que consiste en TBP fusionada a los dominios de translocación y catalítico de exotoxina de Pseudomonas (PE38), no ocasionaba citotoxicidad de las células THPI activada. Se descubrió que la proteína TBP-PE38 era citotóxica para las células HeLaM9, una línea de células epiteliales que ha sido producida para sobreexpresar TNF superficial, mientras que la proteína TBP-YopP no era citotóxica para esta células.

10 La proteína quimérica según la presente invención es capaz de actuar sobre una célula particular en la que un ligando dado es expresado en exceso en la superficie de tal célula, y es capaz de “educar” a la célula para que exprese niveles inferiores o normales de tal ligando. Por ejemplo, en una realización de la invención, la proteína TBP-YopP tiene un efecto deseable y específico sobre macrófagos primarios activados; no induce citotoxicidad e inhibe la secreción de TNF

15 Tal como se emplea en esta memoria, el término “muteínas” se refiere a análogos de una proteína en los que uno o más de los restos de aminoácidos de los componentes naturales de la proteína están reemplazados por restos de aminoácidos diferentes, o han sido suprimidos, o uno o más restos de aminoácidos han sido añadidos a la secuencia original de la proteína, sin que cambie considerablemente la actividad de los productos que resultan en comparación con la de la proteína original. Estas muteínas se preparan mediante procedimientos de síntesis conocidos y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio, o por cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

20 Las muteínas según la presente invención, incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico tal como DNA o RNA, que se hibrida con DNA o RNA, que codifica la proteína, según la presente invención, en condiciones restrictivas. La expresión “condiciones restrictivas” alude a las condiciones de hibridación y de lavado que sigue, a las que se refieren convencionalmente como “restrictivas” los expertos en la técnica. Véase la publicación de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y. , párrafos 6.3 y 6.4 (1987, 1992), y la de Sambrook et al., (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)

25 Sin limitación, los ejemplos de condiciones restrictivas incluyen condiciones de lavado 12^o-20^oC por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio, en, por ejemplo, 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37^oC durante 30 – 60 minutos y después un 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68^oC durante 30 – 60 minutos. Los expertos en esta técnica comprenderán que las condiciones restrictivas dependen también de la longitud de las secuencias de DNA, de las sondas de los oligonucleótidos (tales como 10-40 bases) o de las sondas de oligonucleótidos mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase la referencia bibliografía anterior de Ausubel.

30 Una muteína tal posee, preferiblemente, una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de TBP-YopP. de modo que tiene una actividad sustancialmente similar, o incluso mejor, a la de la TBP-YopP.. Por ejemplo, una actividad característica de la proteína TBP-YopP es su capacidad de penetrar una célula específica y ocasionar citotoxicidad y/o inhibir la liberación de TNF y/o la señalización de MAPK. Ensayos para medir la citotoxicidad, la secreción de TNF y la fosforilación de p38, se describen en los ejemplos que figuran más adelante.

35 En tanto en cuanto la muteína sea capaz de tener una actividad citotóxica sustancial en células THPI activadas y/o de inhibir la liberación de TNF en células de macrófagos primarios activadas, y/o de inhibir la fosforilación de pP38 en células HeLaM9, puede considerarse que poseen una actividad sustancialmente similar a la de TBP-YopP. Por tanto, puede determinarse si una muteína dada posee, al menos sustancialmente, la misma actividad que la proteína quimérica de la presente invención, mediante experimentación rutinaria como se indica para la proteína TBP-YopP en los ejemplos que figuran más adelante.

40 En una realización preferida, una muteína tal posee una identidad o una homología de 40% al menos, con la secuencia de aminoácidos de TBP-YopP. Más preferiblemente, posee una identidad o una homología con ella de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferible, al menos 90%.

45 La identidad refleja la relación existente entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada por comparación de las secuencias. En general, identidad se refiere a una correspondencia exacta, nucleótido a nucleótido, o aminoácido a aminoácido, de las dos secuencias de polinucleótidos o de los dos polipéptidos, respectivamente, en toda la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.

Para secuencias en que no hay una correspondencia exacta, puede determinarse una "identidad en tanto por ciento". En general, las dos secuencias que han de ser comparadas se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "mellas" en una o en ambas secuencias, para intensificar el grado de alineación. Una identidad en tanto por ciento puede determinarse sobre la longitud total de cada una de las secuencias que están siendo comparadas (lo que se denomina alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma longitud o de longitudes muy similares, o sobre longitudes definidas, más cortas (lo que se denomina alineación local), que es más adecuada para secuencias de distinta longitud..

Son bien conocidos en la técnica métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias. Así, por ejemplo, pueden utilizarse programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devereux, J. et al., 1984, Nucleic Acids Res. 11 de Enero de 1984; 12(1 Pt 1):387-95), por ejemplo, pueden emplearse los programas BESTFIT y GAP para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. El programa BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (J. Theor. Biol. 21 de Julio de 1981; 91(2):379.80, y J. Mol. Biol., 25 de Marzo de 1981; 147(1):195-7, 1981) y encuentra la mejor región única de semejanza entre dos secuencias. Se conocen en la técnica otros programas existentes para determinar la identidad y/o semejanza entre secuencias, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul, S.F. et al., 1990 J. Mol. Biol. 5 de Octubre de 1990; 215(3):403-10, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Julio de 1990; 87(14):5509-13, Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res. 1 de Septiembre de 1997; 25(17):3389-402, a que se puede acceder a través de la página del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov y FASTA (Pearson, W.R, Methods Enzymol, 1990; 183:63-98. Pearson J. Mol. Biol. 13 de Febrero de 1998; 276(1):71-84.

Las muteínas de TBP-YopP, que pueden utilizarse según la presente invención, o el ácido nucleico que las codifica, incluyen un conjunto finito de secuencias que se corresponden sustancialmente como polinucleótidos o péptidos de sustitución que pueden ser obtenidos rutinariamente por un experto de habilidad ordinaria en la técnica, sin experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y pautas presentadas en esta Memoria.

Los cambios preferidos para las muteínas según la presente invención, son los conocidos como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de la proteína TBP-YopP pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que posea propiedades físico-químicas suficientemente similares a las de sustitución entre miembros del grupo que puedan preservar la función biológica de la molécula (Grantham Science, 6 de Septiembre de 1974; 185 (4154):862-4). Está claro que pueden llevarse a cabo inserciones y supresiones de aminoácidos en las secuencias antes definidas sin alterar su función, en particular si las inserciones o supresiones implican solamente pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no separan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, restos de cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas por tales supresiones y/o inserciones, están comprendidas dentro del alcance de la presente invención

Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en las proteínas que pueden ser usadas para obtener muteínas de TBP-YopP, de uso en la presente invención, incluyen cualesquiera etapas de métodos conocidas, tales como las presentadas en las patentes de EE.UU. Nos. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 otorgadas a Mark et al; 5.116.943 a Koths et al.; 4.965.195 a Namen et al.; 4.879.111 a Chong et al.; y 5.017.691 a Lee et al., y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. No. 4.904.584 (Shaw et al.).

La expresión "derivados funcionales" tal como se usa en esta memoria, cubre derivados de TBP-YopP, y sus muteínas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que se presentan como cadenas laterales sobre los restos, o son adiciones a los grupos de los extremos N-terminal o C-terminal, por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención en tanto en cuanto permanezcan aceptables desde el punto de vista farmacéutico, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que sea sustancialmente similar a la actividad de TBP-YopP.

Esos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y ampliar la permanencia de TBP-YopP en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo obtenidas por reacción con amoniaco o con aminos primarias o secundarias, derivados N-acilados de grupos amino libres de los restos de aminoácidos, formados con restos acilo (por ejemplo grupos alcanilo o aroilo carboxílicos) o derivados acilados en el O de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Una "fracción activa" según la presente invención, puede ser, por ejemplo, un fragmento de TBP-YopP. El término "fragmento" se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto, que retiene la actividad biológica deseada de TBP-YopP. Pueden prepararse fácilmente fragmentos separando aminoácidos desde cualquiera de los dos extremos de TBP-YopP y ensayando el fragmento que resulta para verificar sus propiedades citotóxicas en células THPI activadas, y/o el efecto inhibitorio de liberación de TNF de células de macrófagos primarios activadas, y/o la inhibición de la fosforilación de p38 en células HeLaM9. Se conocen proteasas para separar un aminoácido cada vez desde cualquiera de los dos extremos, N-terminal o C-terminal, de un polipéptido y, por tanto, la determinación de fragmentos que retienen la actividad biológica deseada implica solamente experimentación rutinaria.

- 5 Como fracciones activas de TBP-YopP, sus muteínas y proteínas fusionadas, la presente invención cubre, además, cualesquiera fragmentos o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína, aislados o junto con moléculas o restos asociados ligados a ella, por ejemplo restos de azúcares o de fosfatos, o agregados de la molécula de proteína o los restos de azúcares por si mismos, con tal que dicha fracción posea una actividad sustancialmente similar a la de TBP-YopP.
- 10 El término "sales" se refiere en esta memoria tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de TNP-YopP. Las sales de un grupo carboxilo pueden ser formadas por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y semejantes, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas, por ejemplo trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y semejantes. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, el ácido acético o el ácido oxálico. Como es natural, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica de TBP-YopP.
- 15 La expresión "derivados funcionales" comprende también multímeros obtenidos de TBP-YopP en que han sido introducidos cambios en la secuencia de los aminoácidos que constituyen la TBP-YopP, por cualquier método convencional. Estos cambios pueden comprender el alargamiento o truncación de la molécula TBP-YopP o la supresión o el reemplazo de uno o más aminoácidos de la TBP-YopP. Ha de entenderse que ninguno de los cambios anteriores ha de afectar a las propiedades de la proteína quimérica.
- 20 El procedimiento operatorio seguido para fijar el agente de dirección hacia células específicas, al polipéptido que permite la translocación, y a la Yop, puede variar. En una realización, el agente de dirección hacia células específicas es fusionado al polipéptido que permite la translocación y a la Yop, por medios recombinantes. Los genes que codifican las dos proteínas y el polipéptido pueden ser aislados como cDNA o en forma genómica mediante cualquier procedimiento operatorio de clonación conocido por los expertos en la técnica. Las proteínas y el polipéptido pueden ligarse también químicamente. El ligamiento químico puede llevarse a cabo utilizando moléculas de engarce bifuncionales tales como la que pueden obtenerse de Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (por ejemplo BS3 (Suberato de bis[sulfosuccinimidilo])).
- 25 La fusión por medios recombinantes entre el agente de dirección hacia células específicas, el polipéptido que permite la translocación y la Yop, puede ser directa o a través de una molécula de enlace y/o un espaciador que puede ser cualquier tipo de engarce, por ejemplo, un aminoácido, un péptido o un polipéptido, un grupo sulfhidrilo, un polímero, etc. La molécula de enlace puede ser una molécula que puede romperse después de la localización o internalización de la proteína quimérica.
- 30 La generación de la proteína quimérica de la presente invención empleando la metodología de DNA recombinante, lleva consigo, en general, crear una secuencia de DNA que codifique la proteína quimérica, colocar el DNA en una casete de expresión, presente habitualmente en un vector de expresión, bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un hospedador, aislar la proteína expresada y, si se requiere, renaturalizar la proteína
- 35 La presente invención proporciona una secuencia de DNA que codifica la proteína quimérica de la invención y un vector de expresión que comprende dicho DNA. El DNA según la invención puede codificar, además, un péptido señal para la secreción en células eucarióticas de la proteína quimérica producida. Un vector de expresión preferido para producción en células eucarióticas, comprende el DNA que codifica la proteína quimérica de la invención ligado funcionalmente a un promotor que posee una actividad que es independiente de la de NF- κ B, por ejemplo el promotor EF-1 α .
- 40 Además, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un DNA que codifica la proteína quimérica de la invención. Son ejemplos de células huésped, células eucarióticas tales como HeLa, CHO, 293T, células de levadura y células de insectos, y células procarióticas tales como E. coli. Preferiblemente, la célula huésped es resistente al efecto citocida de Yop, tal como la HeLa M9 (véase el Ejemplo que sigue).
- 45 Según la presente invención, se proporciona un método producir una proteína quimérica conforme a la invención, que comprende cultivar el hospedador de la invención, y aislar la proteína quimérica producida.
- 50 Una vez expresada, la proteína quimérica recombinante de la invención puede ser purificada según procedimientos operatorios estándar de la técnica; por ejemplo, la purificación puede incluir las etapas de precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y semejantes.
- Después de la expresión y la purificación, la quimera posee una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y luego hacer que el polipéptido se repliegue a la conformación preferida.
- 55 La desnaturalización se consigue exponiendo el material crudo que contiene la proteína recombinante, a una combinación de agentes caotrópicos (por ejemplo urea < o guanidina.HCl), un agente reductor y un pH alto. Estas condiciones ocasionan, habitualmente, la solubilización y la desnaturalización de proteínas en cuerpos de inclusión.

Por consiguiente, se obtiene una solución clara de proteínas. Las proteínas, en este estado, están completamente abiertas sin estructuras secundarias o terciarias. La etapa siguiente consiste en moderar las condiciones extremas de pH, y la concentración del agente reductor y del agente caotrópico, para permitir el plegamiento de la proteína. La aptitud de una proteína para plegarse a su estructura terciaria nativa, viene dictada por su estructura primaria, Por tanto, es suficiente, habitualmente, disminuir la concentración de los agentes reductor y caotrópico y reducir el pH. No obstante, con frecuencia se requiere una "sintonía" fina de las condiciones.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica de la invención. En una realización de la invención, la proteína quimérica es la TBP-YopP o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las composiciones para la administración parenteral comprenden, comúnmente, una disolución del anticuerpo o uno de sus cócteles disuelto en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede usarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, etc.

Puede realizarse una sola administración o múltiples administraciones de las composiciones dependiendo de la dosis y de la frecuencia requerida y tolerada por el paciente. La concentración de la molécula quimérica en estas formulaciones será diseñada, por tanto, para distribuir en el cuerpo una cantidad de moléculas suficiente para obtener un efecto terapéutico. En el caso de enfermedades autoinmunitarias, la composición será diseñada para distribuir una cantidad de la quimera suficiente para afectar al curso y gravedad de la enfermedad autoinmunitaria y para mejorar el estado del paciente, lo que lleva a una reducción o remisión de la enfermedad. La cantidad efectiva dependerá de la vía de administración, de la enfermedad que ha de tratarse y del estado del paciente.

Entre los diversos usos de la proteína quimérica de la presente invención, se incluyen el tratamiento o prevención de enfermedades o condiciones causadas por células humanas particulares. Por ejemplo, células particulares en las que un ligando dado es expresado en exceso. La proteína quimérica puede ser administrada para matar o para "educar" a la célula para que exprese niveles inferiores o normales del ligando.

Se describe en esta memoria el uso de la proteína quimérica de la invención, preferiblemente TBP-YopP, o de una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional o fragmento de la misma, para fabricar un medicamento para tratar una enfermedad, en la que la actividad de un ligando del receptor de TNF/NGF está implicada en la patogénesis o en el curso de la enfermedad.

En una realización de la invención, la proteína quimérica se usa para tratar una enfermedad en la que el TNF desempeña un papel patogénico tal como enfermedades agudas, por ejemplo el choque séptico, la enfermedad de injerto frente al huésped (GVHD) y la malaria, así como también enfermedades crónicas tales como GVHD crónica, artritis reumatoide, diabetes juvenil, las enfermedades intestinales inflamatorias y la psoriasis. Otra aplicación preferida es para el tratamiento del cáncer, causado por células malignas que expresan el ligando al que se une la proteína quimérica. Las proteínas quiméricas pueden utilizarse también in vitro, por ejemplo para la eliminación de células perjudiciales desde médula ósea antes de realizar un trasplante

En otra realización de la invención, la proteína quimérica se utiliza para el tratamiento de una enfermedad en la que células linfoides activadas tales como macrófagos o monocitos, están involucradas en la patogénesis o en el curso de la enfermedad, por ejemplo, choque séptico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de injerto contra huésped y la anemia de células falciformes.

También se describe en esta memoria el uso de la proteína quimérica para el tratamiento de una enfermedad en la que la activación de NF- κ B está implicada en la patogénesis o en el curso de la enfermedad y, preferiblemente, en la que es inducida NF- κ B mediante el camino canónico.

Habiendo descrito ahora la invención, será comprendida más fácilmente por referencia a los ejemplos que siguen que se proporcionan a título de ilustración y que no están destinados a limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de un gen quimérico que comprende la parte extracelular del receptor de TNF p55 (TBP-1), el dominio de translocación truncado de la exotoxina II de Pseudomonas (PEIItr), el sitio de escisión de furina de la toxina diftérica (DT) y la proteína YopP de Yersinia (a lo que se alude en esta memoria como TBP-YopP).

Con objeto de preparar el gen quimérico de TBP-YopP (SEQ ID NO: 1, Fig, 1C), representado esquemáticamente en la Fig. 1A, cada uno de los fragmentos de DNA que codifica la forma soluble del receptor de TNF p55, el dominio de translocación truncado de la exotoxina II de Pseudomonas que carece de la última hélice α (F) (Fig. 2, SEQ ID NO: 2 y Fig. 3, SEQ ID NO: 3, secuencias de DNA y de aminoácidos, respectivamente), y el sitio de escisión de furina de la toxina diftérica fusionado a la YopP de la toxina, fueron preparados y amplificados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y ligados.

- 5 La secuencia de aminoácido de la forma soluble del receptor de TNF p55 (TNFRSF1A, Genbank ID M75866) corresponde a la de las especies principales de la forma solubles de este receptor (TBP-1) que había sido aislada de orina humana (Patente de EE.UU. No. 5.811.261) y se extiende desde Asp 41 a Asn 201 en el dominio extracelular del receptor (Swiss-Prot, número de registro: P19438). La forma soluble del receptor de TNF p55, TBP-1, fue aislada por amplificación por PCR(1) (con Taq polimerasa de alta fidelidad procedente de Boehringer, Mannheim) usado TNFRI de longitud total (plásmido pc55) como molde (plásmido pc55 descrito por Nophar et al., 1990) y los cebadores siguientes:

Cebador directo:

CATCATATGgatagtggtgtgcccccaagg (SEQ ID NO: 4)

- 10 Este cebador tiene el sitio de restricción de Nde I (necesitado más tarde para insertar el gen quimérico en el vector de expresión) seguido de 20 nucleótidos que se solapan con el extremo 5' de TBP-1 (la secuencia de codificación está indicada en letra bastardilla)

Cebador inverso

AGGAAGCTTtattctcaatctgggtaggcac (SEQ ID NO: 5)

- 15 Este cebador posee 22 nucleótidos que se solapan con el extremo 3' complementario de TBP-1, seguido de nucleótidos que codifican el sitio de restricción de HindIII (necesitado más tarde para ligar el DNA de TBP al DNA que codifica el PEIltr).

- 20 La secuencia de DNA (SEQ ID NO: 2) que codifica una secuencia polipeptídica que corresponde a los restos 278 a 384 (SEQ ID NO: 3) del gen de tipo A de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (número de registro K01397, NCBI Gene Bank), PEIltr, fue aislado por amplificación por PCR utilizando DNA genómico del serotipo 61 de *Pseudomonas aeruginosa* (Leitner G., Kimron Veterinary Institute, Israel) como molde, y los cebadores que siguen:

Cebador directo

AATTAAAGCTTccggaggtcccggggcggcagcctggccgcgtgaccgcg (SEQ ID NO: 6)

- 25 Este cebador posee nucleótidos que codifican el sitio de restricción de HindIII (necesitado para la ligación de PEIltr al DNA de TBP-1 amplificado anterior) seguido por 14 nucleótidos que codifican una secuencia de engarce, ccggaggtcccgg, y seguido por 17 nucleótidos que se solapan con extremo 5' del dominio II de PE, que corresponde a los nucleótidos 1577-1603 de la exotoxina A (número de registro: K01397).

Cebador inverso

GTGAATTCTTACCCGGGgtcgttgccggtgccctgccg (SEQ ID NO: 7).

- 30 Este cebador posee el sitio de restricción de SmaI y los nucleótidos 1894-1874 complementarios del DNA que codifica los restos de PE anteriores a 384 con inclusión del resto del aminoácido 384. Comprende los nucleótidos complementarios que codifican los restos de aminoácidos anteriores al 384 con inclusión del mismo, de PE (gtcgttgccggtgccctgccg), un codón de detención y los sitios de restricción de SmaI (cccggg) y de EcoRI (gaattc) (necesitados más tarde para la ligación al fragmento de DNA DT-YopP aislado que figura más adelante). El fragmento PEIltr (el producto de la PCR2) fue insertado en los sitios de HindIII/EcoRI del vector pET antes de la ligación a DT-YopP (producto de PCR 3 visto más adelante).

- 40 Una tercera (PCR 3) se llevó a cabo con objeto de preparar el DNA que codifica la YopP ligada en su extremo 5' con DNA que codifica el sitio de escisión de furina (RVRR) de la toxina diftérica (DT). Para la PCR 3, se usó como molde el DNA que codifica el efector de YopP, de *Yersinia enterocolitica*, serotipo 0:8, restos 1-864, (TrEMBL, número de registro Q93KQ5) y los cebadores que siguen:

Cebador directo

ATCCCGGGagagtgagaagaatgattggccaatatacaataaacagc (SEQ ID NO:

8)

- 45 Este cebador comprende la secuencia de nucleótidos de SmaI (necesitada más tarde para la ligación a TBP-1-PEIltr), seguida de 12 nucleótidos que codifican el sitio de escisión de furina (RVRR) de DT y 31 nucleótidos que se solapan con el extremo 5' del gen de YopP

Cebador inverso

CAGAATTC#atactttgagaagtgttttatattcagc (SEQ ID NO: 9)

Este cebador comprende 30 nucleótidos complementarios que se solapan con extremo 3' del gen de YopP y el sitio de restricción de EcoRI (necesitado después para la ligación a TBP-1-PEIltr)

5 Con objeto de obtener el fragmento PEIltr-DT-YopP, el fragmento de DNA anterior amplificado de DT-YopP (producto de la PCR 3), se sometió a digestión con SmaI y EcoRI seguida de ligación a PEIltr a través de los extremos compatibles.

10 Para obtener el fragmento quimérico TBP-PEIltr-DT-YopP flanqueado por los sitios de NdeI/EcoRI, se insertó TBP-1 (producto de la PCR 1) en el sitio de NdeI/HindIII de un vector basado en pET, que contenía PETIltr-DT-YopP. El vector que codifica el gen quimérico de TBP-PEIltr-DT-YopP, pTBP-YopP, fue transformado y amplificado en una cepa de *E. coli* (DH5 α) y purificado por métodos conocidos en la técnica.

Ejemplo 2. Verificación de la actividad de inhibición de NF- κ B, de la proteína TBP-YopP en células eucarióticas.

15 La proteína YopP inhibe NF- κ B, un factor de transcripción conocido como central en el comienzo de la inflamación. Los experimentos que siguen fueron llevados a cabo para ensayar, antes de la producción de la proteína en cuerpos de inclusión bacterianos y del repliegue de la proteína solubilizada, si la proteína quimérica TBP-YopP retiene la actividad inhibitoria de NF- κ B en células eucarióticas.

20 Inicialmente, con objeto de buscar un promotor apropiado para la expresión de YopP en células eucarióticas, se realizaron experimentos con un vector que comprendía YopP solamente. Para esta finalidad se insertó DNA de YopP en dos diferentes vectores eucarióticos, pcDNA3-HisA y pEF6-v5-HisA (Invitrogen). El pcDNA3-HisA y el pEF6-v5-HisA poseen promotores diferentes, CMV y EF-1 α , respectivamente. Estos vectores permiten la producción de proteínas marcadas. Para obtener la proteína YopP marcada, el codón de detención de YopP fue mutado por PCR para codificar valina. El marcado de YopP permite la detección de la YopP expresada, en un análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos de la marca.

25 YopP y GFP se expresaron en células 293 mediante transfección conjunta de vectores basados en pcDNA3 que codifican His-T7-YopP y el gen informador His-T7-GFP, ambos, bajo el control del promotor CMV. En paralelo, YopP-v5 y el gen informador β -galactosidasa-v5, fueron expresados en células 293 mediante transfección conjunta de vectores basados en pEF6 que codifican YopP-v5 y el gen informador de β -galactosidasa-v5, ambos, bajo el control del promotor EF1- α .

30 Como ilustra la Fig. 4B, la expresión de His-T7-YopP controlada por un promotor CMV era demasiado débil para ser visible por análisis de transferencia Western usando para la detección anticuerpo anti-T7. El promotor CMV contiene tres sitios de unión de NF- κ B fuertes (Fig. 4C). Así pues, presumiblemente, la expresión de una proteína controlada por el promotor CMV había sido inhibida por YopP, el potente inhibidor de NF- κ B.

35 Los resultados observados en la Fig. 4B muestran también que el aumento de las concentraciones del plásmido de YopP en las reacciones de transfección, desde 1 a 5 μ g, daba como resultado una disminución de la expresión de GFP, causada lo más probablemente también, por la inhibición del promotor CMV.

Por el contrario, se detecto fácilmente YopP cuando se expresó bajo el control del promotor EF-1 α (Fig. 4A) Asimismo, YopP no inhibía la expresión del gen informador, β -galactosidasa, expresada bajo el control del promotor EF-1 α (Fig. 4A).

40 Debido a que la actividad del promotor EF-1 α , a diferencia del promotor CMV, es independiente de la actividad de NF- κ B (Fig. 4C), la proteína YopP y la quimérica TBP-YopP eran expresadas eficazmente bajo el control del promotor EF-1 α

45 El experimento que sigue fue llevado a cabo para comprobar si la proteína YopP expresada bajo el control del promotor EF-1 α , inhibe la activación de NF- κ B en células eucarióticas. Con objeto de comprobar al actividad inhibitoria de NF- κ B de la proteína YopP, células 293 fueron transfectadas conjuntamente con un vector pEF6-v5-HisA que codifica YopP o con un vector pEF6-v5-HisA vacío, y un vector que codifica luciferasa bajo el control del promotor tat inducible de NF- κ B, y 48 horas después de la transfección, las células o bien fueron tratadas con TNF para inducir la activación de NF- κ B o bien permanecieron sin tratar; las células fueron lisadas y se midió la expresión de luciferasa (actividad).

50 Para inducir la activación de NF- κ B, 48 horas después de la transfección, células 293 fueron tratadas durante 6 horas con TNF- α humano recombinante, 50 ng/ml. Después de inducción con TNF- α las células fueron lavadas tres veces con PBS, lisadas sobre hielo en el seno de un tampón de lisis de triton/glicilglicina (triton X-100 al 1%, glicilglicina 25 mM, pH 7,8, MgSO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 1 mM), y los lisados fueron diluidos cuatro veces con

el tampón de ensayo (glicilglicina 25 mM, pH 7,8, MgSO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 1 mM, K₃PO₄, pH 7,8 (ó Na₂HPO₄). Para medir la actividad de luciferasa se añadieron ATP 2 mM y luciferina 200 μM.

5 Como indica la Fig. 5A, el tratamiento con TNF-α (y la activación de NF-κB) de células transfectadas con vector solamente (pEF6-v5-HisA) puso de manifiesto un aumento de más que 6.000 unidades de luciferasa en comparación con las de las células sin tratar. La inhibición de la expresión de luciferasa (y la inhibición de la activación de NF-κB) se observó cuando, en lugar del vector vacío, se empleó un vector que codificaba YopP (0,1 ó 5 μg).

10 Alternativamente, la activación de NF-κB puede ser inducida por sobreexpresión de NIK (número de registro principal de Swiss-Prot Q99558, Nombre: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14, Sinónimo: quinasa inductora de NF-kappa beta). La acción inhibitoria de NF-κB de la proteína YopP fue verificada también en la activación de NF-κB mediada por sobreexpresión de NIK. La Fig. 5B muestra que transfectando las células con un vector de expresión que codifica NIK (pNIK) se inducía la activación de NF-κB 48 horas después de la transfección y que la transfección conjunta de pNIK y del vector que codifica YopP, evitaba la activación de NF-κB.

15 Se exploró la posibilidad de que la inhibición por YopP de la activación de NF-κB mediada por NIK sea causada a través de la inhibición del camino alternativo de activación de NF-κB. Para esta finalidad se midieron cambios metabólicos que son específicos de la activación de NF-κB por el camino alternativo, que siguen a la activación de NF-κB inducida en presencia o ausencia de YopP. Por ejemplo, se comprobaron los cambios de degradación de p100 y la aparición de p52 después de la activación de NF-κB mediada por NIK, en presencia o ausencia de YopP ectópica añadida. Los resultados expuestos en la Fig. 5C indican que los niveles de p52 y de p100 no estaban afectados en presencia de YopP. Así pues, la inhibición por YopP de la activación de NF-κB mediada por NIK, parece ser causada por medio de la inhibición del camino canónico, solamente.

25 Basándose en los resultados anteriores, el promotor EF-1α fue elegido para controlar la expresión de la proteína quimérica TBP-YopP en células eucarióticas. Con objeto de ligar la inserción de TBP-YopP flanqueada por NdeI-EcoRI, en el sitio de clonación de BamHI/EcoRI del vector pEF6-v5-HisA, los sitios sobresalientes de NdeI y BamHI de la inserción y el vector, respectivamente, fueron llenados antes de la ligación. Después de la ligación el plásmido resultante fue denominado TBP-YopP/pEF6.

30 Con objeto de comprobar la actividad inhibitoria de NF-κB de la proteína TBP-YopP, células 293 fueron transfectadas conjuntamente o bien con vector vacío, TBP-YopP/pEF6, o bien con YopP-v5-His y con un vector informador que codifica luciferasa bajo el control del promotor tat inducible por NF-κB. Para inducir la activación de NF-κB, 48 horas después de ser transfectadas, las células fueron tratadas con TNF-α humano recombinante, 50 ng/ml, durante 6 horas. Después de la inducción con TNF-α las células fueron lavadas tres veces con PBS, lisadas sobre hielo en el seno de tampón de lisis de triton/glicilglicina (triton X-100 al 1%, glicilglicina 25 mM, pH 7,8, MgSO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 1 mM), y los lisados obtenidos fueron diluidos cuatro veces con el tampón de ensayo (glicilglicina 25 mM, pH 7,8, MgSO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, DTT 1 mM, K₃PO₄ 15 mM, pH 7,8 (ó Na₂HPO₄). Para medir la actividad de luciferasa se añadieron ATP 2 mM y luciferina 200 μM.

40 Los lisados de células transfectadas solamente con vector y tratadas con TNF-α pusieron de manifiesto un aumento de más de 80.000 unidades de luciferasa (es decir, activación de NF-κB) en comparación con los lisados de células sin tratar. La inhibición de la expresión de luciferasa (es decir, la inhibición de la activación de NF-κB) se observó cuando, en lugar del vector vacío, se usó un vector que codifica o bien YopP sola o bien la proteína quimérica TBP-YopP (Fig. 6 A) El análisis por transferencia Western de lisados procedentes de células transfectadas con TBP-YopP/pEF6 usando anticuerpo anti-v5 y anti-TBP-1, reveló que la proteína quimérica TBP-YopP de longitud total se había expresado en el citoplasma de células eucarióticas, con un peso molecular aparente de 63 kDa aproximadamente (Fig. 6B). La proteína quimérica no había sido escindida por furina o proteasas semejantes a furina, dado que al ser expresada desde un plásmido, la proteína quimérica no había entrado en el Golge ni en los endosomas, los orgánulos en que actúan las furina y las proteínas semejantes a furina.

45 Los resultados obtenidos indican que, una vez en la célula eucariótica, la proteína quimérica TBP-YopP es capaz de inhibir la actividad de NF-κB tan eficazmente como la proteína YopP sola.

Ejemplo 3. Producción de TBP-YopP en células bacterianas.

50 Después de verificar que la proteína TBP-YopP es activa en células eucarióticas (véase el Ejemplo anterior), la proteína quimérica fue producida en células bacterianas del modo siguiente:

55 Células BL-21/pLysS (DE3) competentes fueron transformadas con el vector que contenía TBP-YopP (pTBP-YopP, véase el Ejemplo 1) , sembradas en placas de agar 2YT que contenía ampicilina, e incubadas durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 30°C. Los transformantes de las células fueron recogidos desde las placas de agar y suspendidos en 5 ml de 2YT por placa. Las células bacterianas recogidas fueron cultivadas en 3 litros de 2YT con carbenicilina, 200 μg/ml, e incubadas a 30°C hasta que la D.O.₆₀₀ del cultivo celular era 0,6. Después, las células fueron transferidas a 20°C y tratadas con isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM, para inducir la expresión

de la proteína recombinante. Se añadió a las células rifampicina, 200 µg/ml, (solución de reserva de 100 mg/ml en el seno de DMSO), 45 minutos después de la adición de IPTG. Se dejó crecer el cultivo celular a 20°C durante 5 horas, se recogió por centrifugación (6000 rpm, 10 minutos, 4°C), y el glóbulo de células obtenido se mantuvo congelado a -70°C.

- 5 Con objeto de preparar lisados de células, el glóbulo de células congelado se descongeló sobre hielo y se volvió a suspender en 100 ml de tampón A [solución salina tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio ("PBS w/o"), EDTA 50 mM, MgSO₄ 5 mM, cuatro tabletas de cóctel de proteasas completo (Roche), DNaseI, 30 mg/l (Sigma)]. Para romper los aglomerados de células, la suspensión bacteriana se sometió a sonicación sobre hielo. Se obtuvo lisis bacteriana total mediante el método que sigue: 3x35 ml de células se sometió a presión French a 34.500 kPa y luego
10 dos veces a 103.400 kPa. Después, las células lisadas fueron centrifugadas a 15.000 rpm a 4°C, 50 minutos (27000xg) en una centrífuga Sorval, empleando el rotor SS-34. El glóbulo obtenido se volvió a suspender en 40 ml de "PBS w/o", que contenía EDTA 20 mM y triton X-100 al 3%, y se sometió a sonicación sobre hielo para volver a suspender los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión que se habían liberado desde las células lisadas,
15 fueron precipitados mediante ultracentrifugación a 27.000xg a 4°C durante 50 minutos. Los cuerpos de inclusión fueron lavados con 40 ml de PBS que contenía EDTA 20 mM y triton, dos veces más, y con 40 ml de PBS que contenía EDTA 20 mM, en ausencia de triton, tres veces.

- 20 Los cuerpos de inclusión, que contenían la mayor parte de la proteína recombinante (determinado mediante SDS-PAGE, Fig. 7A) fueron disueltos en solución de desnaturalización que comprendía urea 8M, que contenía 2-mercaptoetanol 5 mM titulado a pH 12-12,8. El volumen de la solución de desnaturalización que se utilizó era igual a 443 veces el peso húmedo del cuerpo de inclusión. Para favorecer la disolución completa de los cuerpos de inclusión, la solución fue agitada vigorosamente con formación de vórtice y sometida a sonicación sobre hielo.

La proteína fue naturalizada de nuevo por dilución 10 veces con tampón de borato 50 mM, pH 9,5, e incubación durante 18-20 horas a 4°C con agitación suave (200 rpm).

- 25 2,5 litros de proteína replegada fueron concentrados 15 veces por ultracentrifugación a través de un ultrafiltro PM30 (Amicon), y el volumen final de la proteína concentrada fue 170 ml, aproximadamente. Se estimó mediante reactivo de Bradford (Sigma) que la concentración proteínica de la proteína cruda replegada era 100 µg/ml, aproximadamente. Se estimó que la proteína de fusión TBP-YopP constituía, aproximadamente, el 10% de la proteína cruda replegada (estimado por densitometría de la banda de proteína obtenida en SDS-PAGE). Por tanto, a partir de 3 litros de cultivo bacteriano se obtuvo aproximadamente 1,7 mg de proteína química TBP-YopP, o
30 partiendo de 500 mg de cuerpos de inclusión, 17 mg de proteína cruda total, de los que cerca del 1% (aproximadamente 170 ng) era proteína química TBP-YopP activa (véase el Ejemplo 4 que figura a continuación).

Los resultados obtenidos indican que la proteína química TBP-YopP producida en cuerpos de inclusión bacterianos, puede ser replegada y que tenía el tamaño correcto de 63 kDa (Fig. 7)

Ejemplo 4. Unión de la proteína química TBP-YopP a TNF.

- 35 Se llevó a cabo el experimento que sigue para determinar si la proteína TBP-YopP replegada, producida en células bacterianas (véase el Ejemplo 3), retiene la actividad de unión a TNF.

- 40 La unión de TBP-YopP a TNF se verificó empleando placas revestidas con TNF. La unión de TBP-YopP a TNF se comparó con la unión a TNF de la proteína TBP-1 humana recombinante, no química, (de origen CHO, purificada por HPLC), y con la unión a TNF de la proteína TBP-PE38, otra proteína química que comprende TBP-1 fusionada con el dominio de translocación y catalítico de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (descrito en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/582827, presentada el 28 de Junio de 2004) (Fig. 8).

- 45 Placas de microtitulación de 96 pocillos fueron revestidas con TNF por incubación de las placas con una solución de TNF purificado, 2 mg/ml, en el seno de Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6, que contenía NaN₃ al 0,02%, durante 16 horas, a 4°C, Después de incubar, los pocillos fueron enjuagados luego con PBS e incubados entonces durante 3 horas a 37°C, con PBS, 0,2 ml/pocillo, que contenía BSA al 3%, NaN₃ al 0,02% (solución de bloqueo). Muestras de 50 µl de TBP-YopP, TBP-1 ó TBP-PE38 fueron aplicadas a cada pocillo, conteniendo la cantidad de proteína indicada en la Fig. 8A (por triplicado) y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C. Cuando fue necesario, las muestras fueron diluidas con solución de bloqueo. Al cabo de 1 horas de incubación, las placas fueron lavadas tres veces con solución de bloqueo. Se añadió a los pocillos 50 µl de anticuerpo de conejo anti-TBP-1, diluido 1:1000 en solución de
50 bloqueo, se incubó durante una hora a 37°C, o durante la noche a 4°C, y se lavó tres veces con solución de bloqueo. Se añadió a los pocillos 50 µl de anticuerpo secundario, HRP-anti-conejo, diluido 1:1000, se incubó durante una hora a 37°C y se lavó tres veces con solución de bloqueo. Se añadió 100 µl de solución de ABTS recién preparada que contenía H₂O₂ al 0,01%, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La presencia de la proteína TBP o de la TBP química se detectó mediante la aparición de un color verde cuya intensidad se midió a 405 nm.

- 55 En el ensayo de unión a TNF resumidos en la Fig. 8, tomando como 100% la actividad de unión a TNF de la proteína TBP-1 purificada por HPLC (Fig. 8B), se encontró que la capacidad de unión a TNF-α de la proteína TBP-YopP replegada, cruda, era 0,5-1%, aproximadamente (Fig. 8B) Teniendo en cuenta que la TBP-YopP replegada

constituye solamente el 5-10% de la proteína total de los cuerpos de inclusión (véanse el Ejemplo anterior y la Fig. 7), los inventores llegaron a la conclusión de que, por lo menos, el 10% de la proteína está replegada apropiadamente. Por tanto, se descubrió que la eficacia de replegadura de la proteína TBP-YopP era similar a la
 5 eficacia de replegadura de la proteína TBP-PE38, cercana al 10% (Solicitud de patente provisional de EE.UU. No. 60/582827, presentada el 28 de Junio de 2004). La diferencia principal era que la proteína TBP-PE38 replegada representaba más del 30% de la proteína cruda de los cuerpos de inclusión.

Los resultados obtenidos indican que la proteína quimérica TBP-YopP producida en células bacterianas estaba correctamente replegada y era capaz de unirse a TNF.

Ejemplo 5. Actividad de TBP-YopP replegada, *in situ*

10 Durante la infección por *Yersinia*, la proteína YopP es inyectada en las células. Se sabe que, una vez en el interior de las células, la YopP suprime la liberación del TNF- α e induce apoptosis en los macrófagos infectados (Cornelis, G.R., *Nature*, 2001). Los experimentos que siguen fueron diseñados para comprobar la citotoxicidad de TBP-YopP en comparación con la de otra proteína quimérica, la TBP-PE38, que comprende TBP-1 fusionada al dominio de translocación y catalítico de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (descrito en la solicitud de patente provisional
 15 de EE.UU. No. 60/582827 presentada el 28 de Junio de 2004), en 3 tipos diferentes de células: línea de células THPI monocíticas humanas, activadas con LPS, línea de células HeLaM9 epiteliales humanas que sobreexpresan el TNF- α superficial, y macrófagos primarios del ratón activados con LPS. Para ensayar la especificidad, se aplicó a algunos pocillos TBP-1 recombinante humana, no quimérica, inmediatamente antes de la proteína quimérica, para competir con la unión a TNF.

20 Con objeto de explorar la citotoxicidad de las proteínas quiméricas en una línea celular semejante a los macrófagos, células THPI (Ejemplo 7) fueron sembradas en una densidad de 200.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en el seno de medio RPMI libre de Fcs, que contenía insulina, 1 mkg/ml, transferrina, 1 μ g/ml, selenita sódica, 1 ng/ml, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, glutamina con PMA 50 – 100 ng/ml, durante 16 horas (para inducir el fenotipo semejante al de macrófagos y exponer el receptor de LPS). Luego se añadió LPS de *E. coli* (O111-
 25 B4) en una concentración de 1 μ g/ml (para inducir la expresión de TNF) junto con GM6001) (un inhibidor de metaloproteinasas para evitar que el TNF se degradara desde la superficie de las células) en una concentración de 10 μ g/ml durante 1-1,5 horas. Las células THPI tratadas con PMA-LPS-GM6001 que resultaron pusieron de manifiesto el fenotipo característico de las células de macrófagos que poseen una gran cantidad de TNF en su superficie. Estas líneas celulares, semejantes a las de los macrófagos, fueron incubadas durante 20 horas aproximadamente, con concentraciones diversas de TBP-YopP replegada o TBP-PE38 replegada, y sometidas a tinción con rojo neutro para estimar la supervivencia. Cuando se indicó, se añadió TBP-1 recombinante humana inmediatamente antes que la proteína quimérica replegada para competir con el TNF de la superficie celular. Como muestra la Fig. 9A, la proteína quimérica TBP-YopP ocasiona la muerte celular del 50-75% de las células THPI activadas, en concentraciones de 25 y 50 μ g/ml. Teniendo en cuenta que la proteína TBP-YopP activa constituye
 35 solamente cerca del 1% de la proteína cruda replegada (Fig. 8B), los inventores han estimado que las concentraciones efectivas de TBP-YopP eran tan bajas como de 0,25 μ g/ml. Se encontró que la proteína TBP-1 protegía completamente las células de la toxicidad de TBP-YopP cuando se aplicaba con un exceso de 100 veces, lo que indica que el efecto citotóxico de la TBP-YopP es inducido específicamente a través del TNF de la superficie de células THPI activadas.

40 Por el contrario, se encontró que la otra proteína quimérica, TBP-PE38, no causaba la muerte celular de las células THPI activadas (Fig. 9B).

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína TBP-YopP se une específicamente a la superficie de la línea de células semejantes a monocíticas, penetra en las células y causa muerte celular.

45 Con objeto de ensayar la especificidad celular de la citotoxicidad de TBP-YopP, se determinó el efecto citotóxico de la proteína TBP-YopP en células HeLaM9, una línea de células epiteliales producida que sobreexpresa TNF unido a la membrana celular (Ejemplo 7)

Células HeLaM9 fueron sembradas en placas de 96 pocillos con una densidad de 100.000 células por pocillo, en el seno de medio RPMI con Fcs al 10%. Después de la adhesión se añadió a los pocillos las concentraciones indicadas de proteínas quiméricas replegadas, TBP-YopP o TBP-PE38, respectivamente, y se incubó durante 20
 50 horas aproximadamente. Cuando se indicó, se añadió TBP-1 recombinante humana inmediatamente antes que la proteína quimérica replegada para competir con la unión al TNF situado sobre la superficie celular. Al cabo de 20 horas de incubación, las células fueron sometidas a tinción con rojo neutro para estimar la supervivencia de las células.

55 Los resultados expuestos en la Fig. 10, demuestran que la proteína TBP-YopP no era citotóxica para las células epiteliales HeLaM9 en una concentración tan alta como 25 μ g/ml, una concentración que se había indicado que ocasionaba, aproximadamente, el 75% de muerte celular de las células THPI (Fig. 9A).

Por el contrario, la proteína TBP-PE38 causaba más del 90% de muerte celular de las células HeLaM9 en concentraciones de 0,6 µg/ml, una concentración de TBP-PE38 que se había indicado que carecía de efecto citotóxico en la línea de células monocíticas THPI (Fig. 9B). La TBP-1 evitaba el efecto citotóxico de la proteína TBP-PE38, lo que indica especificidad de acción de TBP-PE38 a través de la unión con TNF. Uno de los lotes de TBP-PE38 era muy activo y citotóxico en concentraciones tan bajas como 0,06 µg/ml, destruyendo casi el 65% de las células HeLaM9.

En total, estos resultados indican que, una vez en el interior de las células, la proteína TBP-YopP es citotóxica para líneas celulares semejantes a las de macrófagos, pero no para las células epiteliales HeLaM9. Se han obtenido evidencias experimentales (véase el Ejemplo 6 que figura más adelante) que indican que aunque TBP-YopP no es citotóxica para las células HeLa M9. se une al TNF de la superficie celular y penetra en las células HeLaM9, como se pone de manifiesto por la inhibición por TBP-YopP de la fosforilación de p38 ocasionada por activación sérica después de inanición (véase el Ejemplo 6 y la Fig. 10).

La actividad de TBP-YopP replegada se ensayo también en macrófagos primarios activados con LPS. Para preparar los macrófagos primarios, ratones hembra C57BL/6 fueron inyectados durante 4 días por vía intraperitoneal (i.p.), con 1,5 ml de caldo estéril de tioglicolato de Brewer (Difco). Los exudados peritoneales (>85% de macrófagos) fueron cosechados el día 4, lavados con PBS por centrifugación y sembrados en placas de fondo plano de 96 pocillos a 1x100.000 macrófagos/pocillo en medio RPMI con Fcs inactivado por calor al 10%. Se dejó que las células se adhirieran durante 18 horas. Las células que no se habían adherido fueron separadas por lavado con medio moderadamente caliente.

Para inducir la activación de los macrófagos, se trató una monocapa de macrófagos con el LPS (LPS de *E. coli* 011:B4) en las concentraciones indicadas en la Fig. 12 (1 µg y 10 µg), durante 1 hora, en presencia de GM6001, 5 µg/ml (Calbiochem). Después de la inducción, las células fueron incubadas durante dos horas más en presencia o ausencia de TBP-YopP o TBP-PE38 replegadas A continuación, el medio fue reemplazado por RPMI+ HFcs al 10% con la misma concentración de LPS, pero sin GM6001 para permitir la secreción de TNF-α en el medio de cultivo celular. Se recogió el medio de cultivo celular de macrófagos incubado durante la noche, y se midió el TNF-α por medio de un bioensayo. Las monocapas de células fueron teñidas con rojo neutro para determinar la supervivencia de las células.

Los resultados obtenidos, resumidos en la Fig. 12, indican que ninguna de las dos proteínas quiméricas, TBP-YopP y TBP-PE38, era citotóxica para macrófagos primarios activados.

Puesto que se sabe que la YopP inhibe la secreción de TNF, se determinaron los niveles de TNF secretado en el medio de crecimiento de macrófagos primarios activados con LPS, incubados en presencia o ausencia de TBP-YopP (Fig. 13). Se recogió el medio de los macrófagos primarios activados, se diluyó dos, cuatro y ocho veces (0,5, 0,25, 0,125, respectivamente), con medio de nueva aportación y se aplicó sobre una monocapa de células sensibles al TNF (L929) sembradas en una densidad de 1x10⁵ células por pocillo (en placas de 96 pocillos). El bioensayo se llevó a cabo en presencia de cicloheximida, 10 µg/ml. Células L929 (clon L929 de tejido conjuntivo murino, ATCC número CCL-1) fueron incubadas durante 20 horas con el medio de macrófagos activados, acondicionado. El nivel de citotoxicidad de L929 es proporcional a la concentración de TNF presente en el medio de macrófagos primarios activados, acondicionado.

Como indica la Fig. 13, los macrófagos peritoneales tratados con tioglicolato, producían algo de TNF-α. Por ejemplo, medio de los macrófagos peritoneales tratados con tioglicolato diluido cuatro veces, causaba la muerte de más del 40% de las células L929 sensibles al TNF. Sin embargo, la activación adicional de macrófagos por LPS aumentaba la secreción de TNF. Por ejemplo, la muerte celular fue mayor que 60% cuando se expuso a medio de macrófagos activados, acondicionado, diluido ocho veces (Fig. 13A, B). Se encontró que el medio de macrófagos primarios activados, acondicionado, en presencia de TBP-PE38, era igualmente tóxico para las células L929 que el medio de macrófagos activados, acondicionado, en ausencia de TBP-PE38 (Fig. 13B). Este resultado indica que la proteína TBP-PE38 no inhibe la secreción de TNF en macrófagos primarios activados. Por el contrario, el medio de macrófagos activados, acondicionado, en presencia de TBP-YopP era considerablemente menos tóxico para las células L929 en comparación con el medio de macrófagos activados, acondicionado, en ausencia de TBP-YopP. Por ejemplo, cuando el medio de macrófagos activados, acondicionado, en presencia de TBP-YopP había sido diluido ocho veces (0,125 en la Fig. 13 A) la cantidad de TNF era demasiado baja para ser citotóxica para las células L929. Diluciones inferiores, tales como diluciones de cuatro veces o de dos veces (Fig. 13A), 0,5, 0,25) contenían todavía suficiente TNF para matar el 60-70% de células L929. La incubación de macrófagos con TBP-1 en combinación con TBP-YopP evitaba completamente el efecto inhibitorio de TBP-YopP sobre la producción de TNF (Fig. 13B, 0,125). En este caso, la muerte celular fue de 60% aproximadamente, es decir, el mismo nivel de muerte celular observado usando medio de macrófagos activados, acondicionado, en ausencia de TBP-YopP.

Estos resultados indican que ninguna de las dos proteínas, TBP-YopP ni TBP-PE38 causan la muerte de macrófagos primarios activados, pero que, a diferencia de la proteína TBP-PE38, la proteína TBP-YopP es capaz de inhibir la secreción de TNF en macrófagos primarios activados.

Así pues, la proteína TBP-YopP posee el efecto deseable y específico siguiente sobre macrófagos activados, que puede ser explotada con fines terapéuticos: disminuye la producción de TNF- α en células de macrófagos sin destruir tales células.

Ejemplo 6. Efecto inhibitorio de TBP-YopP sobre la fosforilación de p38 en células HeLa M9.

5 Se sabe que la proteína YopP inhibe el MAPK y los caminos de NF- κ B. En el Ejemplo anterior se ha expuesto que la proteína TBP-YopP no tiene efecto citopático en las células HeLa M9. Con objeto de explorar si existe algún efecto de TBP-YopP en las células HeLa M9, se examinó la fosforilación de p38, indicativa de señalización a través de la cascada de MAPK.

10 Se sembraron células HeLa M9 (200.000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos y se sometieron a privación de alimento durante 16 – 18 horas en medio RPMI exento de Fcs, que contenía insulina 1 mkg/ml, transferrina, 1 μ g/ml, selenita sódica, 1 ng/ml, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales y glutamina. Después se aplicó sobre las células 1 μ g de TBP-YopP recombinante en un volumen de 10 μ l, y se dejó interaccionar con el TNF situado sobre la superficie de las células y penetrar en las células, durante 1 hora. Como testigo, se añadió a las células 10 μ l de disolvente (tampón de Borato 50 mM/NaOH, pH 8,5). Después, las células fueron activadas mediante Fcs inactivado por calor, al 10% (HFcs) durante intervalos de tiempo diferentes, desde 60 a 5 minutos, en presencia de TBP-YopP como indica la Fig. 11A, de modo que el tiempo total de incubación con TBP-YopP para todas las células fue 2 horas. Seguidamente, las células fueron lisadas sobre hielo en el seno de tampón de fosfato, 50 μ l, en presencia de inhibidores de fosfatasa: NaVa, 1 mM, y NaF, 10 mM, e inhibidores de proteasas: PMSF, 1 mM y completo (Roche). (Tampón de fosfato: NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton al 1%, pH 8,0). Los lisados celulares fueron sometidos a análisis de transferencia Western y detectados con anticuerpo policlonal específico para el p38 fosforilado (pP38) (Cell Signalling). Las mismas transferencias fueron vueltas a sondear con anti IKK- α (anti-IKK- α monoclonal, Santa Cruz) para normalizar la proteína cargada.

25 Las Figs. 11B y C exponen los resultados de dos experimentos, en los que las células fueron tratadas como se indica en la Fig 11 A, o en lugar de TBP-YopP, se usó el disolvente (tampón de borato) para comparar la fosforilación de p38 en presencia o ausencia de TBP-YopP.

En los resultados de dos experimentos (Figs. 11B y C) se observó fosforilación de p38 en las células HeLaM9 al cabo de 5 minutos de activación de HFcs. La fosforilación aumentaba en los primeros diez minutos y disminuía gradualmente 30 y 60 minutos después de la activación de HFcs. Se encontró que la proteína TBP-YopP inhibía la fosforilación de p38 en las células HeLa M9, por lo menos, hasta 30 minutos después de la activación de HFcs.

30 Los resultados obtenidos en este experimento ilustran que, aun cuando la proteína TBP-YopP no era citotóxica para las células HeLa M9, células epiteliales, aparentemente penetraba en las células HeLa M9 como se ponía de manifiesto por la acción inhibitoria de TBP-YopP sobre la cascada de señalización de MAPK.

Ejemplo 7. Células que expresan TNF sobre su superficie.

Se utilizaron dos líneas celulares para explorar el efecto de TBP-YopP:

35 (a) Células THPI de la leucemia monocítica aguda humana (obtenidas de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares). La diferenciación monocítica de estas células puede ser inducida con acetato miristato de forbol (PMA). Estas células fueron cultivadas en un intervalo de densidades celulares de 0,3-1x10⁶/ml en el seno de medio RPMI 1640 suplementado con Fcs al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, insulina, 9 mg/ml, penicilina, 100 mg/ml, y estreptomina, 100 mg/ml. Para intensificar la expresión de TNF de la superficie celular, estas células, activadas con PMA (durante 16-20 horas, 100 ng/ml) fueron tratadas con LPS (1 mkg/ml durante 1,5 hora) y con el inhibidor de metaloproteasas GM6001, (Calbiochem), 10 mcg/ml, durante dos horas antes de realizar los ensayos.

45 (b) Células HeLaM9, un clon de la línea de células epiteliales HeLa del carcinoma cervical que exprese constitutivamente, bajo el control del promotor de SV40, un cDNA mutante del TNF humano, en el que la arginina de la posición +2 y la serina de la posición +3 han sido sustituidas por treonina. Estas mutaciones causan una disminución de aproximadamente diez veces, del grado de escisión de TNF de 26 kDa. Las células son cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con Fcs al 10%, L-glutamina, 2 mM, penicilina, 100 mg/ml, estreptomina, 100 mg/ml, y gentamicina, 50 mg/ml.

50 La expresión de TNF sobre la superficie celular de las células THPI fue verificada por FACS en presencia del inhibidor de metaloproteasas GM6001, 10 μ g/ml, (Calbiochem), para evitar el derramamiento de TNF- α . Muestras de 5 x 10⁵ células fueron incubadas en medio RPMI exento de Fcs que contenía insulina, 1 mkg/ml, transferrina, 1 μ g/ml, selenita sódica, 1 ng/ml, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales y glutamina con PMA, 50 –100 ng/ml, durante 16 horas. Después se añadió LPS de *E. coli* 0111-B4 en la concentración de 1 μ g/ml junto con GM6001, 10 μ g/ml, durante 2 horas. Para el análisis mediante el clasificador celular FACS de la expresión de TNF sobre la superficie celular, las células fueron lavadas a 4°C con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía BSA, 2 mg/ml, y azida de sodio al 0,1%, y se incubó con anticuerpos FITC-anti-TNF humano. El análisis se llevó a

cabo por FACscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Se encontró que al menos el 30% de las células expresaban TNF- α sobre su superficie,

Ejemplo 8: Ensayo de internalización

5 Células que expresan TNF- α (HeLa M9 u otras) se marcaron con [¹²⁵I]-conjugado (1 mcg/ml) a 37°C en medio que contenía 0,1 mg/ml de BSA. Las células fueron tripsinizadas después y lavadas con PBS enfriado con hielo, resuspendidas en Pronasa al 3% en el seno de PBS y mantenidas durante 40 minutos a 2°C antes de centrifugación a través de ftalato de dibutilo. La eficacia de endocitosis se expresa como el porcentaje resistente a la Pronasa del [¹²⁵I]-conjugado asociado a las células, al cabo de 30 minutos de absorción (modificado desde la publicación de Taupiac M-P., et al., 1999).

10 Ejemplo 9: SDS-PAGE e inmunotransferencia

Glóbulos celulares recogidos por centrifugación, se disuelven en tampón de Laemmli. Las muestras se hierven durante 5 minutos antes de aplicar a un gel en placa de SDS al 0,1% y acrilamida al 10%. Los gels pueden ser teñidos con azul de comassie o sometidos a tinción con plata.

15 Para realizar la inmunotransferencia, las muestras, después de la electroforesis, son transferidas a un papel de nitrocelulosa, seguido de reacción con anticuerpo para la toxina o para la forma soluble del receptor de TNF, después a un segundo anticuerpo ligado a HRP (para la toxina - anticuerpo de cabra anti-conejo; para el receptor de TNF soluble - anticuerpo de cabra anti-ratón) y tinción. Se emplearon anticuerpos monoclonales conocidos contra los receptores de TNF solubles según se ha descrito (Engelmann et al., 1990, y Bigda et al., 1994).

Ejemplo 10: Actividad terapéutica de la proteína de fusión en un modelo murino de desarrollo espontáneo de artritis.

20 Se emplearon ratones transgénicos que expresan un trasgeno del TNF humano en el que la región no codificante del extremo 3', que proporciona regulación de la traducción de su expresión, había sido expresado con la del gen de β -globina (Keffler et al., 1991). Dos semanas después del nacimiento, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con dosis diversas de la proteína de ensayo (la proteína de fusión y, como testigos, de la toxina y del receptor de TNF soluble incorporado a la proteína de fusión) y después inyectados de nuevo una vez por semana
25 durante un período de 9 semanas. La hinchazón de las articulaciones de los tobillos de las patas traseras de los ratones se verificó periódicamente determinando el diámetro de la articulación. Las lesiones/alteraciones que implican estructuras de las articulaciones: cápsula de la articulación, espacio de la articulación, membrana sinovial, cartílago articular y hueso subcondral, fueron evaluadas histológicamente.

Ejemplo 11 Actividad terapéutica de las proteína de fusión en un modelo murino de artritis inducida con antígeno.

30 Ratas Lewis fueron inmunizadas en la ijada trasera con 0,5 mg de albúmina de suero bovino metilada (mBSA) en el seno de adyuvante de Freund completo. Veintiún días más tarde (día 0) los animales fueron inyectados en ambas articulaciones de las rodillas traseras con 50 μ g de mBSA en el seno de solución salina apirógena. Las ratas fueron inyectadas por vía intraarticular con la proteína de ensayo (la proteína de fusión y como testigos, de la toxina y del receptor de TNF soluble incorporados a la proteína de fusión), en ambas articulaciones de las rodillas. aquel día y
35 durante los 2 días siguientes (días 0, 1 y 2). La anchura de la articulación de la rodilla se midió diariamente los días 0-6, con relación al tratamiento. Se realizó el examen histopatológico de las articulaciones recogidas el día 6. Se evaluaron las lesiones/alteraciones que implican estructuras de la articulación de las rodillas: cápsula de la articulación, espacio de la articulación, membrana sinovial, cartílago articular y hueso subcondral.

Ejemplo 12. Actividad terapéutica de las proteína de fusión en un modelo murino de artritis inducida con antígeno.

40 Ratones macho DBA/1 (de 8-12 semanas de edad) fueron inmunizados con 100 μ g de colágeno de tipo II emulsionado en FCA (Difco, Detroit, MI) mediante inyección intradérmica en la base de la cola. Partiendo desde el tiempo de inmunización, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal, dos veces por semana, con la proteína de ensayo (la proteína de fusión y, como testigos, de la toxina y del receptor de TNF soluble incorporados a la proteína de fusión) en el seno de PBS hasta el comienzo de la artritis clínica. A partir del día 15 después de la
45 inmunización, los ratones fueron examinados diariamente, durante 10 días, para determinar el comienzo de la enfermedad, utilizando dos parámetros clínicos: la hinchazón de la pata y la puntuación clínica, La hinchazón de la pata se determina midiendo con calibres el grosor de la primera pata trasera afectada.

Ejemplo 13. Actividad terapéutica de la proteína de fusión en un modelo murino de colitis.

50 Ratones aturdidos con IL-10, adquiridos de Harlan, UK, fueron cruzados para generar ratones homocigóticos para la supresión del gen de IL-10 y seleccionados por homocigocidad mediante PCR llevada a cabo sobre el DNA de sus colas. Partiendo de la edad de 4 semanas, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal, tres veces por semana, con la proteína de ensayo (la proteína de fusión y, como testigos, de la toxina y del receptor de TNF soluble incorporados a la proteína de fusión), en el seno de PBS, hasta la edad de 20 semanas. La puntuación
55 clínica, el análisis histológico del intestino y el contenido de citoquinas inflamatorias en las deposiciones, se evaluaron según se ha descrito (Scheinin et al., 2003),

Ejemplo 14. Construcción de un plásmido para la expresión de un conjugado de la forma soluble de receptor de TNF p75.

5 La secuencia de la forma soluble del receptor de TNF p75 (TNFRSF1B, Genbank ID M32315) incorporado en el conjugado, corresponde a la secuencia completa del dominio extracelular del receptor (Leu 1 hasta Asp 235). Esta secuencia fue fusionada a la de la toxina e insertada en el vector pET según se ha descrito en el ejemplo 1.

Referencias bibliográficas

- 5 Andreakos, E.T., et al., (2002) Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5): p. 299-313.
- Asadullah K., et al., (2002) "Novel immunotherapies for psoriasis." *Trends in Immunology*, January, 23, N1, pp 47-53.
- 10 Belcher et al., (2000) "Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion" *Blood* Vol. 96, No. 7, pp. 2451-2459.
- Ben-Yehudah, A., et al., (2000) "Utilizing chimeric proteins for exploring the cellular fate of endogenous proteins." *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 15 290(1): p. 332-8.
- Beutler, B.A., (1999) "The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol*," 26 Suppl 57: p. 16-21.
- Bigda, J., et al., (1994) "Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity." *J Exp Med*. 180(2): p. 445-60.
- 20 Brinkmann, U. and Pastan I., (1995) "Recombinant Immunotoxins: From Basic Research to Cancer Therapy." *Methods* 8: p. 143-156.
- Cornelis GR, Denecker G., (2001) "Yersinia lead SUMO attack." *Nat Med*. 7(1):21-3.

Engelmann, H., et al., (1990) "Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity." *J Biol. Chem.* 265(24): p. 14497-504.

5 Ghezzi P et al., (1998) "Tumor necrosis factor is increased in the spinal cord of an animal model of motor neuron degeneration." *Eur Cytokine Netw.* 9(2):139-44.

Hongo et al., (2004) "Endogenous nitric oxide protects against T cell-dependent lethality during graft-versus-host disease and idiopathic pneumonia syndrome." *J.Immunology*, v.173:1744-1756.

10 Jankovic, D., Z. Liu, and W.C. Gause, (2001) "Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways." *Trends Immunol*, 22(8): p. 450-7.

Kagi D., Ho A., et al., (1999) "TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes " *J.Immunology* 162:4598-4605.

15 Keffer, J., et al., (1991) "Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis." *EMBO J*, 10(13): p. 4025-31.

Kollias, G., et al., (1999) "On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease." *Immunol Rev.* 169: p. 175-94.

20 Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo (2001) "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): p. 487-501.

Lugering, A., et al., (2001) "Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway." *Gastroenterology* 121(5): p. 1145-57.

Mittler (2004) "Suppressing the self in rheumatoid arthritis." *Nature medicine* 10:10 pp1047-49.

Nophar et al., (1990) "Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data
5 of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor." *EMBO J.* (10):3269-78.

Orth et al., (1999) "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector." *Science* 17;285(5435):1920-3.

Orth, (2002) "Function of the *Yersinia* effector YopJ." *Curr Opin Microbiol.*
10 5(1):38-43.

Prior et al., (1996) "Studies on the activity of Barnase Toxins in Vitro and in Vivo" *Bioconjugate Chem.*, 7, 23-29.

Palmer et al., (1999) "YopJ of *Yersinia* spp. is sufficient to cause downregulation of multiple mitogen-activated protein kinases in eukaryotic
15 cells." *Infect Immun.* 67(2):708-16.

Pacheco et al., (2002) "Reactive arthritis after BCG immunotherapy: T cell analysis in peripheral blood and synovial fluid" *Rheumatology* 41 pp 1119-1125.

Pastan, I., (2003) "Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history." *Cancer Immunol Immunother* 52(5): p. 338-41.

Pastan, I.I. and Kreitman, R.J., (1998) "Immunotoxins for targeted cancer
20 therapy." *Adv Drug Deliv Rev.* 31(1-2): p. 53-88.

Pocsik E, Duda E and Wallach D (1995) "Phosphorylation of the 26kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells." *J Inflammation*, 45, 152-160.

Reimold, A.M., (2003) "New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade." *Am J Med Sci*, 325(2): p. 75-92.

Ruckdeschel et al., (2001) "Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages" *Infect Immun*. 69(12):7652-62.

Scheinin, T. et al., (2003) "Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis." *Clin Exp Immunol*, 133(1): p. 38-43.

Siegall et al., (1989) "Functional analysis of domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin." *J Biol Chem*. Aug 25;264(24):14256-61.

Singh J., Suruchi A (2004) "Antitnf-a strategy: Present status of this therapeutic paradigm" *Indian J Pharmacol* 36, 1, pp.10-14.

Taupiac MP, Bebien M, Alami M, Beaumelle B., (1999) "A deletion within the translocation domain of *Pseudomonas* exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly." *Mol Microbiol*. 31(5):1385-93.

Van den Brande, J.M., et al., (2003) "Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease." *Gastroenterology*. 124(7): p. 1774-85.

Van Deventer, S.J., (2001) "Transmembrane TNF-alpha, induction of apoptosis, and the efficacy of TNF-targeting therapies in Crohn's disease." *Gastroenterology* 121(5): p. 1242-6.

Wallach, D., et al. (1999) "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu Rev Immunol*, 17: p. 331-67.

Wallach D, Arumugam TU, Boldin MP, Cantarella G, Ganesh KA, Goltsev Y, Goncharov TM, Kovalenko AV, Rajput A, Varfolomeev EE, Zhang SQ., (2002) "How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF-kappaB activation by members of the TNF/NGF receptor family." *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S189-96.

Listado de secuencias

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD

David, WALLACH

Elena, APPEL

<120> PROTEÍNAS QUIMÉRICAS, SU PREPARACIÓN Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LAS CONTIENEN

<130> 1050

<150> 167959

<151> 2005-11-04

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1707

<212> DNA

<213> Artificial

```

<400> 1
atggatagtg tgtgtcccca aggaaaatat atccaccctc aaaataattc gatttgctgt 60
accaagtgcc acaaaggaac ctacttgtag aatgactgtc caggcccggg gcaggatagc 120
gactgcaggg agtgtgagag cggctccttc accgcttcag aaaaccacct cagacactgc 180
ctcagctgct ccaaattgcc aaaggaaatg ggtcaggtgg agatctcttc ttgcacagtg 240
gaccgggaca ccgtgtgtgg ctgcaggaag aaccagtaac ggcattattg gagtgaaaac 300
ctttccagt gcttcaattg cagcctctgc ctcaatggga ccgtgcacct ctctgccag 360
gagaaacaga acaccgtgtg cacctgccat gcaggtttct ttctaagaga aaacgagtgt 420
gtctcctgta gtaactgtaa gaaaagcctg gagtgcacga agttgtgcct accccagatt 480
gagaataaag cttccggagg tcccgagggc ggcagcctgg ccgcgctgac cgcgaccag 540
gcttgccacc tgccgctgga gactttcacc cgtcatcgcc agccgcgagg ctgggaacaa 600
ctggagcagt gcggctatcc ggtgcagcgg ctggtcgccc tctacctggc ggcgcgctg 660
    
```

ES 2 389 527 T3

tcgtggaacc aggtcgacca ggtgatccgc AACGCCCTGG CCAGCCCCGG CAGCGGCGGC 720
gacctgggcg aagcgatccg cgagcagccg gagcaagccc gtctgcccct gaccctggcc 780
gccgccgaga gcgagcgctt cgtccggcag ggcaccggca acgaccccgg gagagtgaga 840
agaatgattg ggccaatatc acaataaac agccccggtg gcttatcaga aaaagagacc 900
agttctttaa tcagtaatga agagcttaaa aatatcataa cacagttgga aactgatata 960
gcggatggat cctggttcca taaaaattat tcacgtacag atgtaaaagt catgcccgca 1020
ttggtaacct aggcgaacaa taatatcct gaaatgaatc ttaattttgt tacatctcca 1080
ctggaccttt cgatagaaat aaaaaacgtc atagaaaatg gagttggatc ttcccgttc 1140
ataattaaca tgggggaaga tggaatacat ttcagtgtaa ttgattaca acatataaat 1200
gggaaaacat ctctgatatt gtttgaacca gcaaacttta acagtatggg gccagcgatg 1260
ctggcaataa gggcaaaaac ggccattgaa cgttatcaat tacctgattg ccatttctcc 1320
atggtggaaa tggatattca gcgaagctca tctgaatgtg gtatttttag tttggcactg 1380
gcaaaaaaac ttacaccga gagagataac ctggtgaaa tacatgaaga taatataaaa 1440
ggtatattaa gtgatggtga aaatccttta ccccacgata agttggatcc gtatctcccg 1500
gtaacttttt acaaacatac tcaaggtaaa aaacgtctta atgaatattt aaataactaac 1560
ccgcagggag ttggtactgt tgtaacaaa aaaaatgaaa ccatctttaa taggtttgat 1620
aacaataaat ccattataga tggaaaggaa ttatcagttt cggcacataa aaagagaata 1680
gctgaatata aaacacttct caaagta 1707

<210> 2

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2

ggcggcagcc tggccgcgct gaccgcgcac caggcttgcc acctgccgct ggagactttc 60
accgctatc gccagccgcg cggctgggaa caactggagc agtgcggcta tccggtgcag 120
cggctggtcg cctctacct ggcggcgcgg ctgtcgtgga accaggtcga ccaggtgatc 180
cgcaacgccc tggccagccc cggcagcggc ggcgacctgg gcgaagcgat ccgcgagcag 240
ccggagcagg cccgtctggc cctgacctg gccgccgccc agagcagcgc cttcgtccgg 300
cagggcaccg gcaacgac 318

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 389 527 T3

<400> 3

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro
 1 5 10 15
 Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 20 25 30
 Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala
 35 40 45
 Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
 50 55 60
 Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
 85 90 95
 Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp
 100 105

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

catcatatgg atagtgtgtg tccccaagg

29

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

aggaagcttt attctcaatc tggggtaggc ac

32

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6
 aattaaagct tccggaggtc ccgagggcgg cagcctggcc gcgctgaccg -cg 52

<210> 7
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 7
 gtgaattctt acccggggtc gttgccgggt ccctgccg 38

<210> 8
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 8
 atcccgggag agtgagaaga atgattgggc caatatcaCa aataaacagc 50

<210> 9
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 9
 cagaattctt atactttgag aagtgtttta tattcagc 38

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una proteína quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de un agente de dirección hacia células específicas y la secuencia de aminoácidos de una proteína externa, P, de *Yersinia* (YopP), conectadas por un polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica o de uno de sus fragmentos, desde el endosoma hasta el citosol de una célula diana, en la que el agente de dirección hacia células específicas es la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF.
- 2.- La proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF es la proteína 1 de unión a TNF (TBP-1).
- 10 3.- La proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF es TBP-2
- 4.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que YopP posee actividad reducida o no apoptótica, y está seleccionada entre los serogrupos O: 3, O: 9 y O:8 de YopP, mutados en el resto de arginina-143.
- 15 5.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido que permite la translocación incluye el dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas* o de uno de sus fragmentos.
- 6.- La proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que el fragmento del dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas* es deficiente en el dominio último (F) de la hélice α ..
- 20 7.- La proteína quimérica según la reivindicación 5, en la que el fragmento del dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas*, designado en esta memoria PEIltr, corresponde a la secuencia de aminoácidos de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* de la Fig. 3 (SEQ ID NO:3)
- 8.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende uno o dos sitios de escisión de furina.
- 25 9.- La proteína quimérica según la reivindicación 8, en la que un sitio de escisión de furina está situado en el extremo N-terminal del polipéptido que permite la translocación, y otro sitio de escisión de furina está situado en el extremo N-terminal de la proteína YopP.
- 10.- La proteína quimérica según la reivindicación 8 ó 9, en la que un sitio de escisión de furina es el sitio de escisión de furina de la toxina diftérica.
- 30 11.- La proteína quimérica según la reivindicación 10, en la que el sitio de escisión de furina posee la secuencia de aminoácidos RVRR, designado en esta memoria DT.
- 12.- La proteína quimérica según la reivindicación 11, en la que la proteína quimérica consiste en TBP-1, el fragmento del dominio de translocación de la exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* PEIltr, el sitio de escisión de furina DT, y la proteína YopP, designada aquí TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma
- 35 13.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la célula diana es una célula linfóide.
- 14.- La proteína quimérica según la reivindicación 13, en la que la célula diana es un macrófago.
- 15.- La proteína quimérica según la reivindicación 13, en la que la célula diana es un monocito.
- 16.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que célula diana es una célula epitelial.
- 40 17.- Una secuencia de DNA que codifica una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 18.- La secuencia de DNA según la reivindicación 17, que codifica, además, un péptido señal para secreción en células eucarióticas.
- 19.- Un vector de expresión que comprende la secuencia de DNA según la reivindicación 17 ó 18.
- 45 20.- El vector de expresión según la reivindicación 19, en el que el DNA está ligado funcionalmente a un promotor que posee una actividad que es independiente de NF- κ B.
- 21.- El vector de expresión según la reivindicación 20, en el que el promotor es EF-1 α .

- 22.- Una célula huésped que comprende un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.
- 23.- La célula huésped según la reivindicación 22, en la que la célula es una célula eucariótica seleccionada entre células HeLa, CHO, 293, de levadura y de insecto.
- 5 24.- La célula huésped según la reivindicación 22, en la que la célula es una célula procariótica.
- 25.- Un método para producir una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende cultivar una célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, y aislar la proteína quimérica producida.
- 10 26.- El método según la reivindicación 25, en el que la proteína quimérica es TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión o fragmento de la misma.
- 27.- Una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1a 16, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 28.- La composición farmacéutica según la reivindicación 27, en la que la proteína quimérica es TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma.
- 15 29.- Uso de una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre malaria, sepsis, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad intestinal inflamatoria y cáncer.
- 30.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1a 16, para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre malaria, sepsis, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad intestinal inflamatoria y cáncer.
- 20 31.- El uso según la reivindicación 29 o la proteína quimérica según la reivindicación 30, en el que la proteína quimérica es TBP-YopP. o una muteína, variante, proteína de fusión derivado funcional, fragmento o sal de la misma.
- 25 32.- Uso de una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre choque séptico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de injerto contra huésped y anemia de células falciformes.
- 30 33.- La proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre choque séptico, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis, esclerosis lateral amiotrófica, diabetes mellitus dependiente de insulina, enfermedad de injerto contra huésped y anemia de células falciformes.
- 34.- El uso según la reivindicación 12 o la proteína quimérica según la reivindicación 33, en el que la proteína quimérica. es TBP-YopP, o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma.
- 35 35.- Un método in vitro para reducir la expresión anormal de un ligando sobre la superficie celular de una célula diana, que comprende exponer la célula a una proteína quimérica que comprende la parte extracelular de un receptor del ligando expresado sobre la superficie de la célula diana, e YopP, conectadas por un polipéptido que permite la translocación de la proteína quimérica o de uno de sus fragmentos, desde el endosoma al citosol de la célula, en el que el agente de dirección hacia células específicas es la parte extracelular de un receptor de TNF/NGF.
- 40 36.- El método según la reivindicación 35, en el que el ligando es el TNF.
- 37.- El método según la reivindicación 36, en el que el polipéptido que permite la translocación es el PEIItR.
- 38.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en el que la célula es un macrófago o una célula monocítica.
- 45 39.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en el que la proteína quimérica es la TBP-YopP. o una muteína, variante, proteína de fusión, derivado funcional, fragmento o sal de la misma.

Fig. 1 A

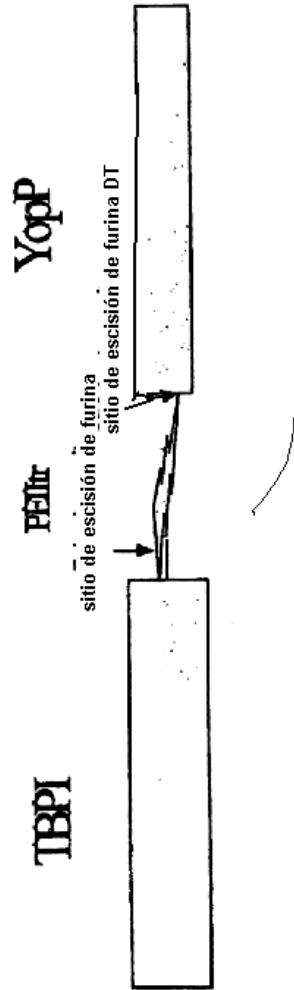


Fig. 1B

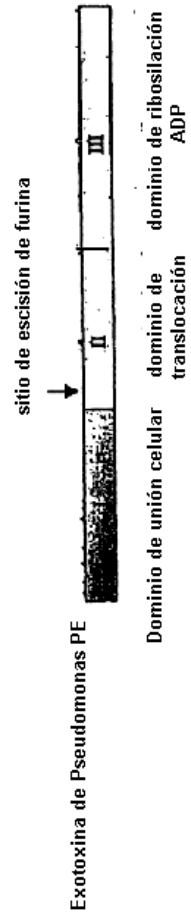


Fig. 1C

ATGGATATGTGTGCCCAAGGAAATAATCCACCCTCAAAATTAATTCGATTTGCTGTACCAGTSCCAAAAGGAAAC
 CTACTTGTACAAATGACTCTCCAGCCCGGGCCAGGATPACGACTGCGGGAGTGTGAGAGCGGCTCTTCACCGCTTCAG
 AAAPCCACTCAGACACTGCCCTCAGCTGCTCCAAATGCCAAAGGAATGGGTCAAGTGGAGATCTCTTCTTGCACAGTG
 GACCGGACACCCGTGTGGCTGACGANGAACAGTACCAGCAATTAATGGAGTGAATAACCTTTTCCNGTGTCTCAATTG
 CAGCCCTGCTCAAATGGACDGTGCACTCTCTCTAGTAACTGTAAAGAAAGCCTGGAGTGCACCAAGTTGTGCTACCCCGAT
 TTCTAAGAGAAACGGAGTGTCTCTCTAGTAACTGTAAAGAAAGCCTGGAGTGCACCAAGTTGTGCTACCCCGAT
 GAGATTAAGCTTCCGGAGTCCCGGGCCGAGCCCTGGCCGCGTGA CCGGGCACCAAGCTTGCACCTGCCGCTGGA
 GACTTACCCCTCATGCCAGCCCGGGCTGGGNACACTGGAGCAGTCCGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCGGCC
 TCTACTGGGGCGGGCTGTCTGTGGACCGGTGGACCGAGTGTCCGCAACGCCCTGGCCAGCCCGGACGCGGCGGC
 GACCTGGGGAGCGGTCGGGAGCCGCGGAGCAAGCCCTGTGGCCCTGNCCTGGCCCGCCGAGAGCCGAGCGCTT
 CGTCCGCAAGGCAACCCGCAACGACCCCGGGAGTGGAGAGATGATTTGGCCCAATATCACAAATAAAGACGCCCGGTG
 GCTTATCAGAAAGAGACCAAGTCTTTAAATCAGTATGAGAGCTTTAAATATCATACACAGTGGAACTGATATA
 GCGGATGGATCCGTGCTCCATAAAATTAATTCACGTACAGATGTAAAGTCAATGGCCGCAATGGTACATAGAAATG
 TAAATATCCCTGAAATGATCTTAAATTTTGTACATCTCCACTGGACCTTCCGATAGAAATAAAGCCGTCATAGAAATG
 GAGTTGGATCTTCCGGCTTCAATAATACATGGGGAAATGGAAATACATTTCAAGTGAATTTGATTTCAAAACATATAAT
 GGGAAACATCTCTGATATGTTGACCAAGCAACTTAAACAGTATGGGCCAGCGATGCTGGCAATAGGGCAAAAC
 GGCCATTGAAGCTATCAATACCCTGATTTGCCAATTTCCATGTTGGAAATGGATTTACCGAGCTCATCTGAATGTG
 GTATTTTAGTTTGGCTGGCAAAATACTTACCCGAGATAGTTGATCCGATCTCCCGTAACTTTTACAAACATAC
 GGTATATTAGTGTGTTGAAATCCCTTACCCGAGATAGTTGATCCGATCTCCCGTAACTTTTACAAACATAC
 TCAAGTAAACAGCTTTAATGAAATTTAAATACCTAACCCGAGGAGTTGGTACTGTGTTAACAAATAAATGMAA
 CCACTTTAAATGGTTTGAATACAAATAATCCATTAATAGTGGAAAGAAATTAATCAGTTTCCGGCACATAAAGAGAAATA
 GCTGAATATAAACAACCTTCTCAAAATA

Fig. 2

ggcggcagccctggccgctgaccgcaaccggctggaccctggccctggagactttaccocgtrcatgcca
gcccggcggctgggaa caactggagcagtgccgctatccgggctacgggctggctgcccctaccctggcggc
ggcggctgtcgtggaa ccaggctggaccagggtgatccgcaacgcccctggccaggccocggcagcggcggcggact
gggcgaaagcgtccgagcagccgggagcagcccgctggccctgaccctggccctggccggccggccggagcggc
gcttgcctggcaggggcaaccggcaacgac

Fig. 3

GGSLAALTAHQACHILPLETFTRHRQPRGWEQLEQQGYPVQRLVALYLAARLSWVQVQVIRNALASPGSGG
DLGEAIREQPEQARLALTAAAESERFVRQGTGND

Fig 4

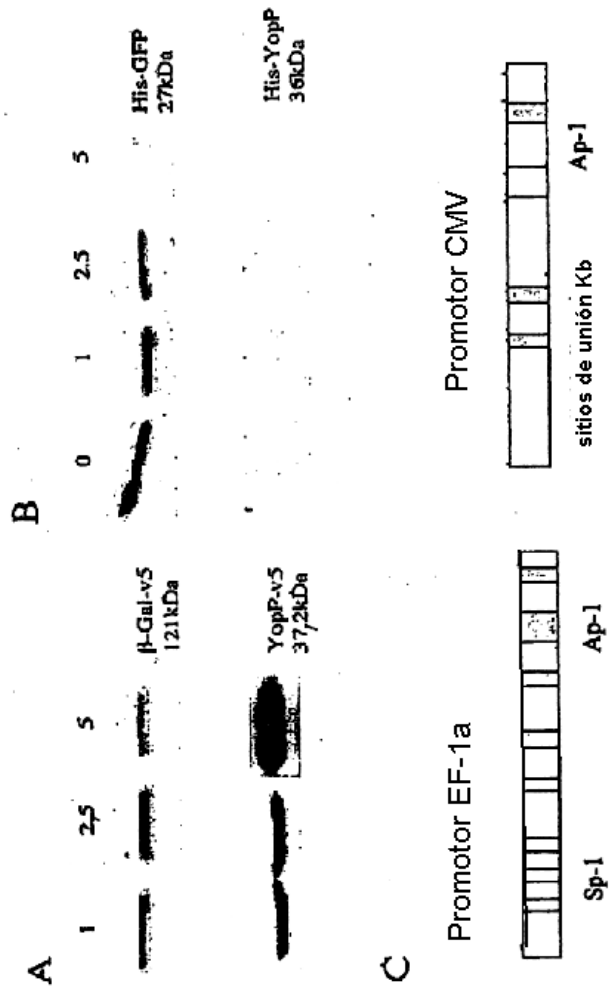


Fig. 5

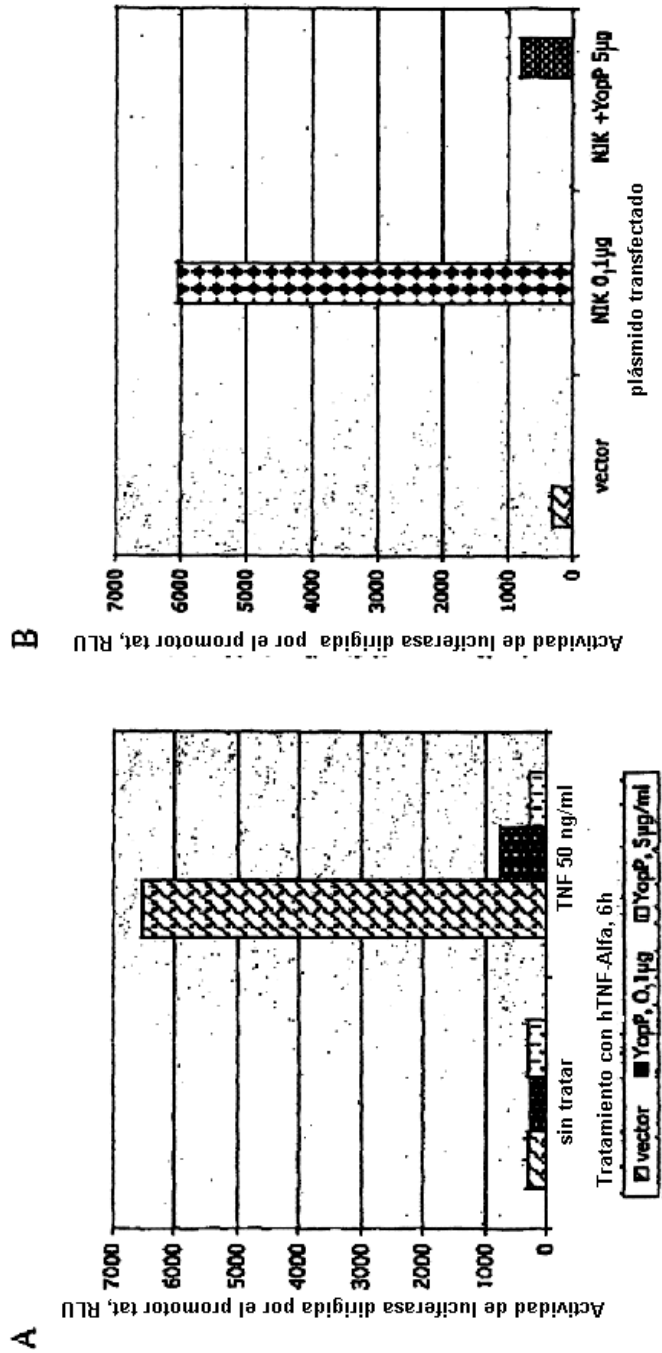


FIG 6

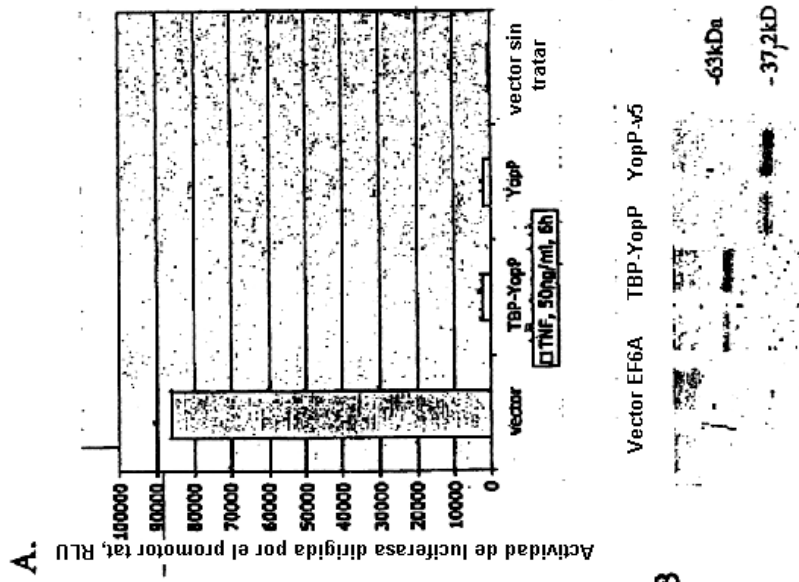


Fig.7

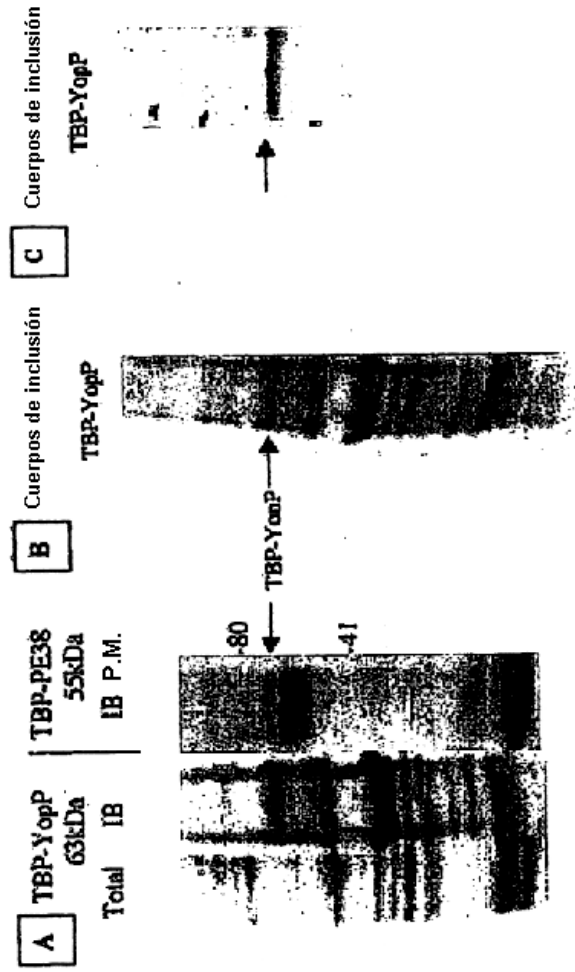


Fig.8

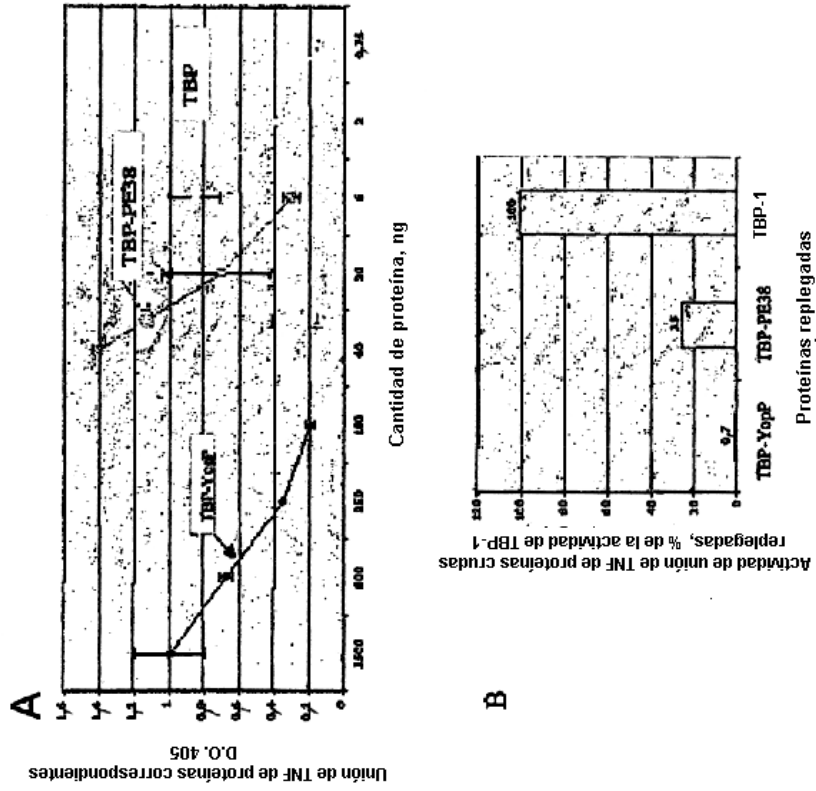


Fig. 9

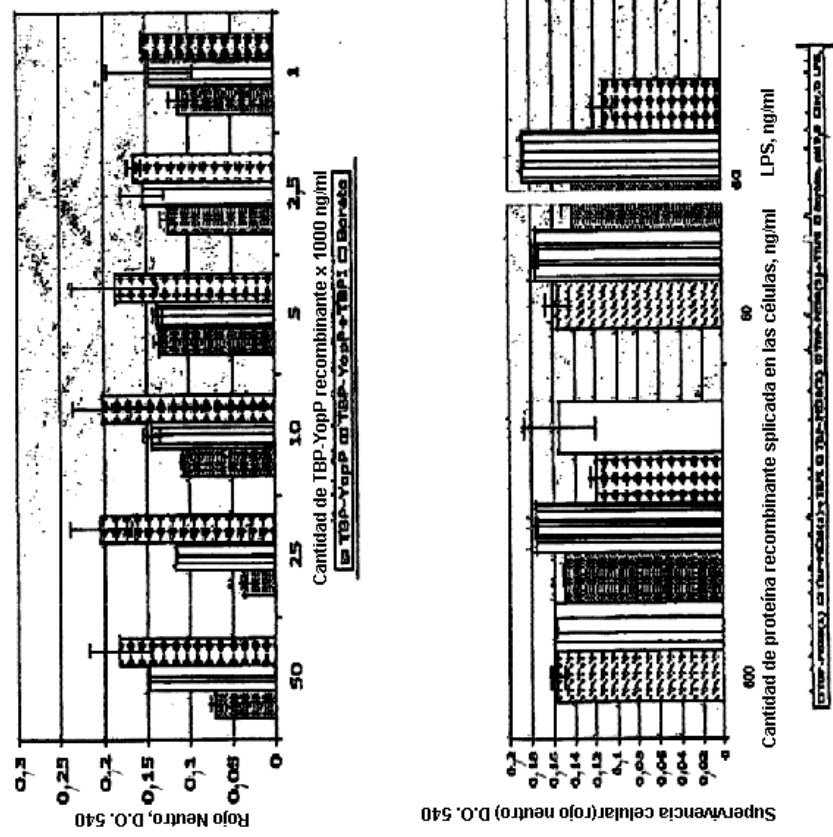


Fig. 10

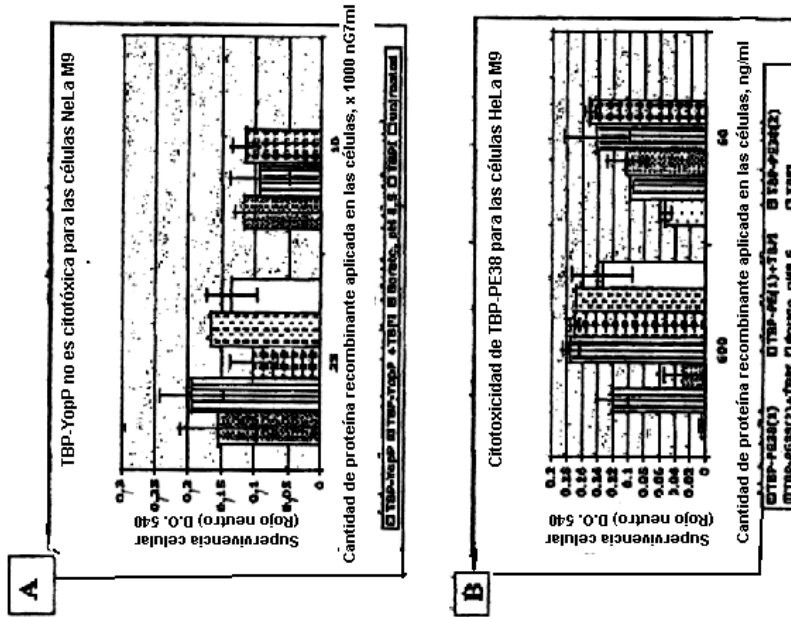


Fig. 11



Fig. 12

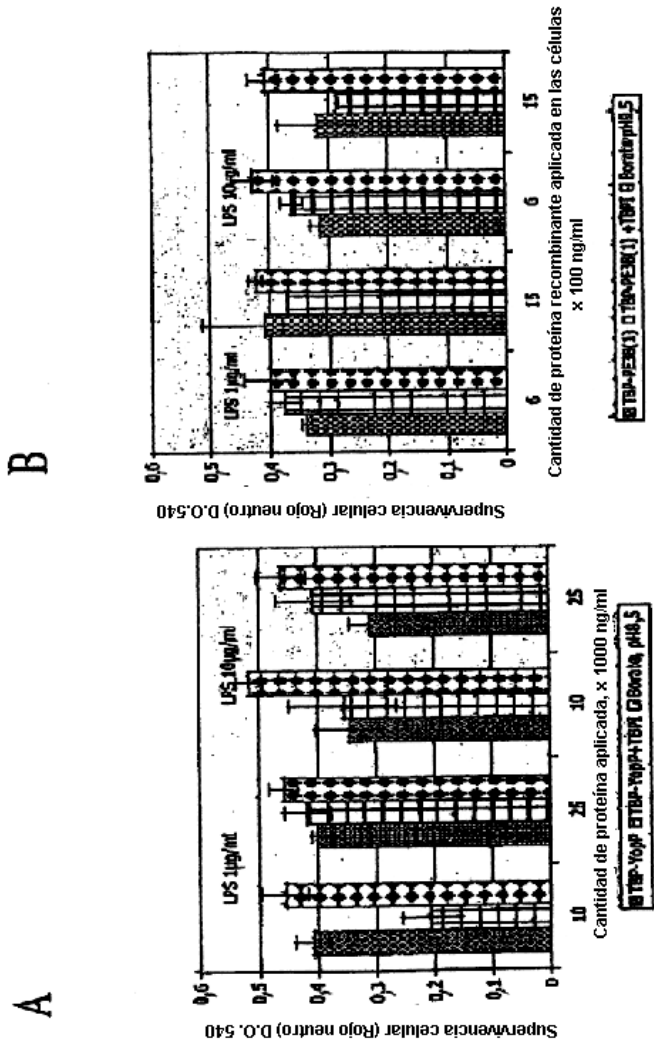


Fig. 13

A

