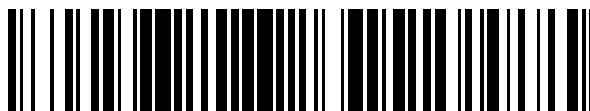


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 760**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07006581 .8**
96 Fecha de presentación: **03.01.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1908780**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Proteínas quiméricas novedosas y métodos para usar las mismas**

30 Prioridad:
03.01.2000 US 174258 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer 3160 Chestnut
Street Suite 200
Philadelphia PA 19104 , US**

72 Inventor/es:
**HUANG, JUI-HAN y
TYKOCINSKI, MARK L.**

74 Agente/Representante:
MILTENYI, Peter

ES 2 391 760 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 novedosas y métodos para usar las mismas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a proteínas quiméricas novedosas que pueden fijarse a una primera célula y enmascarar o interferir de otro modo con una primera señal de esa célula, mientras que también confieren en un segundo tipo de señal a una segunda célula. Las proteínas son útiles en el tratamiento de numerosos trastornos inmunitarios y otras enfermedades. También se dan a conocer métodos para afectar a una disminución en una célula y enviar una señal trans a otra célula.

Información de antecedentes

10 Existen dos ramas principales en el sistema inmunitario, soportadas por diferentes tipos de células denominadas linfocitos B y linfocitos T (células B y células T). Las células B crean anticuerpos cuando encuentran antígenos y, en la mayoría de los casos, estos anticuerpos son protectores. Sin embargo, en enfermedades autoinmunitarias, algunos de los anticuerpos reaccionan con los tejidos del individuo. Cuando se depositan en tejido, provocan una reacción inflamatoria y daño tisular. Las células T, como las células B, también se activan cuando encuentran un antígeno. A medida que las células T se desarrollan experimentan un proceso denominado "educación tímica". Durante la educación tímica, más del 95% de las células T mueren. Las células T que han tenido un receptor de células T que puede reconocer y reaccionar con los propios tejidos del individuo (autoantígenos) se eliminan específicamente. Sin embargo, algunas células T autorreactivas escapan del proceso de eliminación y pueden iniciar una respuesta inmunitaria que da como resultado una enfermedad autoinmunitaria.

20 La modulación de la actividad de células T sigue siendo un objetivo terapéutico significativo en enfermedades con células T inmunopatológicas. El destino de los linfocitos T tras la estimulación de receptor de células T (TCR) está guiado por la integración de entradas de receptores inhibidores y coestimulantes. Los ligandos coestimulantes en células presentadoras de antígenos (APC) desencadenan moléculas de receptor específico en células T, con potenciación resultante de proliferación de células T, secreción de citocinas y diferenciación. En cambio, la unión de moléculas de ligando inhibidor a contrarreceptores específicos en linfocitos T disminuye el funcionamiento efector induciendo falta de respuesta de células T o muerte celular programada (PCD) (también denominada apoptosis). Los experimentos que demuestran una actividad inhibidora aumentada en presencia de bloqueo de coestimulantes sugieren interacciones en la ruta de receptores inhibidores y coestimulantes.

30 La proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico (CTLA-4 (CD 152)) es una molécula de receptor inhibidor que se expresa sobre la superficie de linfocitos T activados. Tras el acoplamiento con los ligandos B7-1 (CD80) y/o B7-2 (CD86) residentes en APC, el contrarreceptor CTLA-4, por medio de fosfatasa SHP-2 asociada, inhibe la activación de células T. En células T activadas, CTLA-4 existe como complejos de glicoproteína homodimérica unida con enlaces disulfuro. Una proteína quimérica recombinante, soluble, CTLA-4:inmunoglobulina G (CTLA-4:Ig), demuestra función inhibidora bloqueando de manera competitiva la unión de la molécula CD80/CD86 al receptor CD28 de activación sobre las superficies de células T. CTLA-4:Ig también muestra actividad inmunosupresora en modelos animales de rechazo de injerto y enfermedad autoinmunitaria bloqueando la coestimulación de células T mediante CD28. Además, la señalización de la supervivencia de células T intracelular mediante CD28 se antagoniza mediante tratamiento de APC con CTLA-4:Ig, lo que puede aumentar la susceptibilidad a PCD dependiente de Fas. La acción de CTLA-4, así como proteínas de fusión CTLA-4:Ig, se comentan en las patentes estadounidenses n.ºs 5.885.776; 5.885.579; 5.851.795 y 5.968.510.

45 La apoptosis (o PCD) es una forma diferenciada de muerte celular que es esencial para la regulación de la homeostasis celular. En el sistema inmunitario, el receptor Fas (CD95) y su ligando, FasL (CD95L), participan en diversos procesos implicados en la inducción de apoptosis, incluyendo citotoxicidad mediada por células inmunitarias, y en la regulación de respuestas inmunitarias celulares. FasL es un miembro de la superfamilia de factor de necrosis tumoral y se expresa por un subconjunto limitado de células inmunitarias, incluyendo monocitos, células NK y células B y T activadas. Sobre la superficie celular, FasL está orientado como una proteína de membrana de tipo II dentro de complejos triméricos. La escisión mediante metaloproteínasa de FasL asociado a la membrana libera trímeros de FasL soluble (sFasL) de la membrana. La molécula de FasL desencadena la PCD dependiente de Fas.

50 La valencia de una molécula o complejo molecular puede aumentarse mediante asociación con la superficie celular. Diferentes secuencias codificantes de moléculas de sFasL recombinantes afectan a la agregación macromolecular y, a su vez, afectan a la función proapoptótica de sFasL. En particular, una molécula de sFasL procesada de manera natural forma trímeros e induce escasamente la apoptosis. En cambio, un polipéptido de sFasL de dominio extracelular de longitud completa recombinante forma agregados de orden superior y presenta una actividad apoptótica sumamente potente. Además, los complejos de sFasL producidos mediante expresión recombinante en células 293 humanas requieren reticulación para la lisis de células sensibles a Fas.

La patente estadounidense n.º 5.830.469 da a conocer anticuerpos monoclonales y proteínas de unión que se unen específicamente a antígeno Fas humano; se notifica que algunos de los antígenos y anticuerpos estimulan la

proliferación de células T, inhiben la lisis de células mediada por anticuerpo monoclonal CH-11 anti-Fas y bloquean la lisis de células mediada por ligando de Fas. También se dan a conocer proteínas de fusión Fas-Fc.

Las patentes estadounidenses n.ºs 5.242.687; 5.601.828 y 5.623.056 dan a conocer diversas proteínas de fusión que contienen un componente de CD8 que se une a una célula pero no enmascara una señal producida por la célula.

5 La patente estadounidense n.º 5.359.046 da a conocer proteínas quiméricas compuestas por un dominio extracelular que puede unirse a un ligando de una manera no limitada por el MHC, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que puede activar una ruta de señalización. Se da a conocer una tecnología similar en la patente estadounidense n.º 5.686.281.

10 Aunque la técnica describe métodos de transferir moléculas inmunorreguladoras a células, así como diversas proteínas quiméricas, nada en la técnica enseña el uso de proteínas que combinan las dos características de las presentes proteínas quiméricas. Más específicamente, ninguna proteína quimérica notificada en la técnica se ha diseñado para funcionar como proteína de bloqueo y como proteína de señalización. De hecho, nada en la técnica enseña o incluso sugiere tal resultado, o que tal resultado sea deseable. Estas proteínas tienen aplicación significativa en el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario y otras enfermedades.

15 Sumario de la invención

La presente invención proporciona proteínas quiméricas novedosas que incorporan, gracias a sus elementos proteicos componentes, tres características únicas: la capacidad de unirse a la superficie de una primera célula; la capacidad de provocar una disminución en una señal trans normal de la primera célula; y la capacidad de enviar una señal trans diferente a una segunda célula. La unión a la primera célula sirve para localizar la proteína quimérica en la célula. La proteína quimérica puede diseñarse para interferir con o "bloquear" señales trans normalmente enviadas por la molécula de "anclaje" en la primera célula. Además, la proteína quimérica puede diseñarse para enviar su propia señal trans a una segunda célula. Por tanto, la misma proteína quimérica puede servir para bloquear o enmascarar o de otro modo interferir con un tipo de señal al tiempo que confiere un segundo tipo de señal. Las presentes proteínas quiméricas pueden incorporar otras características útiles, tales como etiqueta de epítopos y/u otros elementos proteicos o no proteicos que confieren propiedades biológicas o ventajas terapéuticas adicionales, tales como semivida de proteína recombinante aumentada *in vivo*, facilidad de purificación mediante cromatografía de afinidad u otros métodos bioquímicos, y facilidad de detección de proteínas *ex vivo* e *in vivo* mediante elementos basados en anticuerpos u otros elementos de unión. Las proteínas quiméricas de la presente invención pueden configurarse de numerosas maneras para lograr las capacidades deseadas. Por ejemplo, el uso de una segunda proteína inhibidora hace que las presentes proteínas sean adecuadas para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario, tales como enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias, mientras que el uso de un elemento de señalización trans estimulante dentro del segundo componente de proteína hace que las presentes proteínas quiméricas sean adecuadas para el tratamiento de enfermedades en las que se necesita estimulación de células inmunitarias, tales como cáncer y enfermedades infecciosas.

35 La presente solicitud da a conocer además métodos para preparar las presentes proteínas quiméricas, y usos de estas proteínas en el estudio y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias. También se dan a conocer otros usos para estudiar y tratar enfermedades auto y aloinmunitarias. Hay realizaciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

40 Por tanto un aspecto de la invención es proporcionar proteínas quiméricas novedosas que tienen la doble capacidad tanto de bloquear una señal como de enviar otra.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar proteínas quiméricas para el estudio y el tratamiento de trastornos y enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias, y el estudio y el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas.

45 Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 (A-D) demuestra la actividad citotóxica de CTLA-4-FasL, la potenciación de la actividad de CTLA-4-FasL mediante adición de células que expresan CD80/CD86, la dependencia de la actividad inhibidora de CTLA-4-FasL del componente FasL de la proteína quimérica, y la falta de requisito de CTLA-4-FasL por reticulación de anticuerpo (al contrario que B2M-FasL), determinado según el ejemplo 1.

La figura 2 (A-C) demuestra que las células tratadas previamente con CTLA-4-FasL adquieren la capacidad de desencadenar citotoxicidad de células sensibles a Fas, de una manera dependiente del contacto celular, determinado según el ejemplo 2.

55 La figura 3 (A-C) demuestra la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humanas, en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3, mediante CTLA-4-FasL,

determinado según el ejemplo 3.

La figura 4 demuestra la capacidad de CTLA-4-FasL para inhibir una respuesta proliferativa específica de antígeno frente a antígeno del tétanos, determinado según el ejemplo 4.

5 La figura 5 demuestra la capacidad de CTLA-4-FasL para inhibir respuestas proliferativas específicas frente a aloantígeno en cocultivo de linfocitos mixtos primarios y secundarios, determinado según el ejemplo 5.

La figura 6 demuestra la capacidad de CTLA-4-FasL para inhibir la proliferación de esplenocitos Balb/c en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3, determinado según el ejemplo 6.

La figura 7 demuestra la inhibición de la proliferación de PBMC en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3 mediante CTLA-4-TRAIL y CD27-TRAIL, determinado según el ejemplo 7.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una proteína quimérica tal como se define en la reivindicación 1, que comprende una primera proteína que se une a una primera célula, y mediante esta unión interfiere funcionalmente con una señal que emana de esta célula, y una segunda proteína que envía una señal diferente a una segunda célula. La "interferencia" es una disminución en una señal trans normalmente transmitida por la primera célula. En una realización preferida, la primera proteína es una que bloquea directamente o enmascara una señal enviada por la primera célula, también denominada en el presente documento célula de "anclaje". Las presentes proteínas quiméricas pueden unirse a la célula de anclaje de una manera cuantitativa. Es decir, la cantidad de proteína quimérica que se unirá a las células de anclaje se evaluará midiendo la cantidad de proteína quimérica marcada con radioisótopo, o marcada de otro modo, unida a las células de anclaje. La cantidad máxima de proteína quimérica que se une a células de anclaje estará dictada por la cantidad de la proteína u otra molécula que reside en las células de anclaje a las que se une la proteína quimérica.

La primera proteína puede seleccionarse para dirigirse a un tipo o población particular de células de anclaje. De manera similar, la segunda proteína puede seleccionarse para dirigirse a un tipo o población particular de células que reciben una señal trans de la proteína. Puede seleccionarse como diana una variedad de moléculas de superficie en las células primera y segunda incluyendo proteínas y glicolípidos. La flexibilidad y la utilidad de la presente invención no surgen sólo de la capacidad de las proteínas quiméricas para dirigirse a una diversidad de tipos de células diferentes. Ya que el fenotipo molecular de la superficie de células individuales puede experimentar cambios con el tiempo, como consecuencia de cambios en su medio molecular y celular (que dictan transiciones en sus estados metabólicos, proliferativos y/o de diferenciación, por ejemplo), pueden diseñarse proteínas quiméricas que se unen selectivamente a tipos de células primero (de anclaje) y segundo dados cuando presentan perfiles moleculares de superficie especificados. Por tanto, las proteínas quiméricas de la presente invención no sólo pueden distinguir diferentes tipos de células, sino también el mismo tipo de célula en diferentes estados celulares, combinando así selectividades temporal y espacial.

Las presentes proteínas quiméricas pueden configurarse de varias maneras para lograr una diversidad de criterios de valoración funcionales, dependiendo de las necesidades y los deseos del usuario. Para ello, las proteínas quiméricas pueden configurarse para contener más de dos componentes de proteína. Por ejemplo, las proteínas pueden contener dos o más componentes de señalización trans, en las que cada componente es el mismo o diferente, y/o pueden contener etiquetas de epítopos, y/u otros elementos proteicos o no proteicos que confieren propiedades especiales, tales como estabilidad aumentada, facilidad de purificación mediante métodos de cromatografía de afinidad u otros métodos bioquímicos, facilidad de detección de proteínas *ex vivo* e *in vivo* mediante elementos basados en anticuerpos u otros elementos de unión, capacidad de asociarse con otras moléculas mediante elementos tales como cremalleras de leucina, y capacidad de escisión con agentes tales como proteasas. Los componentes de proteína primero y segundo de las proteínas quiméricas de la presente invención pueden derivarse de proteínas de membrana o bien de tipo I o bien de tipo II, es decir, proteínas cuyos extremos amino-terminales están en los lados o bien extracelular o bien intracelular de la membrana celular. Adicionalmente, los componentes de proteína primero y segundo pueden derivarse de proteínas que son solubles de manera natural.

Cualquier célula puede seleccionarse como diana como célula de anclaje y segunda célula que recibe la señal trans. De nuevo, las proteínas primera y segunda pueden configurarse para dirigirse al tipo de célula apropiado para el tratamiento de la enfermedad particular o para el objetivo particular deseado. Por ejemplo, las combinaciones de primera célula/segunda célula pueden incluir células presentadoras de antígenos (APC)/células T, células T/células T, células T/células B, células endoteliales/células hematopoyéticas, células cancerosas/células cancerosas, células normales/células cancerosas, células cancerosas/células normales, etc. Se apreciará que esta lista es simplemente representativa y no es exhaustiva de todas las posibles combinaciones de primera célula/segunda célula.

55 Puede usarse cualquier primera proteína adecuada según la presente invención, siempre que la proteína se una a la superficie de una célula, y mediante este acontecimiento de unión conduzca a una disminución en una señal trans particular que emana de la célula. Según una realización de la presente invención, la disminución en la señal trans resulta del enmascaramiento directo, o "bloqueo competitivo", de los elementos estructurales proteicos dentro de la proteína de señalización trans de la célula de anclaje que normalmente entran en contacto con el contrarreceptor en

la segunda célula, es decir, el sitio de contacto. Según otras realizaciones de la presente invención, la disminución en la señal trans puede resultar de mecanismos indirectos. Esto incluye, pero no se limita a, una realización en la que la disminución en la señal trans puede resultar de la "inhibición alostérica" de la proteína que media la señal trans normal, uniéndose la primera proteína de la proteína quimérica a un sitio en la proteína de señalización trans de la célula de anclaje que es distinto del sitio o los sitios que entran directamente en contacto con el contrarreceptor en la segunda célula. Dado que algunas moléculas de señalización trans naturales son realmente complejos multimoleculares, la primera proteína de la proteína quimérica de la presente invención puede unirse a una proteína u otro componente molecular del complejo multimolecular, y mediante esta unión interferir con la señalización trans de otro componente molecular del complejo, en otra realización de la presente invención. En aún otra realización, la primera proteína de la proteína quimérica de la presente invención puede desencadenar una ruta de señalización intracelular dentro de la célula de anclaje que da como resultado la disminución de la señal trans. Por tanto, una característica única de la primera proteína de la proteína quimérica de la presente invención es que disminuye o elimina una señal trans natural mediante uno cualquiera de varios mecanismos directos y/o indirectos, incluyendo los ejemplos el bloqueo competitivo, inhibición alostérica, alteración de complejos de señalización trans multimoleculares funcionales y modificación funcional de la primera señal mediante señalización intracelular.

Las primeras proteínas pueden elegirse para provocar una disminución en una cualquiera de varias señales trans que surgen de una variedad de tipos de células o células en diferentes estados funcionales. En una realización, la primera proteína bloquea un coestimulante sobre la superficie de una APC. Los bloqueadores de coestimulantes preferidos incluyen las moléculas receptoras de coestimulantes CTLA-4, CD27 e ICOS. Se sabe que CTLA-4 se une a, y así bloquea, los coestimulantes B7, incluyendo B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), de APC. CD27 se une al coestimulante CD70. ICOS se une al coestimulante B7-h. En otra realización, la primera proteína bloquea una molécula inhibidora sobre la superficie de una célula. Los bloqueadores preferidos de moléculas inhibidoras incluyen Fas y DcR3, un análogo de Fas soluble de manera natural, que puede interferir con la unión del ligando de Fas inhibidor al receptor Fas en una segunda célula.

La primera proteína no se limita a derivados solubles de contrarreceptores de superficie celular nativos para moléculas de señalización trans. También pueden usarse citocinas solubles como primera proteína en las presentes proteínas quiméricas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β), sustancia inhibidora mulleriana (MIS) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). En este contexto, las citocinas no sólo sirven para dirigir la proteína quimérica a la célula de anclaje apropiada (que lleva el receptor de citocina relevante), sino que simultáneamente desencadenan una ruta de señalización dentro de la célula de anclaje que altera su(s) estado(s) metabólico, proliferativo y/o de diferenciación, junto con su repertorio de señalización trans. Por tanto, en una realización, la primera proteína se dirige a un receptor de citocina en una célula cancerosa. Los receptores de TGF-beta son dianas preferidas en células cancerosas, ya que están presentes en una variedad de tipos de células cancerosas. En carcinomas de ovario, por ejemplo, los receptores de TGF-beta pueden desencadenar disminuciones en la proliferación celular. Aún otra diana preferida son los receptores de factor de crecimiento de hepatocitos, que se encuentran en carcinomas de mama y de ovario, así como gliomas malignos.

El derivado de polipéptido monocatenario que comprende la región Fv de una molécula de inmunoglobulina (scFv), por ejemplo de una molécula de inmunoglobulina IgG1, también puede usarse como primera proteína. Los ejemplos específicos de scFv incluyen unos con especificidades para receptores de citocinas y otros (por ejemplo, HER-2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), CD33 y AIRM1. Los receptores de HER-2/neu son otra diana preferida en células cancerosas, ya que se encuentran en carcinomas epiteliales de mama y de ovario. CEA se expresa altamente en tumores gastrointestinales, incluyendo cáncer de colon, y se le han atribuido propiedades inmunoinhibidoras. PSA se expresa altamente por la mayoría de los carcinomas de próstata epiteliales. CD33 y AIRM1 son miembros de la familia de sialoadhesina expresados en células de los linajes mielomonocíticos. La ligación de CD33 o AIRM1 en células de leucemia mieloide crónica con anticuerpos disminuye la supervivencia y la proliferación celular.

De manera similar, puede usarse cualquier segunda proteína adecuada, siempre que la proteína pueda enviar una señal a una segunda célula, es decir una señal trans, que es distinta de la señal trans alterada por el primer componente de proteína de la proteína quimérica. La segunda proteína puede ser una proteína que envía una señal inhibidora, una proteína que envía una señal activadora, o una proteína que altera una cualquiera de un gran número de propiedades biológicas de la segunda célula, incluyendo su estado metabólico, proliferativo o de diferenciación. Un ejemplo preferido de una proteína inhibidora es el ligando de Fas (FasL). Se sabe que FasL se une a, y de esa manera activa, receptores Fas en células T activadas. Otros ejemplos de proteínas inhibidoras son TRAIL, TWEAK, CAR, CD8, PP14, BAFF/TALL-1/THANK/BLys, PD-1 y RCAS1. Un ejemplo preferido de una proteína activadora es B7-1 (CD80), que puede usarse para suministrar señales trans activadoras a células T. Otros ejemplos de proteínas activadoras son B7-2 (CD86), B7-h, CD40L (CD154), CD30L, OX-40L (CD134L), 4-1BBL (CD137L), CD70, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-3 (CD58), HSA (CD24), LIGHT, SLAM, linfotoxina y una cualquiera de un gran número de quimiocinas bien conocidas. Ejemplos de factores de proteínas de diferenciación son TRANCE, c-KitL/SCF, IL-3 y GM-CSF. Los ejemplos mencionados se extraen ampliamente de proteínas relevantes para los sistemas inmunitario y hematopoyético, y por tanto sólo representan un pequeño subconjunto de las proteínas a las que puede recurrirse como segundas proteínas dentro de las proteínas quiméricas de la presente invención.

Una proteína quimérica preferida de la presente invención es CTLA-4-FasL. La quimerización genética de CTLA-4 con secuencias de FasL y la expresión recombinante da como resultado "proteínas conversoras de señal trans" CTLA-4-FasL quiméricas que demuestran características estructurales y funcionales que pueden atribuirse tanto a CTLA-4 como a FasL. La comparación de la potencia de polipéptidos de FasL quiméricos solubles y asociados con células revela un aumento significativo de la función tras la asociación con la superficie celular. Las células previamente tratadas con CTLA-4-FasL adquieren la competencia para mediar la función efectora dependiente de Fas. La función de células T patógenas puede eliminarse usando proteínas quiméricas CTLA-4-FasL para simultáneamente bloquear la coestimulación por B7 de células T mediante APC, interfiriendo así con una ruta de activación y supervivencia celular principal, y desencadenar la señalización mediada por Fas en células T, dando como resultado muerte celular programada en algunos casos. Por tanto, CTLA-4-FasL proporciona un medio para expresar FasL mediante suministro exógeno y para recubrir selectivamente células que expresan CD80 o CD86 dentro de una población de células mixtas. Además, el ejemplo particular de CTLA-4-FasL demuestra que los derivados funcionales de proteínas de membrana de tipo II (en este caso FasL) están especialmente bien adecuados para las proteínas quiméricas de la presente invención.

Las presentes proteínas pueden existir de numerosas formas. Por ejemplo, las presentes proteínas pueden estar en forma de un polipéptido lineal o ramificado. Pueden producirse proteínas quiméricas lineales mediante tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, pueden ensamblarse casetes de transcripción quiméricos usando solapamiento de sitio de endonucleasa de restricción o las metodologías de corte y empalme mediante extensión de solapamiento basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Horton, *et al.*, Gene, 77:61-68 (1989)). Se incluyen metodologías específicas en los siguientes ejemplos.

Pueden producirse fácilmente proteínas quiméricas polipeptídicas ramificadas mediante tecnología de péptido sintético ensamblado por molde (TASP) (Mutter, Trends Biochem. Sci. 13:260-265 (1988)). Mediante este proceso, las unidades peptídicas se sintetizan por separado y se acoplan covalentemente en un portador multifuncional, tal como un péptido central, usando reactivos de acoplamiento químico. Por ejemplo, puede usarse como péptido central un análogo decapeptídico cíclico de gramicidina S, en el que dos segmentos de lámina beta antiparalelos (lys-ala-lys) están unidos mediante dos giros beta. Pueden usarse estrategias de condensación de segmentos para fijar las proteínas primera y segunda a los grupos épsilon-amino de las 4 cadenas laterales de lisina.

Las presentes proteínas también pueden existir como dos o más proteínas separadas unidas entre sí mediante un puente, tal como un enlace químico. Por ejemplo, dos o más componentes de proteína pueden unirse de manera covalente directamente entre sí en estructuras ramificadas usando reactivos de reticulación química tales como ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP). Mediante esta metodología, por ejemplo, las proteínas primera y segunda pueden unirse directamente. Las proteínas quiméricas polipeptídicas ramificadas, al contrario que lineales, están particularmente bien adecuadas para interacciones de afinidad inferior, tales como la unión de LFA-1 a ICAM-1, 2 y 3. Además, pueden aplicarse mezclas de proteínas de señalización trans simultáneamente cuando se incorporan en un complejo polipeptídico ramificado. En principio, se espera que los efectos sinérgicos generados por dos o más componentes de señalización trans aumenten la potencia global del complejo en algunos casos.

Las presentes proteínas quiméricas, tal como se indicó anteriormente, también pueden contener uno o más de muchos otros componentes que potenciarán la utilidad de las presentes proteínas quiméricas, particularmente en las áreas de estudio inmunológico, modelos animales, de diagnóstico y de terapia. Por ejemplo, las proteínas pueden diseñarse para contener una etiqueta de epítipo. Una etiqueta de epítipo será particularmente útil en el entorno de laboratorio para facilitar la purificación de las presentes proteínas, para realizar un seguimiento de la ubicación de las proteínas en células o dentro de poblaciones de células y/o para potenciar la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, la secuencia primaria de las proteínas o bien primera o bien segunda puede alterarse mediante estrategias de ingeniería genética para incorporar una etiqueta de epítipo y así facilitar el aislamiento bioquímico de las diversas proteínas. Una alteración particularmente útil es la inserción de dos o más residuos de histidina vecinos. Esta inserción puede ser en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del péptido. La etiqueta de epítipo de polihistidina también puede insertarse en el péptido ligador para las proteínas quiméricas polipeptídicas lineales descritas anteriormente; para polipéptidos ramificados las histidinas pueden insertarse en el péptido central. La inserción de residuos de histidina puede lograrse fácilmente mediante la metodología de corte y empalme mediante extensión de solapamiento, incorporando codones de triplete CAT y CAC que codifican para histidina en los cebadores de PCR en ubicaciones adecuadas en la secuencia codificante. Las proteínas modificadas con histidina pueden aislarse eficaz y cuantitativamente mediante el método de cromatografía en níquel-sefarosa. La interacción histidina-níquel se basa en la protonación, y por tanto esta interacción puede invertirse, para fines de elución de péptidos, mediante un simple desplazamiento de pH. También pueden realizarse otras modificaciones de secuencia primaria, tales como la inserción de aminoácidos reactivos para reactivos de acoplamiento químico específicos. Alternativamente, pueden emplearse estrategias de aislamiento bioquímico más convencionales, incluyendo las basadas en inmunofluorescencia. Otros ejemplos incluyen el epítipo Flag, que permite la reticulación de proteínas, secuencias de marcador y secuencias de visualización. Por ejemplo, pueden incorporarse cremalleras de leucina en las proteínas con el fin de estabilizar complejos dimericos o triméricos.

La presente solicitud también da a conocer tratar a un paciente por una enfermedad que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de las proteínas quiméricas de la presente invención. "Paciente" se refiere a miembros del reino animal, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos. Con respecto a proteínas quiméricas

5 inmunomoduladoras, los tratamientos pueden aplicarse generalmente a pacientes que pueden montar al menos una mínima respuesta inmunitaria. Diversas enfermedades pueden tratarse según la presente descripción, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer, tal como carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de colon, glioblastoma multiforme, carcinoma de próstata y leucemia; infecciones virales, tales como infecciones virales crónicas por VHB, VHCV VLTH-1, VLTH-II, VEB, VHS-I, VHS-II, y VHSK; y enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias, tales como artritis, asma, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de órgano, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, alergia atópica, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, dermatitis alérgica, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, tiroiditis autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedades hepáticas autoinmunitarias y síndromes mielodisplásicos de médula ósea. "Enfermedad" se refiere a cualquier estado canceroso, viral, autoinmunitario o aloinmunitario.

10 Las proteínas particulares primera y segunda usadas variarán dependiendo de la enfermedad que está tratándose. Normalmente, por ejemplo, cuando se trata cáncer o infecciones virales, se usarán segundas proteínas que estimulan respuestas de células inmunitarias. Cuando se tratan trastornos del sistema inmunitario en los que existen respuestas inmunitarias patógenas, se usará una segunda proteína inhibidora. Por tanto, para cáncer y enfermedades virales, se usarán proteínas quiméricas que normalmente convierten señales de transactivación inmunitarias de inhibidoras en activadoras. En el caso de tumores sólidos, las células tumorales dentro del lecho tumoral se convertirán por tanto en "células tumorales inmunogénicas" que pueden funcionar como células de vacuna contra el cáncer generadas *in situ*. El segundo componente de proteína activador inmunitario en este contexto puede dirigirse a diferentes efectores inmunitarios antitumorales, incluyendo células T (tales como células T cooperadoras y células T citotóxicas), células asesinas naturales y células dendríticas (que pueden funcionar como células presentadoras de antígeno en espera para reprocesar y presentar antígenos tumorales). En cambio, para enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias, se recurrirá a proteínas quiméricas que normalmente convierten señales trans inmunitarias de activadoras en inhibidoras. En este entorno, el segundo componente de proteína inhibidor inmunitario puede dirigirse a diferentes efectores inmunitarios patógenos, incluyendo células T, células B, células asesinas naturales y células presentadoras de antígeno.

15 Las proteínas quiméricas de la presente invención pueden usarse para aplicaciones terapéuticas que van mucho más allá de la inmunomodulación en sí misma. Por ejemplo, pueden usarse proteínas quiméricas que modifican la señalización entre células endoteliales y plaquetas para el tratamiento de trastornos trombóticos; entre células del estroma de médula ósea/otros elementos de médula y progenitores hematopoyéticos, para el tratamiento de trastornos hematopoyéticos tales como síndromes mielodisplásicos de médula ósea; entre células tumorales de un tumor dado, para la inducción de inhibición proliferativa y/o muerte celular en estas células tumorales y similares. Normalmente, para cada aplicación de enfermedad, se generará una pequeña "biblioteca" de proteínas quiméricas candidatas y se evaluará comparativamente en modelos *ex vivo* e *in vivo* apropiados y bien establecidos para determinar toxicidades y eficacias relativas. Por ejemplo, en el caso de enfermedades autoinmunitarias, la colección de proteínas quiméricas (o "proteínas conversoras de señal trans") comprenderá aquellas con uno cualquiera de varios receptores de coestimulante (en forma soluble) unidos a uno cualquiera de varios inductores de apoptosis de células T.

20 Aunque una realización preferida de la presente invención implica usar una proteína quimérica terapéutica para tratar a un paciente que necesita dicha proteína, una modalidad de tratamiento alternativa implica usar una secuencia genética que codifica para la proteína quimérica terapéutica de la presente invención. "Secuencia genética" se refiere a un polinucleótido que comprende la secuencia codificante para una proteína definida y secuencias reguladoras y otras no codificantes asociadas. Secuencias genéticas en forma de clones de ADNc están comercialmente disponibles para una amplia variedad de genes. Además, para los clones de ADNc que no están fácilmente accesibles a partir de fuentes comerciales y otras, puede usarse el conocimiento de sus secuencias nucleotídicas para reproducir fácilmente sus ADNc por medio del método de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, incorporando las secuencias génicas relevantes en los cebadores. Este enfoque de terapia génica es especialmente bien adecuado para pacientes que requieren una administración repetida del agente terapéutico, ya que la secuencia genética exógena puede incorporarse en las células del paciente que entonces producirán la proteína de manera endógena.

25 En la técnica se conoce bien una amplia variedad de métodos para administrar genes terapéuticos a pacientes. Estos métodos abarcan una gran cantidad de vectores para suministrar genes terapéuticos, una gran cantidad de elementos reguladores de la transcripción y la traducción que pueden añadirse al gen de interés, métodos para producir y usar esos vectores, métodos para administrar genes y vectores a pacientes, y métodos para monitorizar la toxicidad y eficacia del gen terapéutico. Una realización preferida implica usar una secuencia genética que codifica para una proteína quimérica de la presente invención para su inyección intramuscular. Una vez incorporada en las células del músculo del paciente, la proteína codificada se produce y se secreta de manera sistémica. El uso de terapia génica intramuscular de esta manera para el tratamiento de la autoinmunidad se describe en Chang, J. Gene Medicine, 1:415-423 (1999) y Piccirillo, J. Immunology, 161:3950-3956 (1998). Una realización alternativa implica usar una secuencia genética que codifica para una proteína quimérica para su inyección local directamente en un sitio con enfermedad, por ejemplo, un sitio inflamatorio, tal como una articulación inflamada. Lubberts, j. Immunology, 163:4546-4556 (1999) ilustra la inyección intraarticular directa de un gen terapéutico en una articulación de rodilla con el fin de tratar artritis inducida por colágeno en un animal experimental. De manera significativa, en la técnica se conocen promotores inducibles para regular la expresión del gen transfectado, de modo

que pueden regularse los niveles de la proteína codificada. Los promotores inducibles que pueden regularse con fármacos administrados por vía oral son especialmente útiles en este contexto. Las secuencias genéticas de la presente invención pueden suministrarse a otros órganos, incluyendo hígado, pulmón y piel. Alternativamente, las secuencias genéticas pueden introducirse en células *ex vivo* mediante una cualquiera de varias modalidades de transfección, y estas células transfectadas son adecuadas para su administración a un paciente como células terapéuticas, según métodos bien conocidos en la técnica. El uso de células transfectadas como células terapéuticas de esta manera para el tratamiento de osteoartritis experimental se describe en Pelletier, *Arthritis and Rheumatism*, 40: 1012-1019 (1997), en el que se inyectaron células sinoviales transfectadas de vuelta en articulaciones con enfermedad. Esto también se ilustra por Yasuda, *J. of Clinical Investigation*, 102:1807-1814 (1998), quien describió el tratamiento de diabetes autoinmunitaria con células de islotes transfectadas.

En aún otra realización, puede lograrse una disminución en una señal trans procedente de una primera célula (de anclaje) y conferir una señal trans diferente a una segunda célula usando una combinación de dos o más proteínas quiméricas o no quiméricas que funcionan en unísono. En una realización preferida, una primera proteína quimérica se une a la primera célula, y al hacerlo, causa una disminución en una primera señal trans procedente de la célula. Una segunda proteína quimérica se une a la primera proteína quimérica, y, una vez unida a la primera proteína quimérica en la primera célula, confiere la capacidad de enviar una señal trans diferente a una segunda célula. En esta realización, la primera proteína quimérica sirve como "baliza" que atrae a la segunda proteína quimérica a una célula particular. La primera proteína quimérica está compuesta por al menos dos restos funcionales, uno que ancla dicha proteína a la primera célula (y causa una disminución en una primera señal trans), y el otro que proporciona un sitio al que puede unirse la segunda proteína quimérica de una manera específica. La segunda proteína quimérica también está compuesta por al menos dos restos funcionales, uno que dirige dicha segunda proteína quimérica a la primera proteína quimérica anclada a la superficie celular, y el otro que puede enviar una segunda señal trans a otra célula.

Las proteínas quiméricas primera y segunda son adecuadas para su administración a un paciente de manera simultánea (por ejemplo, como conjugado molecular o como componentes inyectados por separado) o secuencial, una cada vez. Debe resultar evidente que los componentes funcionales críticos de las proteínas quiméricas primera y segunda pueden seleccionarse de los detallados para los componentes de proteína primero y segundo de la proteína quimérica comentada anteriormente. Los componentes adicionales de cada una de las proteínas quiméricas son unidades de reconocimiento emparejadas que unen las proteínas quiméricas primera y segunda. Tales unidades de reconocimiento pueden extraerse de un conjunto diverso de unidades de reconocimiento emparejadas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, una etiqueta de epítipo y un scFv con especificidad por la etiqueta, cremalleras de leucina de auto-asociamiento, y similares.

En aún otra realización, las dos funciones de causar una disminución en una primera señal trans y proporcionar una segunda señal trans se logran usando dos o más proteínas diferenciadas que no interaccionan directamente entre sí, sino que más bien se unen cada una independientemente a la primera célula. Al menos una de las proteínas tendrá la capacidad de enmascarar o interferir de otro modo con una señal de la célula de anclaje, y al menos una de las proteínas tendrá la capacidad de enviar una señal trans a una segunda célula. De nuevo, puede usarse cualquiera de los componentes de proteína primero y segundo comentados anteriormente como proteínas en esta realización.

La presente invención también se refiere por tanto a usos de las proteínas quiméricas de la invención en métodos terapéuticos que comprenden la administración a un paciente de dos o más componentes moleculares que juntos causan una disminución en una primera señal trans de una primera célula y confieren una segunda señal trans de dicha primera célula. "Componentes moleculares" se refiere tanto a proteínas quiméricas como a proteínas no quiméricas. Tal como se comentó anteriormente, cuando los componentes moleculares son ambos proteínas quiméricas, el primero se unirá a la célula de anclaje y el segundo se unirá al primero. Cuando los componentes moleculares son proteínas no quiméricas no se unen entre sí, sino que más bien cada uno se une directamente a la célula de anclaje.

A continuación se proporcionan ejemplos de diversas proteínas quiméricas y las enfermedades y síndromes clínicos tratados por cada proteína. Se entenderá que esta lista no es exhaustiva, sino que más bien es simplemente una pequeña muestra de los tipos de proteínas quiméricas y enfermedades que pueden tratarse usando las proteínas quiméricas según la presente invención.

Proteína quimérica	Categoría de enfermedad
CTLA-4-FasL	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
CTLA-4-TRAIL	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
CTLA-4-TWEAK	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
CD27-TRAIL	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
CD27-TWEAK	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
ICOS-TRAIL	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
ICOS-TWEAK	Enfermedades autoinmunitarias y aloinmunitarias
Fas-c-kit	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea

Fas-GM-CSF	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea
Fas-IL-3	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea
DcR3-c-kit	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea
DcR3-GM-CSF	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea
DcR3-IL-3	Síndromes mielodisplásicos de médula ósea
TGF- β -FasL	Cáncer maligno ginecológico y otros
TGF- β -TRAIL	Cáncer maligno ginecológico y otros
MIS.ligando 4-1BB	Cáncer maligno genitourinario
MIS.ligando OX-40	Cáncer maligno genitourinario
MIS.ligando CD40	Cáncer maligno genitourinario
MIS-CD70	Cáncer maligno genitourinario
HGF-FasL	Cáncer maligno de mama/sistema nervioso central
HGF-TRAIL	Cáncer maligno de mama/sistema nervioso central
scFv(HER-2/neu).ligando 44-1BB	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).ligando OX-40	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).ligando CD40	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).CD70	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).TRANCE	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).TRAIL	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).FasL	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(HER-2/neu).TWEAK	Cáncer maligno ginecológico y otros
scFv(CEA).ligando 4-1BB	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).ligando OX-40	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).ligando CD40	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).CD70	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).TRANCE	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).TRAIL	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).FasL	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(CEA).TWEAK	Cáncer maligno gastrointestinal
scFv(PSA).ligando 4-1BB	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).ligando OX-40	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).ligando CD40	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).CD70	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).TRANCE	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).TRAIL	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).FasL	Cáncer maligno genitourinario
scFv(PSA).TWEAK	Cáncer maligno genitourinario
scFv(CD33 o AIRM1).ligando 4-1BB	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).ligando OX-40	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).ligando CD40	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).CD70	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).TRANCE	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).TRAIL	Cáncer maligno hematológico
scFv(CD33 o AIRM1).FasL	Cáncer maligno hematológico

Tal como se indicó anteriormente, debe usarse una cantidad eficaz de las presentes proteínas en el tratamiento de un paciente. De manera similar, la secuencia genética que codifica para las presentes proteínas debe administrarse en una cantidad suficiente para generar una cantidad eficaz de la proteína. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de las proteínas químicas, suministradas en una o más dosis, necesaria para provocar el resultado deseado en el paciente. Generalmente, el resultado deseado será, por ejemplo, la estimulación de una respuesta inmunitaria o supresión de una respuesta inmunitaria, dependiendo de la enfermedad que está tratándose. En el caso del tratamiento del cáncer, por ejemplo, una cantidad eficaz será la cantidad que protegerá a un paciente frente a crecimiento tumoral o la reducción, si no la eliminación, de tumores. En el caso del tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, aloinmunitaria o viral, una cantidad eficaz será la cantidad que aliviará, si no eliminará, uno o más síntomas de la enfermedad que está tratándose. Por consiguiente, la "cantidad eficaz" puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz, útil para tratar a alguien ya afectado por la enfermedad, o puede ser una cantidad profilácticamente eficaz útil para la prevención, propagación o recidiva de una enfermedad en un paciente. Se apreciará que la cantidad eficaz variará de un paciente a otro paciente dependiendo de factores tales como la enfermedad que está tratándose, la gravedad de la enfermedad, el tamaño del paciente que está tratándose, la capacidad del paciente para montar una respuesta inmunitaria, y similares. La determinación de una cantidad eficaz para un paciente dado está dentro de las habilidades de un experto en la técnica. Normalmente, una cantidad eficaz se determinará evaluando la potencia en sistemas celulares *ex vivo* convencionales, seguido por una evaluación *in vivo* preclínica y clínica y será de entre aproximadamente 0,005 y 0,5 mg/kg de peso corporal.

La administración puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como mediante inyección. Las proteínas quiméricas o no quiméricas o una secuencia génica que codifica para las mismas tal como se describe en el presente documento pueden estar contenidas dentro de un vehículo farmacéutico adecuado para su administración según los presentes métodos. "Vehículo farmacéutico adecuado" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para uso farmacéutico se conoce bien en la técnica. La presente invención contempla el uso de cualquiera de estos medios o agentes, excepto problemas de compatibilidad con las proteínas quiméricas. Una solución salina es un vehículo adecuado.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes que están tratándose, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de proteína quimérica o una secuencia génica que codifica para la misma, o una cantidad eficaz de proteína quimérica o una secuencia génica que codifica para la misma, para producir el efecto deseado en asociación con el vehículo farmacéutico. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas por, y dependen directamente de, la proteína quimérica particular y el efecto particular que debe lograrse por la proteína.

La presente descripción también se refiere a un método para producir un modelo animal para el estudio de la enfermedad dada a conocer en el presente documento. Por ejemplo, hay un conjunto creciente de modelos de enfermedad autoinmunitaria en animales que pueden usarse junto con las proteínas quiméricas de la presente invención. Estos modelos animales incluyen unos en los que la autoinmunidad surge espontáneamente como resultado de mutaciones genéticas que surgieron espontáneamente (por ejemplo ratones NOD diabéticos) o se introdujeron mediante transgénesis, y otros modelos animales en los que la autoinmunidad se induce artificialmente mediante la introducción de un agente patógeno.

Ejemplos

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de la invención de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Construcción de plásmidos y transfección

Se quimerizaron genéticamente dos dominios dirigidos con secuencias que codifican para FasL soluble: secuencia de dominio extracelular de CTLA-4 humana y microglobulina beta 2 humana (B2M). La quimerización de FasL con CTLA-4 dentro de CTLA-4-FasL permite la unión a moléculas B7-1/B7-2 (CD80/CD86) residentes en APC, además de la actividad proapoptótica de FasL. La proteína B2M-FasL soluble se desarrolló como control. Para la expresión de proteínas quiméricas que contienen sFasL, se construyeron plásmidos de expresión recombinantes y se seleccionaron líneas celulares con expresión de células de riñón embrionario 293 humanas transfectadas.

Los ADNc para FasL humano se han descrito anteriormente por Takahashi (1994). Se adquirieron oligonucleótidos sintéticos de Genosys, Inc. (The Woodlands, TX). Se diseñaron cebadores de ADN para sustituir el codón de terminación de B2M humana por un sitio de restricción de Hind III. Los cebadores de ADN para la generación de una secuencia de B2M humana que codificaba para los aminoácidos -20 a 99 de B2M fueron 5'-TTGGGGTACCATGTCTCGCTCCGTGGC-3' y 5'-AAAGGATCCAAGCTTTCCATGTCTCGATCCCATT-3'. Se realizó PCR con ADN polimerasa de Pfu según las especificaciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA), usando pB2M/REP12β (proporcionado por H. Meyerson, University Hospitals of Cleveland) como molde de ADN. Tras la purificación y restricción enzimática, se subclonó el fragmento de ADN Kpn I-Hind III de 360 pb en los sitios respectivos del vector de expresión episomal pCEP9β (Invitrogen, LaJolla, CA), generando pB2MX/CEP9β. Los cebadores de ADN que permitieron la amplificación de secuencias que codificaban para los aminoácidos 127 a 281 de FasL humano fueron 5'-ATCAAGCTTGGAGAAGCAAATAGGC-3' y 5'-TTTTGGATCCTTAGAGCTTATATAAGCCGAA-3'. Tras la purificación y digestión enzimática, se subclonó el fragmento de ADN Hind III-BamHI de 480 pb en los sitios respectivos de pB2MX/CEP9β y pCEP9β, generando pB2M-FasL/CEP9β y pXFasL/CEP9β. Se subclonaron los oligonucleótidos sintéticos parcialmente solapantes 5'-AGCTTAGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTCTGACTACAAGGACGACGA-3' y 5'-AGCTACCTCCTCCAGATCCTCCTCCCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGT-3', junto con la etiqueta de epítipo Flag flanqueada por una secuencia ligadora (GGGS)₂DYKDDDDK(GGGS)₂, en el sitio Hind III de pB2M-FasL/CEP9β, proporcionando pB2M-Flag-FasL/CEP9β. Todos los constructos se confirmaron mediante secuenciación. Se generó pCTLA-4-FasL/CEP9β sustituyendo las secuencias de fragmentos de relleno en pXFasL/CEP9β por el inserto de Hind III que codifica para la secuencia de señal de oncostatina M y secuencias extracelulares de CTLA-4 humana movilizadas desde phCTLA-4:IgG1/REP7β, según el método descrito por Brunschwig, (1995). Se generaron líneas celulares transfectantes mediante introducción de plásmidos de expresión episomal en células 293 con Lipofectin (Life Technologies, Bethesda, MD). Se realizó la selección de líneas celulares estables en medio D10 complementado con G418 (Life Technologies, Bethesda, MD), 0,4 mg por ml, para líneas celulares transfectantes que contienen pCTLA-4-FasL/CEP9β, pB2M-Flag-FasL/CEP9β o pB2M/REP12β. Se recogieron múltiples colonias

individuales y se examinaron para seleccionar la expresión de polipéptido recombinante. Se cuantificó la secreción de las proteínas que contenían sFasL recombinantes por las líneas celulares transfectantes mediante ELISA de FasL soluble comercial (MBL, Cambridge, MA) y oscilaba entre 100-1000 ng/ml.

Cultivo celular

- 5 Las líneas celulares obtenidas de la ATCC (Bethesda, MD) incluyeron líneas de células T humanas transformadas Jurkat, células de riñón embrionario humanas 293, y células B transformadas con VEB Raji y Daudi. La línea de células B transformadas con VEB, JY, la proporcionó Francis V. Chisari (Scripps Institute). Todas las células se mantuvieron en incubadoras humidificadas que proporcionaban CO₂ al 5%. Se obtuvieron medios RPMI-1640 y DMEM con alto contenido en glucosa, antibióticos, glutamina y suero bovino fetal (FBS) de BioWhittaker (Bethesda, MD). Se cultivaron células Jurkat en RPMI-1640 complementado con penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 U/ml, glutamina 2 mM y FBS inactivado por calor al 10% (R10). Se cultivaron células 293 en DMEM complementado con penicilina/estreptomycin 100 µg/ml, glutamina 2 mM y FBS inactivado por calor al 10% (D10). Se prepararon medios condicionados cultivando células durante 5-6 días en medio CellGro Free que contenía penicilina/estreptomycin y L-glutamina (Mediatech). Se eliminaron residuos celulares de sobrenadantes de cultivo celular mediante centrifugación (6 minutos a 400 x g) seguido por filtración a través de filtros de jeringuilla estériles de 22 micrómetros. Se almacenaron sobrenadantes clarificados a 4°C durante dos meses sin pérdida significativa de actividad. Se usó un ELISA de sFasL comercial (MBL, Cambridge, MA) para cuantificar las proteínas que contenían sFasL en muestras.

Inmunotransferencia de tipo Western y cromatografía de filtración en gel

- 20 Las moléculas tanto de FasL como de CTLA-4, en sus formas naturales, forman complejos multiméricos. FasL natural existe como un homotrímero asociado de manera no covalente, y CTLA-4 existe como un homodímero unido con enlaces disulfuro. Para determinar si CTLA-4-FasL forma complejos multiméricos, se realizaron experimentos de inmunotransferencia. Se prepararon muestras de sobrenadante de dos clones de líneas celulares transfectantes de CTLA-4-FasL en presencia o ausencia de agente reductor (2-mercaptoetanol), se sometieron a ebullición y se sometieron a electroforesis en gel-SDS y se sometieron a inmunotransferencia usando antisuero específico para FasL.

- 30 Más específicamente, sobrenadantes de cultivo celular clarificados se concentraron 15-30 veces con dispositivos de ultrafiltración Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA). Se aplicaron muestras concentradas de CTLA-4-FasL a una columna Superdex-200 previamente calibrada en 1 x PBS. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se analizaron funcionalmente usando un ensayo de citotoxicidad. Se concentraron 50 veces fracciones que contenían moléculas de CTLA-4-FasL activas y después se coincubaron con el agente de reticulación químico ditiobis[propionato de succinimidilo] (DSP, Pierce) a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de extinguir con Tris 1 M, pH 7,5. Se prepararon muestras para análisis de SDS-PAGE en tampón de muestra de Laemmli con o sin 2-mercaptoetanol y se sometieron a ebullición antes de cargarlas sobre geles de SDS-PAGE de acrilamida al 10%. Tras la electroforesis, se transfirieron los geles sobre membranas Immobilon P (Millipore, Beverly, MA), se bloquearon con leche al 5%/PBS y se analizaron con antisuero anti-FasL humano (anti-C20, Santa Cruz Biologicals). Tras un lavado exhaustivo, se incubaron las inmunotransferencias con antisuero anti-conejo conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (BioRad, Richmond) y se revelaron con sustrato quimioluminiscente potenciado (New England Nuclear, Boston, MA) antes de la exposición a una película de rayos X.

- 40 Se observaron una banda débil a ~45 kDa y una banda más fuerte a 70-90 kDa con las muestras derivadas de los clones de CTLA-4-FasL en ausencia de agente reductor. La adición de agente reductor provocó la desaparición de la especie molecular de 70-90 kDa y un aumento de la especie de ~45 kDa. No se observó inmunoreactividad de FasL significativa con la muestra de sobrenadante de células 293 de control.

- 45 Para determinar la estequiometría molecular de complejos de CTLA-4-FasL, se reticularon proteínas en los medios condicionados con células transfectantes con el agente de reticulación homobifuncional, reducible, DSP y se analizaron mediante inmunotransferencia usando antisuero específico para FasL. Más específicamente, se incubaron previamente muestras de sobrenadante que contenían CTLA-4-FasL a temperatura ambiente durante 30 minutos con disolvente solo o DSP disuelto en DMSO. Se extinguieron las reacciones con Tris 1 M, pH 7,5; se procesaron las muestras para electroforesis en gel-SDS e inmunotransferencia tal como se describió anteriormente. La inmunodetección de especies moleculares de CTLA-4-FasL de alto peso molecular de 90 kDa y ~180-200 kDa aumentó tras la reticulación con DSP. La reducción parcial de complejos de CTLA-4-FasL reticulados reveló una banda de ~45 kDa, así como bandas que concordaban con complejos dimericos (~90 kDa) y complejos triméricos (~180-200 kDa). En experimentos de reticulación química similares, también se mostró que el monómero de B2M-FasL de ~40 kDa formaba complejos triméricos de ~120 kDa. También se realizó cromatografía de filtración en gel como método independiente para medir el peso molecular de los complejos triméricos de CTLA-4-FasL. Las fracciones de los picos de columna, según se determina mediante ensayo en fase sólida, eluyeron a ~180-220 kDa. La reticulación química de las fracciones de pico seguida por inmunotransferencia con anticuerpos anti-FasL también reveló los complejos de CTLA-4-FasL de 90 kDa y 180-200 kDa. Los análisis de reticulación química y de filtración en gel, tomados en conjunto, muestran que los complejos de CTLA-4-FasL contienen puentes disulfuro intermoleculares e indican una estequiometría molecular trimérica.

Citometría de flujo

Se incubaron previamente las células con diversas diluciones de sobrenadantes de cultivo celular que contenían o bien B2M-FasL o bien CTLA-4-FasL en hielo durante 30 minutos. Se sedimentaron las células y se lavaron dos veces con tampón FACS (1 x PBS / BSA al 0,5%/azida de sodio al 0,02%) y se incubaron en hielo durante 30-45 minutos con 10 µg por ml de anticuerpo primario. Se adquirió anticuerpo específico para FasL humano (CD95L, clon NOK-1) de Pharmingen (La Jolla, CA). Se usó IgG1 de ratón (Dako) como control. Entonces se incubaron las células en hielo durante 30-45 minutos con F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Boehringer Mannheim). Tras los lavados, se hicieron pasar las células marcadas con fluorescencia en un instrumento FACScan, y se seleccionaron poblaciones que excluían yoduro de propidio para su análisis con el paquete de software LYSIS II (Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

Ensayo de citotoxicidad para determinar la actividad apoptótica de las proteínas quiméricas CTLA-4-FasL y B2M-FasL

Para determinar si las proteínas CTLA-4-FasL y B2M-FasL desempeñan un funcionamiento agonista, se sometieron a prueba cultivos de células que contenían proteína para determinar la inducción de apoptosis de células T Jurkat sensibles a Fas. Se midió la apoptosis mediante un ensayo radiométrico de fragmentación del ADN.

Se realizaron ensayos por triplicado, tal como se determina por Matzinger (1991) con algunas modificaciones. Se marcaron células Jurkat en fase de crecimiento exponencial a 37°C durante de 4 a 5 horas con 3 microcurios de ³H-timidina (ICN, Costa Mesa, CA) por ml de medio R10, se sedimentaron y se lavaron dos veces. Se resuspendieron las células a 2 x 10⁵/ml, y se añadieron 0,1 ml de esta suspensión celular a cada pocillo. Se diluyeron sobrenadantes clarificados que contenían CTLA-4-FasL o B2M-FasL en R10, y se añadieron 0,1 ml de estos sobrenadantes por pocillo a placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadió el anticuerpo anti-Flag como agente de reticulación a 0,5 microgramos por ml a las muestras indicadas. Se realizó la incubación previa de células con cantidades definidas de CTLA-4-FasL o B2M-FasL en hielo durante una hora, seguido por centrifugación (6 minutos a 400 x g) y dos lavados con R10. Para ensayos de destrucción célula-célula, se añadieron 10⁴ células efectoras previamente tratadas por pocillo. Se incubaron los cultivos durante la noche a 37°C, y se recogió ADN radiomarcado sobre filtros de vidrio para el recuento por centelleo. En experimentos de bloqueo, se incubaron previamente anticuerpos o bien con células Jurkat (anti-Fas, clon ZB4, Coulter Immunotech) o bien con sobrenadantes que contenían proteína quimérica (anti-FasL). Porcentaje de lisis específica dependiente de Fas = 100 x {(liberación espontánea - experimental) / (liberación espontánea)}. La destrucción máxima osciló entre el 40-70% dependiendo del ensayo. Las proteínas CTLA-4-FasL solubles muestran una citotoxicidad de baja potencia frente a células Jurkat, que se ve potenciada por la coincubación con células Daudi positivas para CD80/CD86 (figura 1A). Se titularon en pocillos sobrenadantes que contenían cantidades conocidas de proteínas CTLA-4-FasL, tal como se indica en el eje de las X de la figura 1A. La ausencia o presencia de células Daudi añadidas se indica mediante círculos blancos y cuadrados negros, respectivamente, en la figura 1A. Tal como puede observarse en la figura, CTLA-4-FasL muestra una destrucción dependiente de la dosis de células Jurkat de 1-100 ng/ml.

La adición de células B de linfoma de Daudi Burkitt, que expresan de manera constitutiva niveles moderados de CD80 y altos niveles de CD86, redujo el límite de detección de apoptosis hasta 0,1 ng/ml de CTLA-4-FasL, potenciando así la actividad citotóxica de CTLA-4-FasL en aproximadamente 60 veces. Otras dos líneas de células B transformadas con VEB, JY y Raji, con perfiles de expresión de CD80 y CD86 similares a las células Daudi, también potenciaron la citotoxicidad por moléculas de CTLA-4-FasL, pero no B2M-FasL (datos no mostrados). Aumentando el número de células Daudi añadidas con CTLA-4-FasL aumentó la actividad citotóxica. Además, la titulación del número de células Daudi añadidas a pocillos reveló un aumento dependiente de la dosis en la muerte de células Jurkat (figura 1B). La razón de células Daudi añadidas a células Jurkat se indica en el eje de las X; los símbolos que representan CTLA-4-FasL a 0,6 ng/ml (cuadrados negros) y B2M-FasL a 1 ng/ml (círculos negros), o medio solo (círculos blancos) se indican en la leyenda de la figura 1B.

La inhibición de la citotoxicidad de CTLA-4-FasL mediante anticuerpos monoclonales antagonistas de Fas y FasL se muestra en la figura 1C. Se incubó previamente CTLA-4-FasL con anticuerpo específico para FasL, anti-FasL (NOK-1) o anticuerpo control de isotipo correspondiente (Leu2a), a 10 microgramos por ml durante 1 hora a 37°C, antes de la adición de células Jurkat radiomarcadas. Para el bloqueo de anticuerpo anti-Fas, se incubó previamente el anticuerpo antagonista ZB4 con células Jurkat radiomarcadas antes del cocultivo en presencia de CTLA-4-FasL a 2 ng/ml. Las barras gris, negra y sombreada representan anticuerpos anti-FasL, anti-Fas y control, respectivamente, representando la barra blanca ningún anticuerpo añadido. Tal como se muestra, la citotoxicidad mediada por CTLA-4-FasL es sensible al bloqueo con anticuerpos monoclonales anti-FasL y anti-Fas, lo que concuerda con un requisito de FasL y Fas para la apoptosis de células Jurkat por esta proteína quimérica (figura 1C).

B2M-FasL requiere reticulación para la citolisis de células Jurkat, tal como se confirma en la figura 1D. Tal como se indica en el eje de las X, se tituló B2M-FasL en pocillos para la evaluación de la citotoxicidad de células Jurkat. Tras 16-20 horas a 37°C, se recogieron cultivos sobre filtros de fibra de vidrio para el recuento por centelleo y se calculó el porcentaje de lisis específica, tal como se muestra en el eje de las Y. Las muestras incubadas en presencia de B2M-FasL más anticuerpo anti-Flag, B2M-FasL más células Daudi, o B2M-FasL sola se representan por los símbolos círculos negros, cuadrados blancos y círculos blancos, respectivamente. Las barras de error representan 1

desviación estándar. Tal como se muestra, no se detectó destrucción significativa de células Jurkat con B2M-FasL sola a lo largo del intervalo de 0,1 a 100 ng/ml, excepto en presencia de un anticuerpo específico marcado con epítipo de reticulación. Por tanto, las células positivas para CD80/CD86 potencian la capacidad de las moléculas de CTLA-4-FasL para señalizar mediante receptores Fas en trans en células Jurkat.

5 EJEMPLO 2

Papel del contacto entre células en la mediación de la actividad efectora trans de CTLA-4-FasL

Los derivados de polipéptido CTLA-4 solubles, tales como CTLA-4-Ig, se unen a células que expresan CD80 y/o CD86. Para someter a prueba si la unión de moléculas de CTLA-4-FasL a células positivas para CD80/CD86 potencia la apoptosis de célula Jurkat, se evaluó la capacidad de CTLA-4-FasL para unirse a células Daudi y Jurkat. Se incubaron previamente células Daudi positivas para CD80/CD86 con sobenadantes celulares que contenían CTLA-4-FasL y se procesaron para inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal específico para FasL o un anticuerpo control de isotipo correspondiente. Más específicamente, la incubación previa se realizó a 0°C durante 30-45 minutos. Tras dos lavados, se incubaron células con anticuerpo anti-FasL (NOK-1, J) o anticuerpo control de isotipo correspondiente (control, E) a 10 mg/ml durante 30-45 minutos a 37°C. Tras dos lavados, se incubaron las células con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Tras los lavados, se realizó la adquisición de datos en un citómetro de flujo FACScan y se analizaron los datos con software CELLQUEST. Se trazan las intensidades fluorescentes medias en el eje de las Y para cada concentración de CTLA-4-FasL, tal como se indica en el eje de las X en la figura 2A. Se observaron aumentos dependientes de la dosis en FasL en la superficie celular tras el tratamiento previo con cantidades crecientes de CTLA-4-FasL (figura 2A, panel superior) y se saturó la tinción a ~100 ng/ml. Un análisis similar de la unión de CTLA-4-FasL a Fas en células Jurkat reveló aumentos dependientes de la dosis en epítipos de CTLA-4 de desde 30-300 ng/ml (figura 2A, panel inferior). Estos resultados concuerdan con las actividades de unión dobles de CTLA-4-FasL; el resto CTLA-4 se une a moléculas de CD80/CD86 y el dominio de FasL se une a receptores Fas.

Se incubaron previamente células Daudi con medio solo o CTLA-4-FasL a 37°C durante 1 hora. Tras tres lavados, se contaron las células y se sembraron en placas en pocillos para un ensayo radiométrico de fragmentación de ADN. Se trazan resultados de porcentaje de lisis específica en el eje de las X. Cuando se sometieron a prueba en ensayos funcionales, las células Daudi previamente tratadas con CTLA-4-FasL indujeron PCD de células Jurkat dependiente de la dosis en comparación con células Daudi no tratadas (figura 2B). La incubación previa de células Daudi con B2M-FasL no dio como resultado citolisis de células Jurkat significativa (datos no mostrados).

Para determinar si se requería contacto entre células para la función efectora citolítica de células Daudi recubiertas con CTLA-4-FasL, se realizaron experimentos de separación de membrana. Se incubaron previamente células Daudi con medio solo, B2M-FasL o CTLA-4-FasL en hielo durante 1 hora. Tras tres lavados, se contaron las células y se sembraron conjuntamente en placas 0,25 x 10⁶ con 0,5 x 10⁶ células Jurkat debajo de membranas semipermeables Transwell con un tamaño de poro de 3 micrómetros en placas de 24 pocillos. También se añadieron 0,5 x 10⁶ células Jurkat encima de las membranas. Tras 16 horas a 37°C, se recogieron las células y se procesaron para citometría de flujo. Se traza el porcentaje de acontecimientos negativos para PI, brillantes para CD3, brillantes para anexina V en comparación con los acontecimientos totales negativos para PI, brillantes para CD3 en el eje de las X en la figura 2C. Tras una incubación de 20 horas, se monitorizó la apoptosis de células Jurkat mediante detección por citometría de flujo de anexina V conjugada con fluorocromo unida. Sólo se observó PCD de células Jurkat significativa en presencia de células Daudi recubiertas con CTLA-4-FasL (figura 2C, panel inferior). La adición de células Daudi previamente tratadas con CTLA-4-FasL debajo de la membrana no tuvo ningún efecto sobre las células Jurkat recogidas de la parte superior de la membrana, lo que concuerda con un requisito de contacto entre células (figura 2C, panel superior). Tal como se esperaba, no se observó ningún efecto sobre la apoptosis de células Jurkat con células Daudi control o células Daudi previamente tratadas con B2M-FasL.

45 EJEMPLO 3

Se sometió a prueba CTLA-4-FasL para determinar la capacidad para inhibir la proliferación policlonal de células T de sangre periférica humanas frente a anticuerpo mitogénico anti-CD3. En placas de cultivo tisular con fondo en U de 96 pocillos, se cultivaron 2 x 10⁵ PBMC/pocillo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recién aisladas de dos donantes individuales con anticuerpo específico para CD3 (OKT3) 1 ng/ml en ausencia o en presencia de diversas cantidades de CTLA-4-FasL purificada por inmunofluorescencia. Se realizaron ensayos por triplicado. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recién aisladas de dos donantes individuales con anticuerpo específico para CD3 (OKT3) 1 ng/ml en ausencia o en presencia de diversas cantidades de CTLA-4-FasL purificada por afinidad. Para comparación, también se titularon 10.000 ng/ml de CTLA-4-Ig y FasL soluble humano recombinante en cultivos paralelos. Tras 36 horas y a intervalos de 24 horas durante tres días adicionales, se pulsaron los pocillos de cultivo con ³H-timidina para marcar el ADN de células T en división activa. 20 horas después, se recogió el ADN radiomarcado sobre filtros de fibra de vidrio y se procesó para recuento por centelleo. Tal como puede observarse en la figura 3A, CTLA-4-FasL 10 ng/ml (cuadrados negros) inhibió fuertemente la proliferación de células T de sangre periférica humanas estimuladas por anticuerpo monoclonal mitogénico anti-CD3. Para comparación, CTLA-4-Ig 10.000 ng/ml (círculos blancos) inhibió la proliferación en aproximadamente el 50% y sFasL 100 ng/ml (triángulos negros) fue mínimamente inhibidor. En el pico (día 3) de

proliferación, se sometió a prueba la inhibición de respuestas de células T policlonales por diversas cantidades de CTLA-4•FasL, CTLA-4•Ig, sFasL. Tal como puede observarse en la figura 3B, CTLA-4•FasL (cuadrados negros) fue un inhibidor significativamente más potente que o bien CTLA-4•Ig (círculos blancos) o bien sFasL (triángulos negros). Dado que la reticulación mediada por anticuerpo de sFasL marcado con Flag con anticuerpo específico para epítipo Flag aumentó la apoptosis de células Jurkat sensibles a Fas, se sometió a prueba la reticulación por anticuerpo para determinar un efecto similar sobre la respuesta proliferativa policlonal frente a anticuerpo anti-CD3. Por tanto, se añadió anticuerpo anti-Flag 0,5 µg/ml en algunos pocillos de ensayo junto con diversas cantidades de sFasL. Tal como puede observarse en la figura 3C (paneles izquierdos), la inclusión de anticuerpo específico de epítipo Flag (sFasL + anticuerpo anti-Flag, triángulos negros) sólo aumentó la inhibición a la concentración superior (1.000 ng/ml) de sFasL sometida a prueba en comparación con sFasL solo (triángulos blancos). Tal como puede observarse en la figura 3C, la combinación de CTLA-4•Ig y sFasL (independientemente de la reticulación de anticuerpo anti-Flag) proporcionó efectos aditivos sobre la inhibición proliferativa. La inhibición máxima requirió la combinación de CTLA-4•Ig 10.000 ng/ml más sFasL 1.000 ng/ml con reticulación por anticuerpo anti-Flag. Por tanto, CTLA-4•FasL es más potente que cualquiera de sus componentes de dominio individuales, CTLA-4•Ig o sFasL, solos o en combinación.

EJEMPLO 4

Se sometió a prueba CTLA-4•FasL para determinar la capacidad para inhibir la proliferación de células T de sangre periférica humanas en respuesta al antígeno específico, toxoide del tétanos. En placas de cultivo tisular de fondo en U de 96 pocillos, se cultivaron 2×10^5 PBMC/pocillo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recién aisladas con antígeno toxoide del tétanos 500 ng/ml en presencia o ausencia de diversas cantidades de CTLA-4•FasL purificada por inmunofinidad. Se realizaron ensayos por triplicado. Tras 6 días, se pulsaron cultivos con ^3H -timidina para marcar el ADN de células T en división activa. 20 h después, se recogió el ADN radiomarcado sobre filtros de fibra de vidrio y se procesó para recuento por centelleo. Tal como puede observarse en la figura 4, CTLA-4•FasL inhibió la proliferación de células T de sangre periférica humanas estimuladas por el antígeno específico, toxoide del tétanos. Por tanto, CTLA-4•FasL es útil para inhibir no solamente la activación policlonal de células T, sino también las respuestas de células T frente a antígenos específicos.

EJEMPLO 5

Se sometió a prueba CTLA-4•FasL para determinar la capacidad para inhibir la respuesta proliferativa de células T de sangre periférica humanas en respuesta a aloantígeno. En ensayos de estimulación primaria, se irradiaron células presentadoras de aloantígeno, la línea de células linfoblastoides B humanas transformadas por virus de Epstein-Barr humano (VEB-LCL), y se añadieron a cultivos que contenían PBMC humanas recién purificadas y CTLA-4•FasL 100 ng/ml. Se realizaron ensayos por triplicado en placas de fondo en U de 96 pocillos y que contenían 10^5 PBMC y 2×10^4 VEB-LCL irradiadas. Se incubaron los cultivos durante 4 días, y se midió la respuesta proliferativa de células T frente a los aloantígenos de VEB-LCL pulsando con ^3H -timidina, recogiendo el ADN radiomarcado sobre filtros de fibra de vidrio y procesando para recuento por centelleo. Tal como puede observarse en la figura 5, la presencia de CTLA-4•FasL, en comparación con medio solo, redujo significativamente la respuesta a aloantígeno primario de células T periféricas humanas. En paralelo con los ensayos de estimulación primaria, se realizaron cultivos masivos a gran escala (10 ml) en matraces T25 con las mismas proporciones de células mononucleares de sangre periférica, VEB-LCL irradiadas, y CTLA-4•FasL 30 ng/ml. Tras siete días, se recogieron las células de los matraces, se lavaron dos veces, y volvieron a cultivarse en medio fresco, carente de CTLA-4•FasL durante 3 días adicionales. 10 días tras iniciar las estimulaciones aloantigénicas primarias, se recogieron las células mediante centrifugación, se lavaron dos veces y volvieron a sembrarse en placas en ensayos de estimulación secundaria en placas de 96 pocillos con VEB-LCL irradiadas. Debe observarse que no se añadió CTLA-4•FasL adicional durante estas estimulaciones secundarias. De manera similar, tal como puede observarse en la figura 5, CTLA-4•FasL redujo la respuesta secundaria de células T periféricas humanas frente al mismo aloantígeno. Por tanto, CTLA-4•FasL es útil para inhibir las respuestas tanto primaria como secundaria frente a aloantígeno, lo que es significativo para su uso terapéutico para tratar respuestas de células T aloantigénicas de huésped contra injerto y de injerto contra huésped.

EJEMPLO 6

Se cultivaron esplenocitos BALB/c murinos recién aislados con anticuerpo mitogénico anti-CD3 en presencia o ausencia de diversas cantidades de CTLA-4•FasL purificada por inmunofinidad. Se realizaron ensayos por triplicado en placas de fondo en U de 96 pocillos y que contenían 2×10^5 esplenocitos y anticuerpo anti-CD3 de ratón (2C11) 33 ng/ml. Tras 24 horas, se pulsaron los cultivos con ^3H -timidina para marcar el ADN de células T en división activa. 20 h después, se recogió el ADN radiomarcado sobre filtros de fibra de vidrio y se procesó para recuento por centelleo. Tal como puede observarse en la figura 6, CTLA-4•FasL inhibe la proliferación de células T BALB/c estimuladas mediante anticuerpo anti-CD3, estableciendo que las células T de ratón, al igual que las células T humanas, son susceptibles de inhibición mediante CTLA-4•FasL.

EJEMPLO 7

Los cebadores de ADN para generar una secuencia de ADNc de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

- humano (hTRAIL), que codifica para los aminoácidos 95-281, fueron 5'-TAAAAAGCTTGAAACCATTTCTACAGTTCAA-3' y 5'-TAAAGGATCCGGTCAGTTAGCCAACTAAAA-3'. Se realizó una PCR con ADN polimerasa de Pfu según las especificaciones del fabricante, usando el subclon de ADN de secuencia de etiqueta expresado (ye16e08.r1, n.º de registro de GenBank T90422) que se sabe que codifica para el ADNc de hTRAIL como molde de ADN. Tras la purificación y restricción enzimática, se subclonó el fragmento de ADN Hind III-BamH I de 564 pb en los sitios respectivos del vector de expresión episomal pCEP9 β , generando pX•TRAIL/CEP9 β . Se generó pCTLA- 4•TRAIL/CEP9 β subclonando el inserto de Hind III que codifica para la señal de oncostatina M y secuencias extracelulares de CTLA-4 humana, movilizadas juntas desde phCTLA-4:IgG1/REP7 β , en el sitio de Hind III de pX•TRAIL/CEP9 β .
- Los cebadores de ADN para generar una secuencia de ADNc de CD27 (hCD27) humana, que codifica para los aminoácidos -20-218, fueron 5'-TTTTGGTACCATGGCACGGCCACATCC-3' y 5'-GCACAAGCTTCTTTGGGGTGGCCAGTG-3'. Se realizó una PCR con ADN polimerasa de Pfu según las especificaciones del fabricante, usando el subclon de ADN de etiqueta de secuencia expresado (EST# yg25h11.r1, n.º de registro de GenBank R25016.1) que se sabe que codifica para el ADNc de hCD27 como molde de ADN. Tras la purificación y restricción enzimática, se subclonó el fragmento de ADN de Kpn I-Hind III de 652 pb en los sitios respectivos del vector de expresión episomal pX•TRAIL/CEP9 β , generando pCD27•TRAIL/CEP9 β .
- Se obtuvieron sobrenadantes de cultivo celular que contenían CD27•TRAIL o CTLA-4•TRAIL a partir de líneas celulares transfectantes estables derivadas mediante lipofección de la línea de células de riñón embrionario humanas, 293, con pCD27•TRAIL/CEP9 β , o con pCTLA- 4•TRAIL/CEP9 β , respectivamente.
- Se cultivaron PBMC humanas recién aisladas con anticuerpo mitogénico anti-CD3, en presencia o ausencia de sobrenadante de cultivo celular condicionado con CD27•TRAIL o CTLA-4•TRAIL diluido 1:300 (v/v). Se realizaron ensayos por triplicado en placas de fondo en U de 96 pocillos y que contenían 2×10^5 PBMC y anticuerpo anti-CD3 (OKT3) 0,3 ng/ml. Tras 24 horas, y cada 24 horas posteriormente durante 3 días adicionales, se pulsaron los cultivos con 3 H-timidina para marcar el ADN de células T en división activa. 20 horas después, se recogió el ADN radiomarcado sobre filtros de fibra de vidrio y se procesó para recuento por centelleo. Tal como puede observarse en la figura 7, tanto CD27•TRAIL como CTLA-4•TRAIL inhibieron fuertemente la proliferación estimulada por anticuerpo anti-CD3 de células T periféricas humanas tras el día 3. Estos datos introducen dos ejemplos adicionales de proteínas quiméricas (CD27•TRAIL y CTLA-4•TRAIL) que sirven para ilustrar adicionalmente la generalidad del concepto de las proteínas quiméricas de la presente invención. Además, demuestran cómo la presente invención permite el rápido diseño, producción y evaluación de proteínas quiméricas funcionales adicionales.
- Tal como se muestra en los ejemplos 1-3, se observó PCD significativa de células Jurkat con la adición de 0,1 ng/ml de CTLA-4-FasL en presencia de células Daudi. A concentraciones superiores de CTLA-4-FasL soluble, no se necesitaron células de reticulación para la inducción de apoptosis de células Jurkat. Estas observaciones contrastan con B2M-FasL, que no presentó efectos citocídicos significativos en ausencia de anticuerpo de reticulación. Los ejemplos 4 y 5 amplían los hallazgos de los ejemplos 1-3, yendo más allá de activadores de células T policlonales para demostrar que CTLA-4-FasL inhibe respuestas de células T específicas, o bien frente a antígeno específico (ejemplo 4) o bien frente a aloantígeno específico (ejemplo 5). El ejemplo 6 muestra además que CTLA-4-FasL humana inhibe respuestas de células T murinas.
- Los ejemplos 1-4 también demuestran que el uso de una secuencia de dominio dirigido como primera proteína, concretamente, el ectodominio de CTLA-4, dirige la unión de sFasL a moléculas diana CD80/CD86 de superficie celular. Por tanto, esto demuestra la eficacia de usar el dominio amino-terminal de una proteína quimérica para el fin del direccionamiento molecular a la superficie celular y el uso de un derivado de proteína de membrana de tipo II como segundo componente de proteína dentro de una proteína quimérica. Esto también demuestra la generación de una proteína quimérica novedosa, CTLA-4-FasL, que media el bloqueo de coestimulación y la actividad efectora trans de FasL cuando se une a APC. Esta modificación basada en célula puede usarse para convertir APC estimulante en APC inmunoinhibidora bloqueando simultáneamente moléculas coestimulantes y presentando moléculas inhibitoras.
- Se demuestran resultados similares en el ejemplo 7 en el que se ha mostrado que dos proteínas quiméricas adicionales, concretamente CTLA-4-TRAIL y CD27-TRAIL, se unen a APC y envían señales trans inhibitoras. Estos hallazgos establecen la generalidad de las proteínas quiméricas novedosas de la presente invención, sin requerirse experimentación excesiva para añadir a la serie de proteínas funcionales en esta clase.
- Estos ejemplos anteriores establecen que las proteínas quiméricas solubles de la presente invención presentan propiedades de unión y funcionales derivadas de los dominios individuales. Además, los datos indican que mediadores quiméricos solubles son útiles para el direccionamiento terapéutico hacia células T patógenas para muerte celular programada.
- Aunque se han descrito anteriormente realizaciones particulares de esta invención para fines de ilustración, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles de la presente invención sin apartarse de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Tykocinski, Mark L. Huang, Jui-Han
 <120> PROTEÍNAS QUIMÉRICAS NOVEDOSAS Y MÉTODOS PARA USAR LAS MISMAS
 <130> 4669-045489
- 5 <140> Documento US 10/169.686
 <141> 31-10-2002
 <150> Documento PCT/US01/00145
 <151> 03-01-2001
 <160> 11
- 10 <170> Microsoftword 2003
 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
- 15 <400> 1
 ttgggtacc atgtctcgct ccgtggc 27
 <210> 2
 <211> 35
 <212> ADN
- 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2
 aaaggatcca agctttccat gtctcgatcc cactt 35
 <210> 3
 <211> 25
- 25 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 atcaagcttg gagaagcaaa taggc 25
 <210> 4
- 30 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 ttttgatcc ttagagctta tataagccga a 31
- 35 <210> 5
 <211> 47
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 agcttagtg gtggtctgg tgggtgtct gactacaagg acgacga 47
 <210> 6
 5 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 agctacctcc tccagatcct cctccctgt catcgtcgtc ctgtagt 48
 10 <210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400>7
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5 10 15
 15 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20
 <210> 8
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 8
 taaaaagctt gaaaccatt ctacagtca a 31
 <210> 9
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 taaaggatcc ggtcagttag ccaactaaaa a 31
 <210> 10
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 ttttggtagc atggcagggc cacatcc 27
 <210> 11

<211> 27

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

5 gcacaagctt cttggggtg gccagtg

27

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica que comprende:

5 una primera proteína que se une a una primera célula y da como resultado la disminución de una primera señal trans de dicha célula y en la que dicha primera proteína se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4, CD27, ICOS, Fas, DcR3, TGF- β , MIS, HGF y un scFv con especificidad para una proteína seleccionada del grupo que consiste en HER-2/neu, CEA, PSA, CD33 y AIRM1; y

10 una segunda proteína que envía una segunda señal trans a una segunda célula en la que dicha segunda proteína se selecciona del grupo que consiste en FasL, TRAIL, TWEAK, CD8, PP 14, BAFF/TALL-1/THANK/BLys, PD-1, RCAS1 y B7-1, B7-2, B7-h, CD40L, CD30L, OX-40L, 4-1BBL, CD70, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-3, HSA (CD24), LIGHT, SLAM, linfotóxina y TRANCE, c-KitL/SCF, IL-3 y GM-CSF; y

en la que las señales trans primera y segunda no son la misma.
2. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que dicha segunda proteína inhibe el sistema inmunitario.
3. Proteína quimérica según la reivindicación 2, en la que dicha segunda proteína se selecciona del grupo que

15 consiste en FasL, TRAIL, TWEAK, CD8, PP14, BAFF/TALL-1/THANK/BLys, PD-1 y RCAS1.
4. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que dicha segunda proteína activa el sistema inmunitario.
5. Proteína quimérica según la reivindicación 4, en la que dicha segunda proteína se selecciona del grupo que

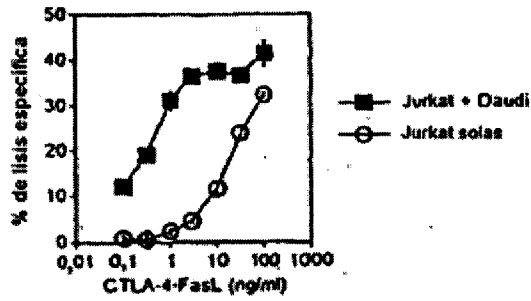
20 consiste en B7-1, B7-2, B7-h, CD40L, CD30L, OX-40L, 4-1BBL, CD70, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, LFA-3, HSA (CD24), LIGHT, SLAM y linfotóxina.
6. Proteína quimérica según la reivindicación 1, en la que dicha segunda proteína se selecciona del grupo que consiste en TRANCE, c-KitL/SCF, IL-3 y GM-CSF.
7. Proteína quimérica según la reivindicación 1, que comprende además una etiqueta de epítipo.
8. Proteína quimérica según la reivindicación 7, en la que dicha etiqueta de epítipo es una etiqueta de

25 polihistidina.
9. Formulación farmacéutica que comprende la proteína quimérica según la reivindicación 1 en un vehículo farmacéutico adecuado.
10. Proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en terapia.
11. Secuencia genética que codifica para una proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones

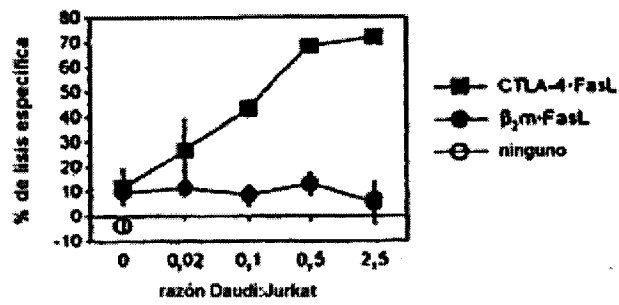
30 1 a 8, para su uso en terapia.
12. Proteína quimérica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método de

35 tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o aloinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en artritis, asma, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de órgano, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, alergia atópica, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, dermatitis alérgica, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica progresiva, tiroiditis autoinmunitaria, diabetes autoinmunitaria, enfermedades hepáticas autoinmunitarias y síndromes mielodisplásicos de médula ósea o para su uso en un método de tratamiento de un cáncer seleccionada del grupo que consiste en carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de colon, glioblastoma multiforme, carcinoma de próstata y leucemia.

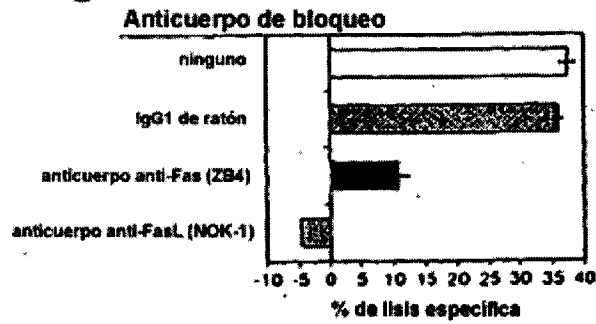
A



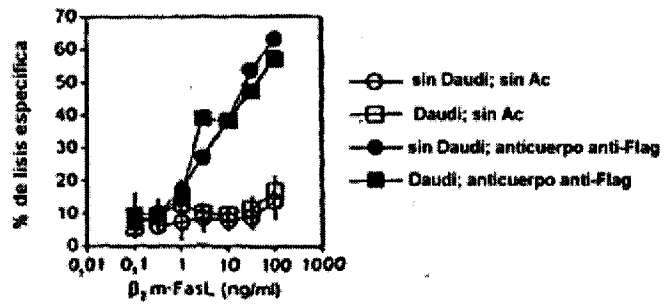
B



C

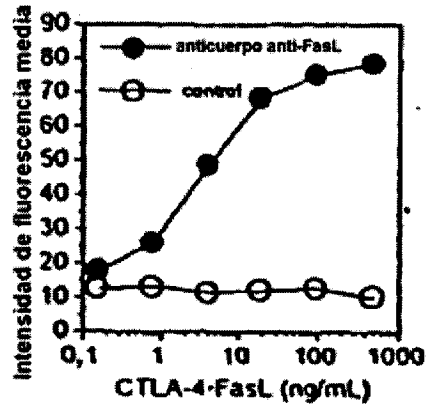
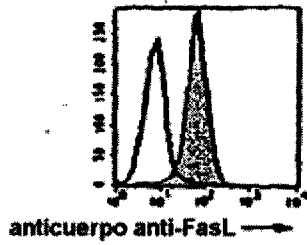


D

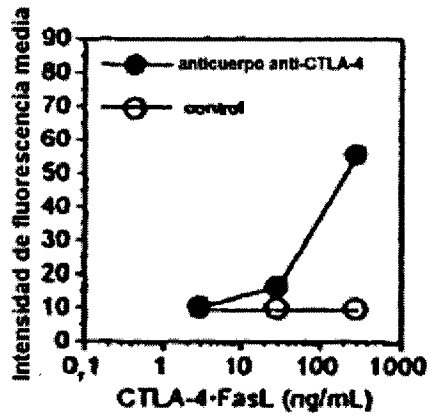
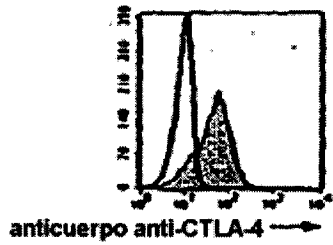


A

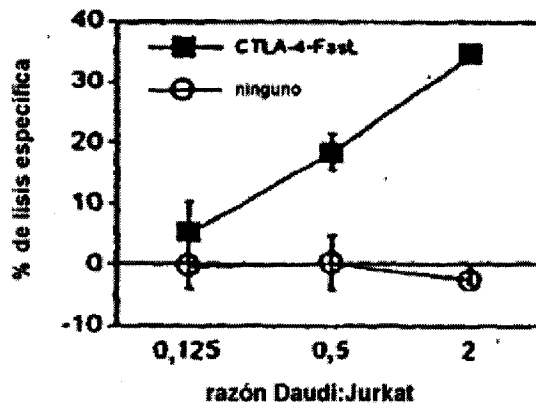
Daudi



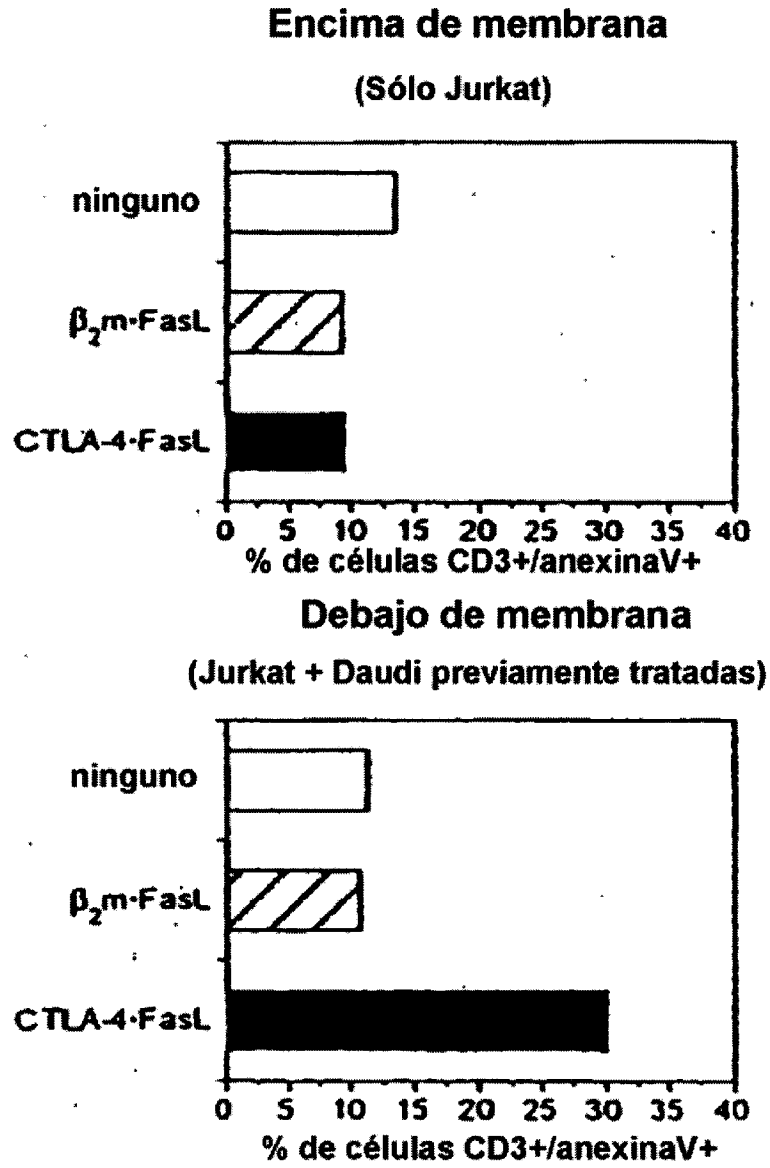
Jurkat



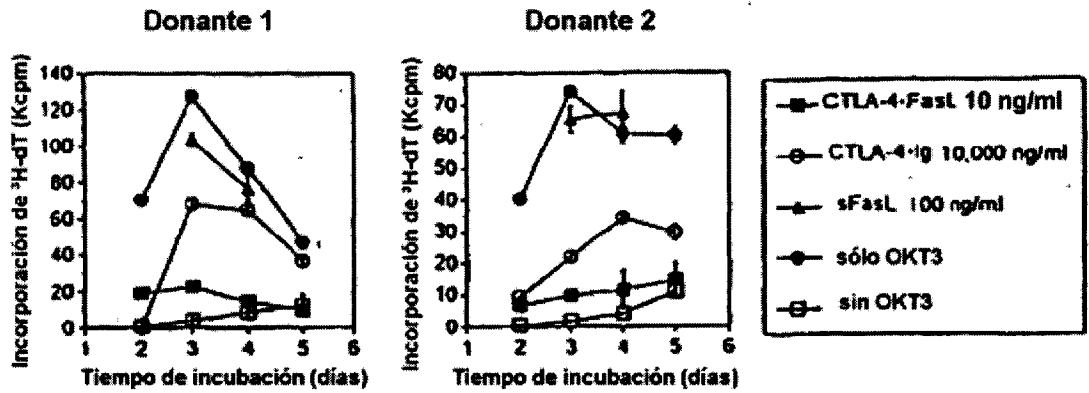
B



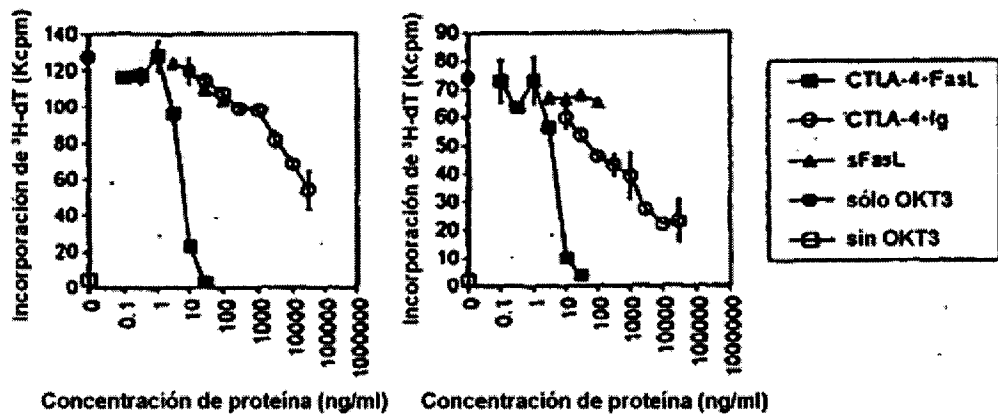
C



A



B



C

