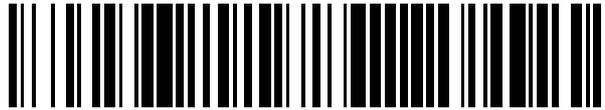


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 067**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2006 E 06770019 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1877090**

54 Título: **Proteína de fusión OX40-inmunoglobulina trimérica y métodos de uso**

30 Prioridad:

06.05.2005 US 678420 P

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

24.04.2014

73 Titular/es:

**PROVIDENCE HEALTH SYSTEM (100.0%)
9205 SW BARNES ROAD
PORTLAND OR 97225, US**

72 Inventor/es:

**WEINBERG, ANDREW, D.;
MORRIS, NICHOLAS, P. y
PETERS, CARMEN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 457 067 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

Proteína de fusión OX40-inmunoglobulina trimérica y métodos de uso

5 Campo

La presente divulgación se refiere a métodos y composiciones para generar respuestas inmunitarias potenciadas en animales, en particular en mamíferos humanos y no humanos. En concreto, la presente divulgación se refiere a una proteína de fusión del ligando de OX-40 trimérica y a métodos para su uso. Más generalmente, la presente divulgación se refiere a proteínas de fusión triméricas que incluyen un dominio de unión al receptor (ligando), un dominio de trimerización y un dominio de dimerización, tal como un dominio Fc de inmunoglobulina.

Antecedentes

15 Numerosas interacciones receptor-ligando están implicadas en la inducción, establecimiento y modulación de las respuestas inmunitarias dirigidas contra los antígenos. Son necesarias al menos dos señales para activar una respuesta de linfocitos T CD4 o CD8 al antígeno (Lenschow et al. (1996) Ann. Rev. Immunol. 14: 233-258). La primera señal se libera a través del receptor de linfocitos T (TCR) por un antígeno (normalmente un péptido) unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA). La segunda señal implica la unión de un ligando presente en la superficie de la CPA a una segunda molécula receptora en la superficie del linfocito T. Esta segunda señal se denomina coestimulación y el ligando de la CPA a menudo se denomina molécula coestimuladora.

25 Durante la activación de los linfocitos T CD4⁺ se libera una coestimulación importante mediante la interacción receptor OX-40/ligando de OX-40. Se ha demostrado que el receptor OX-40 ("OX-40") (Paterson et al. (1987) Mol. Immunol. 24:1281-1290; Calderhead et al. (1993) J. Immunol. 151:5261-5271) solo está presente en los linfocitos T CD4⁺ activados por antígeno *in vivo* (Weinberg et al. (1994) J. Immunol. 152:4712-4721; Wienberg et al. (1996) Nature Medicine 2:183-189) al contrario que el receptor CD28, que está presente en la superficie de muchas subclases de linfocitos T (con independencia de si están activados o no). Por ejemplo, OX-40 está presente en los linfocitos T CD4⁺ activados que reconocen autoantígenos en el lugar de la inflamación en las enfermedades autoinmunitarias, pero no en la periferia. También se ha demostrado que OX-40 está presente en la superficie de un porcentaje de linfocitos T CD4⁺ aislados de linfocitos que se infiltran en tumores y células de ganglios linfáticos drenantes extraídos de pacientes con tumores de células escamosas de cabeza y cuello y melanomas (Vetto et al. (1997) Am. J. Surg. 174: 258-265). Se ha demostrado que el ligando de OX-40, un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) coestimula los linfocitos T que se han activado con un anticuerpo anti-CD3 (es decir, de un modo no específico de antígeno) (Godfrey et al. (1994) J. Exp. Med. 180: 757-762). A pesar del reconocimiento de las propiedades coestimulantes del ligando de OX-40, sus beneficios no se han explotado previamente por completo para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno. El documento US-A-5457035 divulga OX-40L unido a un dominio Fc o a una cremallera de leucina. El documento US 2002 054873 divulga OX-40L unido a un dominio Fc.

Sumario

45 La presente divulgación se refiere a polipéptidos de fusión que incluyen un dominio de ligando, un dominio de trimerización y un dominio Fc de inmunoglobulina, que pueden formar proteínas de fusión multiméricas estables. Se proporcionan composiciones y métodos que son útiles para potenciar y mantener una respuesta inmunitaria de un mamífero a un antígeno. Más específicamente, la presente divulgación proporciona nuevas proteínas de fusión ligandos de OX40 ("OX-40L") así como ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que forman proteínas de fusión ligandos de OX40. La presente divulgación proporciona también métodos de uso de las proteínas de fusión ligandos de OX40 triméricas para potenciar y/o mantener una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto.

La invención se detalla adicionalmente en la descripción, figuras y ejemplos no limitantes expuestos a continuación.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 ilustra esquemáticamente un ejemplo de proteína multimérica, a saber una proteína de fusión OX-40L.

La figura 2 es una imagen de un gel de agarosa que ilustra el inserto Fc/ILZ/OX-40L de tamaño correcto y el vector.

60 La figura 3A es un gráfico de líneas que ilustra la cantidad de polipéptido de fusión eluido en cada fracción de elución tras la unión a una columna de proteína G. La figura 3B es una imagen de un gel de acrilamida al 10 % en condiciones reductoras y teñido con azul de Coomassie, que ilustra una elución máxima en el pico 6-7.

65 Las figuras 4A-D son transferencias de tipo Western que ilustran la unión de IgG antihumana (A y B) y anticuerpos anti-OX-40L antihumanos (C y D) a proteína purificada. A y C ilustran transferencias de geles realizadas en condiciones reductoras, mientras que B y D ilustran transferencias de geles realizadas en condiciones no reductoras.

En cada panel se muestra una dilución en serie.

La figura 5 es una imagen digital de un gel de acrilamida teñido con azul de coomassie que ilustra el perfil de elución en el medio de elución ActiSep.

5 La figura 6 es un gráfico que ilustra los resultados de la cromatografía de exclusión por tamaño de comparación de las proteínas de fusión OX-40L humanas con y sin un dominio de trimerización.

10 La figura 7 es un gráfico que ilustra la proliferación de linfocitos T en respuesta a la exposición a la proteína de fusión OX-40L humana multimérica.

Breve descripción del listado de secuencias

15 Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases nucleotídicas y un código de una letra para los aminoácidos, según se define en el Capítulo 37 del C.F.R. parte 1.822. Solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida en cualquier referencia a la hebra mostrada. Todas las secuencias designadas en el presente documento con el número de registro en GENBANK® hacen referencia a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos accesibles por vía electrónica a partir del 6 de mayo de 2005.

La SEC ID N.º: 1 es la secuencia polinucleotídica de un dominio de unión al receptor OX-40 humano.

25 La SEC ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión al receptor OX-40 humano.

La SEC ID N.º: 3 es la secuencia polinucleotídica de un dominio de trimerización de una cremallera de isoleucina (ILZ).

30 La SEC ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácidos de un dominio de trimerización de una cremallera de isoleucina (ILZ) de Gcn4 mutante de levadura.

La SEC ID N.º: 5 es la secuencia polinucleotídica de un dominio Fc de inmunoglobulina humana.

35 La SEC ID N.º: 6 es la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de inmunoglobulina humana.

La SEC ID N.º: 7 es la secuencia polinucleotídica de un polipéptido de fusión del ligando de OX-40 humano.

La SEC ID N.º: 8 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión del ligando de OX-40 humano.

40 La SEC ID N.º: 9 es la secuencia del ligando de OX-40 indicada con el número de registro en GENBANK® NM 003326.

La SEC ID N.º: 10 es la secuencia de nucleótidos del cebador hFcyl-5'.

45 La SEC ID N.º: 11 es la secuencia de nucleótidos del cebador hOX-40L-3'.

La SEC ID N.º: 12 es la secuencia polinucleotídica de la señal secretora de la proteína BM40 humana.

50 La SEC ID N.º: 13 es la secuencia de aminoácidos de la señal secretora de la proteína BM40 humana.

Descripción detallada

Introducción

55 La invención se define en las reivindicaciones.

60 La unión del receptor OX-40 en los linfocitos T CD4⁺ durante, o poco después, de la sensibilización a un antígeno tiene como resultado un incremento de la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ al antígeno. En el contexto de la presente divulgación, el término "engarce" hace referencia a la unión y estimulación de al menos una actividad mediada por el receptor OX-40. Por ejemplo, el engarce del receptor OX-40 en linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno tiene como resultado un incremento de la proliferación de los linfocitos T en comparación con la respuesta al antígeno solo. La respuesta elevada al antígeno se puede mantener durante un periodo de tiempo sustancialmente mayor que en ausencia de engarce del receptor OX-40. Por tanto, la estimulación a través del receptor OX-40 potencia la respuesta inmunitaria específica de antígeno e incrementa la resistencia a la enfermedad reforzando el reconocimiento por los linfocitos T de los antígenos presentados por agentes infecciosos, tales como bacterias y virus, así como células tumorales.

Los agentes de unión al receptor OX-40 potencian las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en un sujeto, tal como un sujeto humano, cuando se administran al sujeto durante o poco después de la sensibilización de los linfocitos T por un antígeno. Los agentes de unión al receptor OX-40 incluyen el ligando de OX-40 ("OX-40L"), tal como dominios de ligando extracelulares solubles y proteínas de fusión OX-40L; anticuerpos anti-OX-40 (por ejemplo, anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales humanizados) y porciones inmunológicamente eficaces de anticuerpos anti-OX-40. Un ejemplo específico es un nuevo polipéptido de fusión OX40L que se autoensambla en una proteína de fusión OX-40L multimérica (p. ej., trimérica o hexamérica). La proteína de fusión OX-40L multimérica exhibe eficacia incrementada en cuanto a la potenciación de la respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, en particular un sujeto humano, respecto a los polipéptidos de fusión OX-40L descritos previamente. Este incremento de actividad es el resultado de la nueva capacidad de este polipéptido de fusión OX-40L para ensamblarse espontáneamente en trímeros y hexámeros altamente estables. También se describen ácidos nucleicos, incluyendo secuencias polinucleotídicas que codifican dichas proteínas de fusión. Esta divulgación también proporciona métodos para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto usando los polipéptidos de fusión OX-40L multiméricos. Las composiciones y métodos divulgados en el presente documento con respecto a las proteínas de fusión OX-40L se pueden aplicar más generalmente a la producción y uso de proteínas de fusión de unión al receptor multiméricas (p. ej., triméricas y hexaméricas).

20 Resumen de realizaciones específicas

Esta divulgación se refiere a una proteína de fusión OX-40L multimérica que es útil para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto, tal como un sujeto humano. Una proteína de fusión OX-40L trimérica está compuesta por tres polipéptidos de fusión OX-40L, cada uno de los cuales incluye un dominio del ligando de OX-40, un dominio de trimerización y un dominio de dimerización, que es un dominio Fc de inmunoglobulina. El dominio de trimerización estimula el autoensamblaje del polipéptido expresado mediante asociación con otros dos dominios de trimerización para formar un trímero. Tras el ensamblaje de la proteína de fusión OX-40L en un trímero, dos dominios Fc dimerizan y un dominio Fc permanece sin aparear. El dominio Fc no apareado se asocia con un dominio Fc no apareado de una segunda proteína de fusión OX-40L trimérica, que da lugar a una proteína de fusión OX-40L hexamérica estable. Por comodidad, dado que la unidad básica de esta proteína de fusión en un ensamblaje de tres polipéptidos de fusión OX-40L, tanto la proteína de fusión OX-40L trimérica como la hexamérica (formadas a partir de dos proteínas de fusión OX-40L triméricas) se denominan en el presente documento "proteína de fusión OX-40L trimérica".

En una realización, la presente divulgación proporciona un polipéptido de fusión que incluye en una dirección de N-terminal a C-terminal: un dominio de Fc de inmunoglobulina; un dominio que induce trimerización de la proteína de fusión (un "dominio de trimerización"); y un dominio de unión al receptor OX-40 (figura 1). El polipéptido de fusión forma una proteína de fusión OX-40L trimérica tras la expresión, lo que se une a un complejo hexamérico activo, incluyendo dos proteínas de fusión OX-40L triméricas. Dentro de la proteína de fusión OX-40L trimérica, el dominio Fc dimeriza, dejando un polipéptido Fc sin aparear. El dominio Fc sin aparear en el trímero de la proteína de fusión es capaz de interactuar con el dominio Fc sin aparear de otro trímero OX-40L actuando como dominio de dimerización entre dos trímeros de OX-40L y dando como resultado la formación de un hexámero (figura 1 y Holler et al., Mol. Cell. Biol. 23: 1428, 2003). Por tanto, realizaciones de la presente divulgación incluyen polipéptidos de fusión OX-40L que incluyen en una dirección de N-terminal a C-terminal: un dominio de dimerización, un dominio de trimerización y un dominio de unión al receptor OX-40. La proteína de fusión producida mediante el ensamblaje de este polipéptido de fusión puede unirse al receptor OX-40 y estimular al menos una actividad del mismo. Una característica particularmente favorable de esta proteína de fusión OX-40L trimérica es su mayor capacidad (en comparación con los polipéptidos de fusión OX-40L descritos anteriormente) para estimular actividad, por ejemplo proliferación celular, mediada por el receptor OX-40.

En general (aunque no necesariamente), el dominio de unión al receptor OX-40 y el dominio Fc de inmunoglobulina se seleccionan de especies que corresponden a la del sujeto al que se va a administrar la proteína de fusión. Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, se pueden conseguir una eficacia óptima y una inmunogenicidad mínima ("antigenicidad") de la proteína de fusión administrando una proteína de fusión con el dominio de unión al receptor OX-40 y un dominio Fc humano. De un modo similar, por ejemplo, si el sujeto es un animal no humano (p. ej., un mamífero), tal como un ratón, se puede administrar una proteína de fusión formada por polipéptidos que incluyen un dominio de unión al receptor OX-40 y un dominio Fc murino. Asimismo, para cualquier otro sujeto mamífero (p. ej., sujetos veterinarios, incluyendo perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y primates no humanos), los OX-40 y dominios de inmunoglobulinas específicos de especies adecuadas se incluyen en una proteína de fusión OX-40L trimérica.

En una realización, el polipéptido de fusión incluye un dominio de trimerización que es un dominio de cremallera de isoleucina, por ejemplo el dominio de cremallera de isoleucina representado por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 4. En una realización, el dominio de unión al receptor OX-40 es un dominio extracelular de un ligando de OX-40. Por ejemplo, el dominio de unión al receptor OX-40 puede ser el dominio extracelular del ligando de OX-40 humano.

Además del dominio de unión al receptor y el dominio de trimerización, los polipéptidos de fusión divulgados en el presente documento también incluyen un dominio de región constante de inmunoglobulina. El dominio de región constante es normalmente un dominio Fc. Por ejemplo, el dominio de región constante de inmunoglobulina puede incluir un dominio de región constante de IgG (p. ej., los dominios CH2 y CH3), tal como una región Fc de IgG1 humana. Una secuencia de aminoácidos de ejemplo de un dominio Fc de inmunoglobulina se proporciona en la SEC ID N.º: 6.

En una realización, el polipéptido de fusión es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N.º: 8. Los polipéptidos de fusión con una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la SEC ID N.º:8 también se incluyen entre los polipéptidos de fusión divulgados en el presente documento. Por ejemplo, un polipéptido de fusión abarcado por la presente divulgación incluye un polipéptido de fusión con una secuencia que es al menos un 96 % idéntica a la SEC ID N.º: 8. En una realización, el polipéptido de fusión es al menos un 97 % idéntico. En determinadas realizaciones, el polipéptido de fusión es hasta un 98 %, o incluso hasta un 99 % o más idéntico a la SEC ID N.º: 8. Por ejemplo, un polipéptido de fusión que forma una proteína de fusión OX-40L trimérica puede incluir al menos una delección, adición o sustitución de aminoácidos respecto a la SEC ID N.º: 8 (o como máximo 2, 5 o 10 delecciones, adiciones o sustituciones aminoácidos respecto a la SEC ID N.º: 8). Es decir, un polipéptido de fusión puede incluir una delección, adición o sustitución de aminoácidos respecto a la SEC ID N.º: 8 o puede incluir más de una (tal como, dos, tres, cuatro o cinco) delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos respecto a la SEC ID N.º: 8. Normalmente, cuando un polipéptido de fusión tiene una alteración de aminoácidos (delección, adición o sustitución) respecto a la SEC ID N.º: 8, la función o actividad del polipéptido no se altera sustancialmente con respecto a la actividad del polipéptido de fusión representado por la SEC ID N.º: 8. Por ejemplo, cuando hay una sustitución de aminoácido, la sustitución de aminoácido es con la mayor frecuencia una sustitución de aminoácido conservadora.

Otra característica de la divulgación incluye ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido de fusión OX-40L, tal como el polipéptido representado por la SEC ID N.º: 8. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento codifican polipéptidos de fusión OX-40L que poseen la característica deseable de ensamblarse en una proteína de fusión OX-40L trimérica que se puede unir al receptor OX-40 y estimular su actividad. En una realización, el polipéptido de fusión está codificado por un ácido nucleico con la secuencia de polinucleótidos representado por la SEC ID N.º: 7. En otras realizaciones, el polipéptido de fusión está codificado por una secuencia de polinucleótidos que difiere de la SEC ID N.º: 7 en la delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos. Por ejemplo, un ácido nucleico que hibrida en condiciones muy rigurosas con un ácido nucleico con la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º: 7. Normalmente, los ácidos nucleicos son al menos un 95 % idénticos a la SEC ID N.º: 7. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión OX-40L puede ser al menos un 96 % o al menos un 97 %, o con frecuencia al menos un 98 % o incluso un 99 % idéntico a la SEC ID N.º: 7.

Un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión OX-40L de acuerdo con la presente divulgación incluye generalmente en una dirección 5' a 3': una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio Fc de inmunoglobulina, una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de trimerización y una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al receptor OX-40. Los ácidos nucleicos codifican un polipéptido de fusión OX-40L que incluye en una dirección de N-terminal a C-terminal: un dominio Fc de inmunoglobulina, un dominio de trimerización y un dominio de unión al receptor OX-40.

Como se ha tratado anteriormente, generalmente es deseable seleccionar secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos (dominios polipeptídicos) que corresponden a la especie del sujeto al que se van a administrar las proteínas de fusión codificadas. Por tanto, las secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de los dominios proteicos humanos, por ejemplo el dominio de unión al receptor de OX-40L humano y un dominio Fc de inmunoglobulina humana se seleccionan para la administración a un sujeto humano. De un modo similar, se pueden seleccionar secuencias de polinucleótidos que codifican la secuencia polipeptídica hallada en otra especie para administración a un sujeto de esa especie.

Por ejemplo, en una realización, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión OX-40L incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio Fc de Ig humana, tal como un dominio Fc de IgG1 humana. Normalmente, la secuencia de polinucleótidos codifica uno o los dos de un dominio CH2 y un dominio CH3. Por ejemplo, la secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio de inmunoglobulina puede ser la secuencia de polinucleótidos representada por la SEC ID N.º: 5.

El dominio de trimerización puede ser codificado por una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de cremallera de isoleucina, como se ha indicado anteriormente. En una realización, el dominio de trimerización es un dominio de cremallera de isoleucina codificado por la secuencia de polinucleótidos representada por la SEC ID N.º: 3.

Normalmente, el dominio de unión al receptor OX-40 está codificado por una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio extracelular de OX-40L. Por ejemplo, el ácido nucleico recombinante puede incluir la secuencia de polinucleótidos representada por la SEC ID N.º: 1.

Más generalmente, la divulgación se puede aplicar a la producción y uso de proteínas de fusión triméricas que incorporan un dominio de unión al receptor (p. ej., ligando), un dominio de trimerización y un dominio de Fc de inmunoglobulina. Dichas proteínas de fusión se autoensamblan en trímeros (y hexámeros) estables con actividades biológicas potenciadas respecto a otras formas solubles del ligando. Por ejemplo, las proteínas de fusión triméricas que incluyen en una dirección N-terminal a C-terminal: un dominio Fc de inmunoglobulina, un dominio de trimerización y un dominio de unión al receptor. Normalmente, el dominio de unión al receptor incluye uno o más dominios (tales como un dominio extracelular) de un ligando que se une específicamente al receptor. Dominios de unión al receptor de ejemplo que se pueden incluir en proteínas de fusión triméricas incluyen dominios de ligando TNF, tales como dominios de los siguientes ligandos: TNF-a, TNF-b, linfotoxina-b, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, ligando de RANK, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, ligando de GITR, EDA-A1, EDA-A2. Los ácidos nucleicos que codifican estas fusiones triméricas se pueden producir e introducir en vectores, tal como se trata más adelante.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto. El método divulgado en el presente documento implica administrar una proteína de fusión OX-40L trimérica a un sujeto que (o el cual) se ha expuesto a un antígeno. La administración de la proteína de fusión OX-40L trimérica sirve para potenciar la respuesta inmunitaria específica de antígeno (p. ej., la respuesta de linfocitos T específicos de antígeno) al antígeno. El sujeto puede ser un sujeto humano o un sujeto no humano. Normalmente, el sujeto no humano es un mamífero (un sujeto veterinario), tal como un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra o un primate no humano.

En una realización, el sujeto está expuesto al antígeno antes de la administración de la proteína de fusión OX-40L trimérica. Normalmente, si el sujeto se ha expuesto a un antígeno soluble antes de la administración de la proteína de fusión OX-40L trimérica, la proteína de fusión se administra en un plazo de aproximadamente 10 días desde la exposición al antígeno. Por ejemplo, la proteína de fusión OX-40L se puede administrar en un plazo de aproximadamente 7 días, por ejemplo en un plazo de 24 a 48 horas o en un plazo de 3 días, o en un plazo de aproximadamente 7 días tras la exposición al antígeno. La exposición al antígeno se puede realizar de forma intencionada, por ejemplo en forma de una vacuna. Como alternativa, la exposición puede ser inintencionada, tal como una exposición ambiental a un patógeno (tal como una bacteria, un virus o un parásito celular o extracelular) o la aparición de un tumor. En otra realización, la exposición al antígeno y la administración de la proteína de fusión OX-40L trimérica se producen al mismo tiempo. Si la exposición al antígeno y la administración de la proteína de fusión OX-40L trimérica se producen de forma simultánea, la exposición (p. ej., exposición intencionada) y la administración de la proteína de fusión se pueden efectuar en una única formulación o composición farmacéutica. Como alternativa, el antígeno y la proteína de fusión OX-40L trimérica se pueden administrar en formulaciones separadas.

En una realización, la proteína de fusión OX-40L trimérica se administra expresando un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión OX-40L capaz de trimerización en al menos una célula del sujeto. Tras la expresión en la(s) célula(s) del sujeto, los polipéptidos de fusión se ensamblan en la proteína de fusión OX-40L trimérica. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión se puede introducir en una célula (tal como una célula, una población mixta de células o una población purificada de células extraídas del sujeto) ex vivo. Después, la(s) célula(s) que comprenden el ácido nucleico recombinante se introducen en el sujeto en el que se expresa la proteína de fusión OX-40L trimérica. La célula puede ser una célula autóloga extraída del sujeto o la célula puede ser una célula heteróloga, tal como una línea celular (p. ej., una línea celular clasificada por la Colección Americana de Cultivos Tipo, "ATCC").

En otra realización, la proteína de fusión OX-40L se administra introduciendo un vector (tal como un plásmido bacteriano o vector viral), incluyendo un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión, que se ensambla en la proteína de fusión OX-40L trimérica. Por ejemplo, el vector puede ser un vector adenovírico, un vector retrovírico o un vector herpesvírico. Si se usa un vector viral, puede ser un virus atenuado o inactivado, incapaz de replicarse de forma autónoma en las células del sujeto, por tanto, incapaz de producir una infección patológica en el sujeto.

En algunos casos, la célula en la que se introduce el ácido nucleico recombinante que codifica la proteína de fusión OX-40L trimérica es una célula presentadora de antígenos (p. ej., un linfocito B, un macrófago, una célula dendrítica etc.). El antígeno puede ser un antígeno de un agente patógeno, tal como un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno de un parásito o el antígeno puede ser un antígeno tumoral. Si el antígeno es un antígeno tumoral, es decir, un antígeno expresado por o en una célula tumoral, después la célula en la que se introduce el ácido nucleico recombinante que codifica la proteína de fusión OX-40L trimérica puede ser una célula tumoral (tal como una célula tumoral autóloga obtenida, por ejemplo, tras la extracción quirúrgica o biopsia de un tumor primario o metastásico). Como alternativa se puede usar una línea celular tumoral, tal como una línea celular tumoral establecida o inmortalizada. Normalmente, la línea celular se selecciona de modo que corresponda al tipo (es decir, origen, tipo de célula o tejido) de tumor que se va a tratar en el sujeto.

A continuación se proporcionan detalles adicionales sobre las diversas realizaciones.

Términos

A menos que se explique de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que le dan aquellos expertos en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0198542879); Kendrew et al. (eds), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd; 1994 (ISBN 0632-021829); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1560815698).

Las formas del singular "un", "uno" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De un modo similar, con la palabra "o" se pretende incluir "y", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además debe entenderse que todos los tamaños de las bases o los tamaños de los aminoácidos y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para descripción. Aunque materiales y métodos similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o realización de pruebas de esta divulgación, se describen más adelante materiales y métodos adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura, "e. g" (p. ej.) deriva del latín *exempli gratia* y se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por tanto, la abreviatura, "e. g" (p. ej.) es sinónimo de la expresión "por ejemplo".

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos.

El "receptor OX-40" es una proteína (también denominada de forma variada ACT-4 y ACT-35) expresada sobre la superficie de linfocitos T CD4⁺ de mamífero activados por antígeno (Weinberg et al. (1994) *J. Immunol.* 152:4712-4721; Weinberg et al. (1996) *Nature Medicine* 2:183-189; WO 95/12673; Latza et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:677-683). Las secuencias de ADN que codifican homólogos del receptor OX-40 de ratón, de rata y humanos se han clonado y secuenciado (Mallet et al. (1990) *EMBO J.* 9:1063-1068; Calderhead et al. (1993) *J. Immunol.* 151:5261-5271; Latza et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:677-683; documento WO 95/12673). Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para los receptores OX-40 humanos y de ratón se pueden encontrar en GENBANK® con los números de registro NM 003327 y NM 011659 respectivamente.

Se ha encontrado que el "ligando de OX-40" ("OX-40L") (también denominado de forma variada gp34 y ACT-4-L) se expresa sobre la superficie de determinadas células de mamífero, tales como células presentadoras de antígeno ("CPA"). OX-40L se une específicamente al receptor OX-40. La proteína humana se describe en la publicación PCT N.º: WO 95/21915. El OX-40L de ratón se describe en la patente de EE.UU. N.º: 5.457.035. Las secuencias de polinucleótidos y de aminoácidos del OX-40L humano y de ratón están disponibles en GENBANK® con los números de registro NM 003326 y NM 009452, respectivamente. El ligando de OX-40 de origen natural incluye dominios intracelulares, transmembrana y extracelulares. Una forma soluble funcionalmente activa del ligando de OX-40 ("ligando soluble de OX-40") se puede producir delecionando los dominios intracelular y transmembrana como se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.457.035 y 6.312.700 y el documento WO 95/21915. Una forma funcionalmente activa del ligando de OX-40 es una forma que conserva la capacidad de unirse específicamente al receptor OX-40, es decir, que posee un "dominio de unión al receptor" OX-40. Más adelante se tratan métodos de determinación de la capacidad de una molécula o derivado de ligando de OX-40 para unirse específicamente al receptor OX-40. Los métodos para efectuar y usar el ligando de OX-40 y sus derivados (tales como derivados que incluyen un dominio de unión al receptor OX-40) se describen en el documento WO 95/21915 (ant.), que también describe proteínas que comprenden la forma soluble del ligando de OX-40 unida a otros péptidos, tal como regiones Fc de inmunoglobulina ("Ig") humana, que se pueden producir para facilitar la purificación del ligando de OX-40 a partir de células cultivadas o para potenciar la estabilidad de la molécula después de la administración in vivo a un mamífero (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º: 5.457.035).

Como se usa en el presente documento, el término "OX-40L" incluye todo el ligando de OX-40, ligando soluble de XO-40 y porciones funcionalmente activas del ligando de OX-40. Dentro de la definición de OX-40L también se incluyen variantes del ligando de OX-40 cuya secuencia de aminoácidos varía de moléculas del ligando de OX-40 de origen natural pero que conservan la capacidad de unirse específicamente a un receptor OX-40. Dichas variantes se describen en la patente de EE.UU. N.º: 5.457.035 y el documento WO 95/21915 (ant.).

Un "agente de unión al receptor OX-40" es un agente que se une sustancialmente únicamente a un receptor OX-40, por ejemplo un receptor OX-40 presente sobre la superficie de linfocitos T de mamífero activados por antígeno, tal como linfocitos T CD4⁺ activados. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de unión al receptor OX-40" incluye anticuerpos anti-OX-40 y OX-40L. Un "dominio de unión al receptor" OX-40 es un dominio que se une específicamente a un receptor OX-40.

Un "dominio de trimerización" es una secuencia de aminoácidos dentro de un polipéptido que estimula el ensamblaje del polipéptido en trímeros. Por ejemplo, una trimerización puede estimular el ensamblaje en trímeros mediante asociaciones con otros dominios de trimerización (de polipéptidos adicionales con la misma secuencia de

aminoácidos o una diferente). El término también se usa para hacer referencia a un polinucleótido que codifica dicho péptido o polipéptido.

El término dominio "Fc" hace referencia a una porción de una región constante de anticuerpo. Tradicionalmente, la expresión dominio Fc hace referencia a un producto de expresión de proteasa (p. ej., papaína) que abarca las regiones CH₂, CH₃ y bisagra emparejadas de un anticuerpo. En el contexto de la presente divulgación, la expresión dominio Fc o Fc hace referencia a cualquier polipéptido (o ácido nucleico que codifica dicho polipéptido), con independencia del medio de producción, que incluye toda o una porción de las regiones CH₂, CH₃ y bisagra de un polipéptido de inmunoglobulina.

La expresión "anticuerpos anti-OX-40" abarca anticuerpos monoclonales y policlonales que son específicos de OX-40, es decir, que se unen sustancialmente únicamente a OX-40 cuando se evalúan usando los métodos descritos a continuación, así como porciones inmunológicamente eficaces ("fragmentos") de los mismos. Porciones inmunológicamente eficaces de anticuerpos incluyen porciones Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv (para una revisión, véase Better y Horwitz (1989) "Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Immune Disease and the Immune Response" (ICSU Short Reports, Streilein et al. (eds.) vol. 10). En la presente divulgación, porciones inmunológicamente eficaces de anticuerpos incluyen habitualmente un dominio de cadena pesada. Formas humanizadas de anticuerpos anti-OX-40, por ejemplo anticuerpos monoclonales y porciones inmunológicamente eficaces de anticuerpos anti-OX-40 se describen en las publicaciones de PCT N.ºs: WO 95/12673 y WO 95/21915 (ant.), junto con métodos que se pueden usar para producir dichos anticuerpos. Los anticuerpos anti-OX-40 también se pueden producir usando procedimientos estándar descritos en una serie de textos, incluyendo *Antibodies: A Laboratory Manual* by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Más generalmente, un "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina) es una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno. Un anticuerpo de origen natural (p. ej., IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. No obstante, se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de origen natural. Por tanto, estos fragmentos de unión a antígeno también se denominan con el término "anticuerpo". Ejemplos específicos, no limitantes de fragmentos de unión abarcados dentro del término anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H and C_{H1}; (iii) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (iv) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-546) que consiste en un dominio V_H; (v) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada y (vi) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra.

Métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien por los expertos en la técnica y se dispone de muchos anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA y las referencias citadas en el mismo; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY y Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256: 495-497. Otras técnicas adecuadas para la preparación de anticuerpos incluyen la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares. Véanse Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281; y Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546. Anticuerpos monoclonales y policlonales "específicos" y antisueros (o antisuero) normalmente se unirán con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 μM, preferentemente al menos aproximadamente 0,01 μM o mejor y lo más típica y preferentemente, 0,001 μM o mejor.

Las inmunoglobulinas y determinadas variantes de las mismas se conocen y muchas se han preparado en cultivos celulares recombinantes (p. ej., véanse, la patente de EE.UU. N.º: 4.745,055; la patente de EE.UU. N.º: 4.444,487; la publicación PCR N.º: WO 88/03565; las patentes europeas N.ºs: EP 256.654; EP 120.694; EP 125.023; Faoukner et al. (1982) *Nature* 298: 286; Morrison (1979) *J. Immunol.* 123: 793; y Morrison et al. (1984) *Ann Rev. Immunol.* 2: 239). Métodos detallados para la preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) se pueden hallar en la patente de EE.UU. 5.482.856. Detalles adicionales sobre humanización y otras técnicas de producción de anticuerpos y de ingeniería se pueden hallar en Borrebaeck (ed) (1995) *Antibody Engineering*, 2ª Edición Freeman and Company, NY; McCafferty et al (1996) *Antibody Engineering, A Practical Approach* IRL at Oxford Press, Oxford, England; y Paul (1995) *Antibody Engineering Protocols* Humana Press, Towata, NJ.

La abreviatura "ADN" hace referencia a ácido desoxirribonucleico. El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que comprenden ácido ribonucleico ("ARN")). Las unidades en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina, unidas a un azúcar desoxirribosa al que está unido un grupo fosfato. Tripletes de nucleótidos (denominados codones) codifican cada aminoácido en un polipéptido. El término codón también se usa para las correspondientes (y complementarias) secuencias de tres nucleótidos en el ARNm al que se transcribe la secuencia de ADN.

Un "ADNc" o "ADN complementario" es una parte de ADN que carece de segmentos internos, no codificantes

(intrones) y secuencias reguladoras de la transcripción. El ADNc también puede contener regiones no traducidas (UTR) que son responsables del control de la traducción en la correspondiente molécula de ARN. El ADNc se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa desde el ARN mensajero extraído de células.

5 Una célula “transformada” o una célula “huésped” es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Como se usa en el presente documento, el término transformación abarca todas las técnicas por las que se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas. Una célula transformada o célula huésped puede ser una célula bacteriana o una célula eucariota.

15 Un componente biológico “aislado” (tal como una molécula de ácido nucleico o proteína) se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente se produce de forma natural, tales como otros ADN y ARN extracromosómicos y cromosómicos y proteínas. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han aislado incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

20 El término “purificado” no requiere pureza absoluta; en su lugar, se pretende que sea un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de ligando de OX-40 purificado es una en la que el ligando de OX-40 es más puro que el ligando en su ambiente natural dentro de una célula. Preferentemente, una preparación de un ligando de OX-40 se purifica de un modo tal que la proteína ligando de OX-40 represente al menos el 50 % del contenido proteico total de la preparación.

25 Un ácido nucleico “recombinante” es uno que tiene una secuencia que no se da en la naturaleza o tiene una secuencia que está formada por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados. Esta combinación artificial a menudo se consigue mediante síntesis química o, con mayor frecuencia, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo mediante técnicas de ingeniería genética.

30 Los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de una longitud de al menos 10 bases. El término “secuencia” de polinucleótidos hace referencia a la serie de nucleótidos constituyentes que forman un polinucleótido. El término secuencia de polinucleótidos también se usa para hacer referencia a la serie de letras, por ejemplo a, c, g, t, que se usan para representar un ácido nucleico. Un ácido nucleico “recombinante” (p. ej., ADN recombinante) incluye un elemento genético (una secuencia de polinucleótidos) que no está inmediatamente contiguo a ambos elementos genómicos con los que está inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que deriva. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido de replicación autónoma o virus o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota, o que existe como una molécula separada (p. ej., un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

45 Un “vector” es una molécula de ácido nucleico como se introduce en una célula huésped, de modo que produce una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la materia.

50 Un ácido nucleico que regula la expresión de una secuencia de polinucleótidos heterólogos a la que está operativamente unido se denomina “secuencia de control de la expresión” o “secuencia reguladora de la expresión”. Una secuencia reguladora de la transcripción está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando la secuencia reguladora controla y regula la transcripción y según sea adecuado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, las secuencias reguladoras de la transcripción pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de iniciación (es decir, ATG) en frente de un gen codificador de proteína, señales de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen que permita la traducción adecuada del ARNm y codones de terminación. La expresión “secuencias de control” está destinada a incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia puede influir sobre la expresión y pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

60 Un “promotor” es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción de un ácido nucleico. También se incluyen los elementos promotores que son suficientes para hacer controlable la expresión génica dependiente de promotor específica del tipo de célula, específica del tejido, o inducible por señales o agentes externos; dichos electores se pueden localizar en las regiones 5' o 3' del gen. Están incluidos los promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al. *Methods in Enzymology* (1987) 153: 516-544). Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles como el pL del bacteriófago lambda, plac,

ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. En una realización, al clonar en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, la repetición terminal alfa de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vacunal). Los

5 promotores producidos mediante técnicas de ADN recombinante o sintéticas también se pueden usar para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Una primera secuencia de ácido nucleico está “operativamente unida” a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está colocada en relación funcional con la segunda secuencia de

10 ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o a la expresión de una secuencia de codificación. Generalmente, las secuencia de ADN operativamente unidas están contiguas y cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, están en el mismo marco de lectura, por ejemplo, dos dominios o componentes polipeptídicos de una proteína de fusión.

15 Se dice que un polinucleótido “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm para y/o el polipéptido o fragmento del mismo. La hebra antisentido es la complementaria de dicho ácido nucleico y la secuencia de codificación se puede deducir a partir de la misma.

20 Un “polipéptido” es cualquier cadena de aminoácidos, con independencia de la longitud o modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glucosilación o fosforilación), tal como una proteína o fragmento o subsecuencia de una proteína. El término “péptido” normalmente se usa para hacer referencia a una cadena de aminoácidos de entre 3 y 30 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, un péptido inmunológicamente relevante puede tener una longitud de entre

25 aproximadamente 7 y aproximadamente 25 aminoácidos, por ejemplo entre aproximadamente 8 y aproximadamente 10 aminoácidos.

En el contexto de la presente divulgación, un polipéptido puede ser un polipéptido de fusión que comprende una pluralidad de elementos polipeptídicos (o peptídicos) constituyentes. Normalmente, los constituyentes del polipéptido de fusión son genéticamente distintos, es decir se originan de diferentes elementos genéticos, tales como elementos

30 genéticos de diferentes organismos o de diferentes elementos genéticos (componentes genómicos) o de diferentes ubicaciones en un único elemento genético o en una relación diferente a la hallada en su ambiente natural. No obstante, en el contexto de un polipéptido de fusión, los elementos distintos se pueden traducir como un único polipéptido. El término polipéptido de fusión monomérico (o proteína de fusión monomérica) se usa de forma sinónima con una única molécula polipeptídica de fusión para aclarar la referencia a una única subunidad

35 constituyente en la que los polipéptidos de fusión traducidos asumen una estructura terciaria multimérica o proteína multimérica, por ejemplo una proteína de fusión OX-40L trimérica.

El término “mamífero” incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De un modo similar, el término “sujeto” o “paciente” incluye sujetos o pacientes tantos humanos como veterinarios.

40

Proteínas de fusión OX-40L triméricas

Se han descrito varias formulaciones de agentes de unión al receptor OX-40, incluyendo anticuerpos frente al receptor OX-40 y diversas moléculas de OX-40L. Dichos agentes de unión al receptor OX-40 son útiles para

45 potenciar y mantener una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto. Por ejemplo, las proteínas de fusión en las que uno o más dominios de OX-40L están unidos covalentemente a uno o más dominios de proteínas adicionales se pueden administrar a un sujeto con o tras la administración de (o exposición a) un antígeno para potenciar la fuerza y/o la duración de la respuesta inmunitaria específica de antígeno. Proteínas de fusión de OX-40L de ejemplo que se pueden usar como agentes de unión al receptor OX-40 se describen en la patente de EE.UU. N.º:

50 6.312.700.

La presente divulgación se refiere más específicamente a un polipéptido de fusión de OX-40L que tiene la propiedad ventajosa de ensamblarse en una forma trimérica con una capacidad incrementada para estimular los linfocitos T humanos respecto a los polipéptidos de fusión de OX-40L descritos anteriormente. Una realización de ejemplo se

55 ilustra esquemáticamente en la figura 1. El polipéptido de fusión de OX-40L descrito en el presente documento posee un dominio de unión al receptor de OX-40L 101, un dominio de trimerización 102 y un dominio de dimerización 103, tal como un dominio de inmunoglobulina (p. ej., Fc). Normalmente, el dominio de inmunoglobulina, el dominio de trimerización y un dominio de unión al receptor de OX-40L se disponen en una dirección de N-terminal a C-terminal. Un polipéptido de fusión de OX-40L de ejemplo está representado por la SEC ID N.º: 8.

60 Opcionalmente, el polipéptido de fusión puede incluir una o más secuencias polipeptídicas adicionales, tales como una secuencia señal (p. ej., una secuencia señal secretora), una secuencia de conexión, un marcador o indicador de aminoácido o una secuencia peptídica o polipeptídica que facilite la purificación.

En una realización de ejemplo, el dominio de unión al receptor de OX-40L es un dominio extracelular de un OX-40L humano. La secuencia de uno de dichos dominios está representada por la SEC ID N.º: 2. No obstante, cualquier

65 secuencia polipeptídica de OX-40L que conserve la propiedad deseada de unión al receptor OX-40 es adecuada en

los polipéptidos de fusión y métodos descritos en el presente documento.

Adyacente (y más normalmente contiguo) al dominio de unión al receptor de OX-40L hay un dominio de trimerización. El dominio de trimerización sirve para estimular el autoensamblaje de moléculas polipeptídicas de fusión de OX-40L en una proteína trimérica. Por tanto, un polipéptido de fusión de OX-40L con un dominio de trimerización se autoensambla en una proteína de fusión de OX-40L trimérica. En una realización, el dominio de trimerización es un dominio de cremallera de isoleucina. Un dominio de cremallera de isoleucina de ejemplo es la variante de isoleucina GCN4 de levadura modificada genéticamente descrita por Harbury et al. (1993) Science 262: 1401-1407. La secuencia de un dominio de cremallera de isoleucina está representada por la SEC ID N.º: 4, aunque son igualmente adecuadas las variantes de esta secuencia que conserven la capacidad de formar un dominio de trimerización superenrollado. Dominios de trimerización superenrollados alternativos incluyen: TRAF2 (N.º de registro en GENBANK® . Q12933 [gi:23503103]; aminoácidos 299-348); trombospondina 1 (N.º de registro PO7996 [gi:135717]; aminoácidos 291-314); matrilina-4 (N.º de registro 095460 [gi:14548117]; aminoácidos 594-618); CMP (matrilina-1) (N.º de registro NP_002370 [gi:4505111]; aminoácidos 463-496); HSF1 (N.º de registro AAX42211 [gi:61362386]; aminoácidos 165-191); y cubilina (N.º de registro NP_001072 [gi:4557503]; aminoácidos 104-138).

Además del dominio de unión al receptor de OX-40L y el dominio de trimerización, el polipéptido de fusión incluye un dominio inmunoglobulina, tal como una región constante o dominio "Fc". La secuencia de aminoácidos de un dominio inmunoglobulina de ejemplo se proporciona en la SEC ID N.º: 6, aunque se pueden usar numerosas otras secuencias de dominio inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, el dominio de inmunoglobulina sirve como dominio de dimerización que estimula el ensamblaje entre dos polipéptidos de fusión triméricos en un hexámero estable (es decir, un multímero que contiene seis polipéptidos de fusión de OX40L) mediante interacciones entre dominios de inmunoglobulina sin aparear (como se muestra esquemáticamente en la figura 1). Opcionalmente se pueden usar dominios de dimerización alternativos capaces de formar interacciones estables entre los polipéptidos que permanecen sin aparear tras la trimerización de los polipéptidos de fusión de OX-40L en lugar del dominio de inmunoglobulina.

Los dominios proteicos adicionales de la proteína de fusión OX-40L pueden servir para una serie de funciones, incluyendo la potenciación de la actividad de OX-40L, lo que facilita la purificación y/o incrementa la estabilidad de la proteína en el cuerpo de un sujeto. En las proteínas de fusión descritas en el presente documento, OX-40L, por ejemplo un dominio extracelular de OX-40L u otro fragmento activo del mismo, o uno conservador u otra variante de dicho dominio o fragmento, se pueden condensar con un dominio de inmunoglobulina u otro dominio de proteína de fusión que se selecciona de modo que corresponda al sujeto al que se va a administrar el polipéptido de fusión OX-40L. Por ejemplo, si el sujeto al que está destinado es un sujeto humano, es deseable seleccionar el dominio de inmunoglobulina de una proteína o polipéptido de inmunoglobulina humana. El ejemplo específico descrito más adelante implica una fusión entre el dominio extracelular de OX-40L, un dominio de trimerización y un polipéptido, incluyendo un dominio constante de IgG humana. Normalmente, el polipéptido de fusión incluye al menos un dominio de la región constante de inmunoglobulina. Por ejemplo, el polipéptido de fusión OX40L puede incluir los dominios CH2 y CH3 de IgG. En algunas realizaciones, el polipéptido de fusión incluye una región de secuencia de aminoácidos bisagra correspondiente a toda o a parte de una región bisagra de la IgG. Opcionalmente, uno o más residuos de cisteína se pueden mutar a residuos de aminoácidos sin azufre, tales como alanina o glicina. Por ejemplo, introduciendo la alteración de los nucleótidos "tgt" a "acc" (p. ej., en la posición 8 de la SEC ID N.º: 5 y la SEC ID N.º: 7), se puede introducir una sustitución de cisteína por treonina al principio del dominio Fc.

Un polipéptido de fusión de OX-40L de ejemplo que se ensambla en una proteína de fusión de OX-40L trimérica se describe adicionalmente en los ejemplos. La secuencia de aminoácidos de este polipéptido de fusión se proporciona en la SEC ID N.º: 8. No obstante, un experto en la técnica reconocerá que otras numerosas secuencias también cumplen los criterios expuestos en el presente documento para los polipéptidos de fusión de OX-40L multiméricos. Por tanto, aunque los polipéptidos de fusión de OX-40L multiméricos se describen predominantemente con respecto al polipéptido de la SEC ID N.º: 8, la presente divulgación abarca numerosas realizaciones adicionales.

Además de los polipéptidos de fusión de OX-40L triméricos y las proteínas descritos en el presente documento, los fragmentos y variantes funcionales de los mismos también son una característica de la presente divulgación. Un fragmento o variante funcional es un fragmento o variante que mantiene una o más funciones del polipéptido de referencia. Los términos fragmento y variante no son necesariamente mutuamente excluyentes. Los fragmentos y variantes funcionales pueden tener una longitud variable. Por ejemplo, algunos fragmentos tienen al menos 10, 25, 50, 75.100, o 200 residuos. En general, el término "fragmento" se usa para hacer referencia a una subsecuencia de un polipéptido menor que su totalidad. El término "variante" se usa para designar un polipéptido con una o más alteraciones o modificaciones con respecto a un polipéptido de referencia, tal como el polipéptido de fusión de OX-40L explícitamente descrito con detalle en los ejemplos. Una variante puede tener una longitud idéntica a la del polipéptido de referencia, o puede tener una o más deleciones o adiciones de aminoácidos. La variante puede incluir deleciones o adiciones de uno o varios aminoácidos, siempre que se mantenga la característica funcional deseada (p. ej., la unión al receptor OX-40). Adicionalmente, una variante puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos. Generalmente, una sustitución de aminoácidos es una sustitución conservadora que reemplaza un aminoácido natural con características funcionales similares.

Un experto en la técnica reconocerá que un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L puede alterarse o modificarse sin alterar materialmente una o más de las funciones de la proteína de fusión. Como una materia preliminar, el código genético es degenerado y codones diferentes pueden codificar el mismo aminoácido. De forma más importante, con respecto a la proteína codificada, incluso cuando se introduce una sustitución de aminoácido, la mutación puede ser “conservadora” y no tener ningún impacto material sobre las funciones esenciales de una proteína. Véase Stryer (1988) Biochemistry 3ª Ed.

Las modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos para los aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no dan lugar a ningún cambio ni pérdida de función biológica o bioquímica del polipéptido se denominan sustituciones “conservadoras”. Es probable que estas sustituciones conservadoras tengan un impacto mínimo sobre la actividad de la proteína resultante. La Tabla 1 muestra los aminoácidos que se pueden sustituir por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservadoras en base a una matriz de similitud BLOSUM.

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

Se pueden realizar uno o más cambios conservadores, o hasta diez cambios conservadores (p. ej., dos aminoácidos sustituidos, tres aminoácidos sustituidos, cuatro aminoácidos sustituidos o cinco aminoácidos sustituidos, etc.) en el polipéptido sin cambiar una función bioquímica del polipéptido de fusión de OX-40L. De acuerdo con ello, los polipéptidos de fusión de OX-40L con una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones conservadoras son equivalentes del polipéptido de fusión representado en la SEC ID N.º: 8 o uno o más dominios o subporciones de los mismos, tales como SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 4 y/o SEC ID N.º: 6. Por tanto, los polipéptidos de fusión de OX-40L equivalentes incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos que son al menos el 95 % idénticos, tal como el 96 % o más del 97 % o incluso el 98 % o el 99 % idénticos a la SEC ID N.º: 8, o uno o más dominios de los mismos, tales como las SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 4 y/o SEC ID N.º: 6. Un experto en la técnica entenderá que los cambios de aminoácidos se pueden distribuir por toda la longitud de la SEC ID N.º: 8 o se pueden distribuir en una o más subporciones, por ejemplo dominios del polipéptido de fusión.

Por ejemplo, se pueden realizar uno o más cambios conservadores en un polipéptido de fusión de OX-40L (incluyendo un polipéptido de fusión de OX-40L) sin cambiar su capacidad para unirse al receptor OX-40. De un modo similar, se pueden realizar uno o más cambios conservadores en un polipéptido de fusión de OX-40L sin alterar su capacidad para trimerizarse. Se pueden obtener cambios más sustanciales en una función bioquímica u otras características proteicas seleccionando sustituciones de aminoácidos que sean menos conservadoras que las

indicadas en la Tabla 1. Dichos cambios incluyen, por ejemplo, cambiar residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de la estructura básica del polipéptido (p. ej., conformación en lámina o helicoidal) cerca de la sustitución, carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o el grueso de una cadena lateral específica. Generalmente cabe esperar que las sustituciones siguientes produzcan los cambios más grandes en las propiedades de las proteínas. (a) un residuo hidrófilo (p. ej., serilo o treonilo) está sustituido por (o con) un residuo hidrófobo (p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo); (b) una cisteína o prolina está sustituida por (o con) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (p. ej., lisilo, arginilo o histadilo) está sustituido por (o con) un residuo electronegativo (p. ej., glutamilo o aspartilo); o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa (p. ej., fenilalanina) está sustituido por (o con) uno que carezca de cadena lateral (p. ej., glicina).

Adicionalmente, parte de una cadena polipeptídica se puede eliminar sin alterar o eliminar todas sus funciones. De un modo similar se pueden realizar inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, por ejemplo añadiendo marcadores de epítomos, sin alterar o eliminar sus funciones (Ausubel et al. (1997) J. Immunol. 159: 2502). Otras modificaciones que se pueden realizar sin alterar materialmente una o más funciones de un polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas *in vivo* o *in vitro* que incorporan aminoácidos inusuales. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glucosilación, marcaje, por ejemplo, con radionúclidos y varias modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. En la técnica se conocen bien diversos métodos de marcaje de polipéptidos y marcadores útiles para dichos fines e incluyen isótopos radiactivos tales como ³²P, fluróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y antilgandos.

Más generalmente, se pueden producir proteínas de fusión multiméricas estables que incluyen un dominio seleccionado de un ligando que se une a un receptor biológicamente relevante de un modo análogo al descrito en el presente documento con respecto al ligando de OX-40. Dichas proteínas de fusión se ensamblan en trímeros (y hexámeros) estables con actividad biológica potenciada respecto a otras formas solubles del ligando. Las proteínas de fusión se caracterizan por la inclusión, en orientación de N-terminal a C-terminal, de un dominio de inmunoglobulina (p. ej., Fc), un dominio de trimerización y un dominio de unión al receptor. Aunque las proteínas de fusión se pueden preparar a partir de esencialmente cualquier ligando, son especialmente útiles para producir homólogos solubles de ligandos que son multiméricos (p. ej., triméricos) en su forma activa. Por ejemplo, las proteínas de fusión triméricas se pueden producir y usar de forma favorable de modo que correspondan a ligandos que se unen a receptores de miembros de la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF), tales como: TNF-a, TNF-b, linfotóxina-b, CD40L, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, ligando de RANK, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, ligando de GITR, EDA-A1, EDA-A2.

Polinucleótidos que codifican proteínas de fusión OX-40L

Los polipéptidos de fusión de OX-40L divulgados en el presente documento (como el polipéptido representado por la SEC ID N.º: 8) están codificados por secuencias novedosas de polinucleótidos. Las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido de fusión de OX-40L capaz de trimerización incluyen al menos una primera subsecuencia polinucleotídica que codifica un dominio de inmunoglobulina, al menos una segunda subsecuencia polinucleotídica que codifica un dominio de trimerización y al menos una tercera subsecuencia polinucleotídica que codifica un dominio de unión al receptor de OX-40L. Una secuencia polinucleotídica de ejemplo que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L está representada por la SEC ID N.º: 7. Normalmente, los polinucleótidos que codifican el dominio de inmunoglobulina, el dominio de trimerización y el dominio de unión al receptor de OX-40L están unidos en una orientación de 5' a 3'. En una realización, los polinucleótidos que codifican el dominio de inmunoglobulina (p. ej., Fc), el dominio de trimerización y el dominio de OX-40L están unidos de forma contigua en una orientación de 5' a 3'. Opcionalmente, el polinucleótido codifica una secuencia señal, por ejemplo una secuencia señal secretora o una secuencia de localización en membrana. En una realización, la secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia ligadora de aminoácido (p. ej., una secuencia ligadora flexible) está incluida en el polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L.

Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L incluye de forma favorable una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de unión al receptor OX-40 que es un dominio extracelular de un OX-40L humano. Una secuencia de polinucleótidos de ejemplo está representada por la SEC ID N.º: 1. El dominio extracelular del OX-40L representado por el N.º: de registro en GENBANK® NM 003326 (SEC ID N.º: 9) es adecuado de forma equivalente en el contexto de un polipéptido de fusión de OX-40L. La SEC ID N.º: 1 y la SEC ID N.º: 9 representan secuencias polinucleotídicas funcionalmente equivalentes del OX-40L humano. La SEC ID N.º: 1 posee dos sustituciones de nucleótidos cada una de las cuales es una sustitución de A por T. El polipéptido representado por la SEC ID N.º: 2 incluye una sustitución de una fenilalanina por una isoleucina en el aminoácido de posición 9 con respecto a la secuencia de GENBANK®. De un modo similar, cualquier secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de OX-40L funcionalmente equivalente se puede usar en los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento.

Adyacente a la secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio de unión al receptor de OX-40L hay una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de trimerización. Como se indicó anteriormente, un dominio de trimerización favorable es un dominio de cremallera de isoleucina. En una realización favorable, el ácido nucleico

que codifica el polipéptido de fusión OX-40L incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio de cremallera de isoleucina. Una secuencia de polinucleótidos de ejemplo se proporciona en la SEC D N.º: 3. Dominios de trimerización alternativos incluyen los de TRAF2, trombospondina 1, matrilina-4, CMP, HSF1 y cubilina.

5 Además de las secuencias de polinucleótidos que codifican un dominio de unión al receptor de OX-40L y un dominio de trimerización, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L también incluye una secuencia polinucleótidos que codifica un dominio de la región constante de inmunoglobulina ("dominio Fc"). Normalmente el polinucleótido codifica los dominios CH2, CH3 y bisagra de una región Fc de inmunoglobulina humana, aunque otros dominios de la región constante, por ejemplo los dominios CH2 y CH1 podrían estar sustituidos. En una realización
10 de ejemplo, el polinucleótido codifica un dominio Fc de IgG1. Favorablemente, el dominio de inmunoglobulina es capaz de estimular la dimerización (p. ej., con otro polipéptido, incluyendo un dominio de inmunoglobulina). Una secuencia de polinucleótidos de ejemplo que codifica un dominio Fc de IgG1 humana se proporciona en la SEC ID N.º: 5.

15 Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de fusión de OX-40L incluyen secuencias de desoxirribonucleótidos (ADN, ADNc) o ribodesoxinucleótidos (ARN) o formas modificadas de cualquier nucleótido, que codifican los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN y/o ARN.

20 Las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento incluyen secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias representadas por la SEC ID N.º: 7, que codifican los polipéptidos de fusión de OX-40L, así como secuencias de polinucleótidos complementarias de las mismas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una secuencia de polipéptido de fusión de OX-40L representado por la SEC ID N.º: 8 es una característica de la presente divulgación.

25 Además de las SEC ID N.ºs: 1, 3, 5, 7 y 9, las secuencias de polinucleótidos que son sustancialmente idénticas a estas secuencias de polinucleótidos se pueden usar en las composiciones y métodos de la divulgación. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica puede tener una o un número pequeño de deleciones, adiciones y/o sustituciones. Dichos cambios de polinucleótidos pueden ser contiguos o se pueden distribuir en
30 diferentes posiciones en el ácido nucleico. Una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica puede, por ejemplo, tener 1 o 2 o 3 o 4 o incluso más deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. Normalmente, la una o más deleciones, adiciones y/o sustituciones no alteran el marco de lectura codificado por la secuencia de polinucleótidos, de un modo tal que se produzca un polipéptido modificado ("mutante") pero sustancialmente idéntico tras la expresión del ácido nucleico.

35 La similitud entre las secuencias de aminoácidos (y/o polinucleótidos) se expresa en términos de similitud entre las secuencias, de otro modo denominada identidad de secuencia. Con frecuencia la identidad de secuencia se mide en términos de identidad (o similitud) porcentual; cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las estructuras primarias de las dos secuencias. Por tanto, un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L puede
40 ser al menos aproximadamente el 95 %, o al menos el 96 %, con frecuencia al menos el 97 %, el 98 %, o el 99 % idéntico a la SEC ID N.º: 7 (o la SEC ID N.º: 9) o a al menos una subsecuencia de las mismas, tal como las SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 3 y/o SEC ID N.º: 5. En la técnica se conocen bien los métodos de determinación de la identidad de secuencia. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237; Higgins
45 and Sharp (1989) CABIOS 5:151; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Research 16:10881; y Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444. Altschul et al. (1994) Nature Genet. 6:119, presenta una consideración detallada de los métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología.

50 La NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403, 1990) está disponible en varias fuentes, incluidos el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) e Internet, para usar en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. En el sitio web del NCBI en Internet se dispone de una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa.

55 Por tanto, una secuencia (es decir, una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos) que es un polinucleótido sustancialmente idéntico o sustancialmente similar a un polinucleótido de SEC ID N.ºs: 1, 3, 5, 7 o 9 (o a una secuencia polipeptídica de las SEC ID N.ºs: 2, 4, 6, o 8) está dentro de la presente divulgación. Una secuencia es sustancialmente idéntica a una de las SEC ID N.ºs: 1-9 si la secuencia es idéntica, nucleótido por nucleótido, con al menos una subsecuencia de la secuencia de referencia (p. ej., las SEC ID N.ºs: 1-9). Dichos polinucleótidos pueden
60 incluir, por ejemplo, inserciones, deleciones y sustituciones con respecto a cualquiera de las SEC ID N.ºs: 1, 3, 5, 7, y/o 9. Por ejemplo, dichos polinucleótidos son, normalmente, al menos aproximadamente un 70 % idénticos a un polinucleótido (o polipéptido) de referencia seleccionado entre las SEC ID N.º: 1 a la SEC ID N.º: 9. Es decir, al menos 7 de 10 nucleótidos (o aminoácidos) con un margen de comparación son idénticos a la secuencia de referencia seleccionada SEC ID N.ºs: 1-9. Con frecuencia, dichas secuencias son al menos aproximadamente el 80
65 %, normalmente al menos aproximadamente el 90 % y a menudo al menos aproximadamente el 95 %, o más idénticas a una secuencia de referencia seleccionada de la SEC ID N.º: 1 a la SEC ID N.º: 9. Por ejemplo, la

secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos puede ser el 96 %, el 97 %, el 98 % o incluso el 99 % idéntica a la secuencia de referencia, por ejemplo, al menos una de las SEC ID N.º: 1 a la SEC ID N.º: 9.

Otros indicios de similitud de secuencia entre dos ácidos nucleicos es la capacidad para hibridar. Cuando más similares son las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más estrictas son las condiciones en las que hibridarán. Ácidos nucleicos sustancialmente similares o sustancialmente idénticos a la SEC ID N.º: 7 (y a subsecuencias de la misma, tales como SEC ID N.º: 1, SEC ID N.º: 3 y SEC ID N.º: 5) incluyen ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos de referencia. Por tanto, un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de polinucleótidos de referencia seleccionada de entre las SEC ID N.ºs: 1, 3, 5 y/o 7 es sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a los polinucleótidos que codifican polipéptidos de fusión de OX-40L descritos en el presente documento.

Las condiciones estrictas de hibridación dependen de la secuencia y son diferentes en parámetros ambientales diferentes. Por tanto, las condiciones de hibridación que resultan en grados concretos de rigurosidad variarán en función de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que hibridan. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente, la concentración de Na⁺ y/o Mg⁺⁺) del tampón de hibridación determinará la rigurosidad de la hibridación, aunque las veces de lavado también influyen sobre la rigurosidad. En general, las condiciones estrictas se seleccionan de modo que sean aproximadamente 5 °C a 20 °C menos que el punto de fusión térmica (T_i) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia objetivo complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. Las condiciones para la hibridación de ácido nucleico y el cálculo de las rigurosidades se pueden encontrar en, por ejemplo, Sambrook et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Tijssen (1993) *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY y Ausubel et al. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.

Para los fines de la presente divulgación, "condiciones estrictas" abarcan condiciones según las que la hibridación solo se producirá si hay menos de un 25 % de apareamiento erróneo entre la molécula de hibridación y la secuencia diana. Las "condiciones estrictas" se pueden fragmentar en niveles concretos de rigurosidad para una definición más precisa. Por tanto, como se usa en el presente documento, las condiciones de "rigurosidad moderada" son aquellas según las que las moléculas con un apareamiento erróneo de secuencia mayor del 25 % no hibridarán; las condiciones de "rigurosidad media" son aquellas según las que las moléculas con un apareamiento erróneo de secuencia mayor del 15 % no hibridarán y las condiciones de "rigurosidad alta" son aquellas según las que las moléculas con un apareamiento erróneo de secuencia mayor del 10 % no hibridarán. Las condiciones de "rigurosidad muy alta" son aquellas según las que las secuencias con un apareamiento erróneo mayor del 6 % no hibridarán. En contraste con ello, los ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de "rigurosidad baja" incluyen aquellos con una identidad de secuencia mucho menor, o con una identidad de secuencia sobre solo subsecuencias cortas del ácido nucleico.

Por ejemplo, en las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones usadas para alcanzar un nivel de rigurosidad concreto variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se van a hibridar. La longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido en GC frente a AT) y el tipo de ácido nucleico (p. ej., ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos influyen todos ellos en la selección de las condiciones de hibridación adecuadas. Adicionalmente, si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro ello puede afectar a las condiciones necesarias para alcanzar la rigurosidad deseada.

Un ejemplo específico de condiciones de rigurosidad progresivamente mayores es el siguiente: 2 x SSC/0,1 % de SDS aproximadamente a la temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 x SSC/0,1 % de SDS aproximadamente a la temperatura ambiente (condiciones de rigurosidad baja); 0,2 x SSC/0,1 % de SDS aproximadamente a 42° C (condiciones de rigurosidad moderada); y 0,1 x SSC aproximadamente a 68° C (condiciones de rigurosidad alta). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente variaciones de estas condiciones (p. ej., con referencia a Sambrook, Tijssen y/o Ausubel, citados en lo que antecede). El lavado se puede realizar usando solo una de estas condiciones, por ejemplo condiciones de rigurosidad alta o cada una de las condiciones se puede usar durante, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden indicado anteriormente, repitiendo cualquiera o todas las etapas indicadas. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones óptimas variarán, en función de la reacción de hibridación concreta implicada y se pueden determinar de forma empírica.

Adicionalmente, el ácido nucleico que codifica los polipéptidos de fusión de OX-40L también pueden incluir secuencias de polinucleótidos, tales como las secuencias reguladoras de la expresión y/o las secuencias del vector que facilitan la expresión o replicación de los ácidos nucleicos. De un modo similar, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L puede incluir secuencias de codificación adicionales que confieren características funcionales al polipéptido codificado. Dichas secuencias incluyen secuencias señal secretoras y señales de localización de membrana.

- Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de OX-40L se pueden manipular con procedimientos estándar tales como digestión con enzimas de restricción, rellenado del hueco con ADN polimerasa, delección con exonucleasa, extensión mediante la desoxinucleótido transferasa terminal, unión de secuencias de ADN sintético o clonado, alteración de secuencia dirigida al sitio mediante un intermedio bacteriófago monocatenario o con el uso de oligonucleótidos específicos en combinación con PCR u otra amplificación *in vitro*. Estos procedimientos se conocen bien por los expertos en la técnica y se pueden encontrar protocolos de ejemplo en, por ejemplo, Sambrook y Ausubel (*ant.*).
- Una secuencia de polinucleótidos (o porciones derivadas de la misma), tal como un ADNc que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L se puede introducir en un vector, tal como un vector de expresión eucariota, mediante técnicas convencionales. Se diseña un vector de expresión para permitir la transcripción de la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L en las células proporcionando secuencias reguladoras que inician y potencian la transcripción del ADNc y garantizan su adecuado corte y empalme y adenilación. Numerosos vectores de expresión se conocen por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente, o se pueden ensamblar a partir de componentes individuales de acuerdo con procedimientos de biología molecular convencionales, tales como los descritos en, por ejemplo, Sambrook and Ausubel, citado anteriormente. El vector pCEP D4-7 descrito en los Ejemplos es uno de dichos vectores de expresión adecuados.
- Por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus ("CMV") puede usarse de forma favorable para regular la transcripción de un polipéptido de fusión de OX-40L tras la introducción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L unido operativamente al promotor de CMV. Adicionalmente, los vectores que contiene las regiones promotora y potenciadora de SV40 o la repetición terminal larga (MTR) del virus del sarcoma de Rous y la señal de poliadenilación y corte y empalme de SV40 están disponibles fácilmente (Mulligan et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1078-2076; Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6777-6781). El nivel de expresión del polinucleótido que codifica un polipéptido se puede manipular con este tipo de vector, bien usando promotores que tienen diferentes actividades (por ejemplo, el baculovirus pAC373 puede expresar ADNc a niveles altos en células de *S. frugiperda* (Summers and Smith (1985) In Genetically Altered Viruses and the Environment, Fields et al. (Eds.) 22: 319-328, CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) o usando vectores que contienen promotores que se pueden modular, por ejemplo el promotor de respuesta a glucocorticoides del virus de tumor de mama de ratón (Lee et al. (1982) Nature 294: 228).
- Además, algunos vectores contienen marcadores seleccionables, tales como los genes bacterianos *gpt* (Mulligan y Berg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076) o *neo* (Southern y Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341) Estos marcadores seleccionables permiten la selección de células transfectadas que exhiben una expresión estable y prolongada de los vectores (y por tanto, del ADNc). Los vectores se pueden mantener en las células como entidades episomales de replicación libre usando elementos reguladores de virus, tales como el virus del papiloma (Sarver et al. (1981) Mol. Cell Biol. 1: 486) o de Epstein-Barr (Sugden et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5: 410). Como alternativa, también se pueden producir líneas celulares que tienen integrado el vector en el ADN genómico. Ambos de estos tipos de líneas celulares producen el producto génico de forma continua. También se pueden producir líneas celulares que han amplificado el número de copias del vector (y por tanto, del ADNc también) para crear líneas celulares que producen niveles altos del producto génico (Alt et al. (1978) J. Biol. Chem. 253: 1357).
- Sistemas de vectores adecuados para la expresión de polinucleótidos que codifican proteínas de fusión incluyen, además de vectores específicos descritos en los ejemplos, la serie pUR de vectores (Ruther and Muller-Hill (1983) EMBO J. 2: 1791), pEX1-3 (Stanley and Luzio (1984) EMBO J. 3: 1429) y pMR100 (Gray et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6598). Vectores adecuados para la producción de proteínas nativas intactas incluyen pKC30 (Shimatake y Rosenberg (1981) Nature 292: 128, 1981), pKK177-3 (Amann and Brosius (1985) Gene 40: 183) y pET-3 (Studiar y Moffatt (1986) J. Mol. Biol. 189: 113).
- Por tanto, la presente divulgación abarca vectores recombinantes que comprenden todo o parte de los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de OX-40L triméricas o secuencias de ADNc que codifican polipéptidos de fusión de OX-40L, para la expresión de un huésped adecuado, bien solo o bien como una proteína marcada o detectable de otro modo. El ADN está unido operativamente en el vector a una secuencia de control de la expresión en la molécula de ADN recombinante de modo que se pueda expresar el polipéptido o la proteína de fusión. La secuencia de control de la expresión se puede seleccionar del grupo que consiste en secuencias que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas y sus virus y combinaciones de las mismas. La secuencia de control de la expresión se puede seleccionar específicamente del grupo que consiste en el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *trc*, las principales regiones operadoras y promotoras del fago lambda, la región de control de la proteína de cubierta fd, los promotores tempranos y tardíos de SV40, los promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levaduras, el promotor de los factores de acoplamiento alfa de levaduras y combinaciones de las mismas.
- El ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L también se puede transferir desde su contexto existente a otros vehículos de clonación, tales como otros plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, virus animales y cromosomas artificiales de levaduras (YAC) (Burke et al. (1987) Science 236: 806-812). Estos vectores se pueden

introducir después en diversos huéspedes incluyendo células somáticas y organismos simples y complejos, tales como bacterias, hongos (Timberlake y Marshall (1989) Science 244: 1313-1317), invertebrados, plantas (Gasser y Fraley (1989) Science 244: 1293) y animales (Pursel et al. (1989) Science 244: 1281-1288), cuyas células u organismos se hacen transgénicos mediante la introducción del ADNc heterólogo.

5 Para la expresión en células de mamífero, una secuencia de ADN se puede ligar a promotores heterólogos, tal como el promotor del virus de simio (SV) 40 en el vector pSV2 (Mulligan y Berg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076), e introducir en células, tales como las células COS-1 de mono (Gluzman (1981) Cell 23:175-182), para conseguir una expresión transitoria o prolongada. La integración estable de la construcción génica quimérica se puede mantener en células de mamífero mediante selección bioquímica, tal como neomicina (Southern y Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341) y ácido micofenólico (Mulligan y Berg (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076).

Producción de proteínas de fusión OX-40L recombinantes

15 Las proteínas de fusión de OX-40L se pueden fabricar en cualquier sistema de expresión heterólogo adecuado y cuando sea adecuado, el ADN que codifica la proteína de fusión también puede codificar una secuencia señal secretora conocida adecuada para el sistema de células huésped usado de modo que el ADN se traduce en una proteína que primero incluye la señal secretora y la secuencia de escisión pero después se transporta fuera de la célula sin dichas secuencias auxiliares.

25 La expresión y purificación de proteínas, tal como una proteína de fusión de OX-40L trimérica, se puede realizar usando técnicas de laboratorio estándar. Ejemplos de dichos métodos se tratan o se citan en el presente documento. Tras la expresión, las proteínas purificadas tienen muchos usos, incluyendo, por ejemplo, análisis funcionales, producción de anticuerpos y diagnóstico, así como los usos profilácticos y terapéuticos descritos más adelante. Las secuencias de ADN parciales o de longitud completa que codifican las proteínas de fusión se pueden ligar en vectores de expresión bacterianos. Métodos para expresar cantidades grandes de proteína a partir de una secuencia clonada introducida en *Escherichia coli* (*E. coli*) o células de baculovirus/Sf9 se pueden usar para la purificación, localización y análisis funcional de proteínas, así como para la producción de anticuerpos y composiciones vacunales. Por ejemplo, las proteínas de fusión que consisten en un polipéptido de OX-40L se pueden usar en diversos procedimientos, por ejemplo para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales contra estas proteínas. Después, estos anticuerpos se pueden usar para purificar proteínas mediante cromatografía de inmunoafinidad, en ensayos diagnósticos para cuantificar los niveles de proteína y localizar proteínas en tejidos y células individuales mediante inmunofluorescencia. Más particularmente, las proteínas de fusión y los polinucleótidos que las codifican descritos en el presente documento se pueden usar para producir composiciones farmacéuticas, incluyendo composiciones vacunales adecuadas para administración profiláctica y/o terapéutica.

40 Métodos y vectores plasmídicos adicionales para producir los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión y para expresar estos polinucleótidos en células bacterianas y eucariotas se conocen bien en la técnica y se describen métodos específicos en Sambrook (*ant.*). Dichas proteínas de fusión se pueden preparar en grandes cantidades, son fáciles de purificar y se pueden usar para potenciar una respuesta inmunitaria, incluyendo una respuesta de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T. Las proteínas nativas se pueden producir en bacterias colocando un promotor fuerte, regulado (tal como el promotor del CMV) y un sitio de unión a ribosoma eficiente cadena arriba del gen clonado. Si se producen niveles bajos de proteínas, se pueden realizar etapas adicionales para aumentar la producción de proteínas; si se producen niveles altos, la purificación es relativamente fácil. Métodos adecuados se presentan en Sambrook (*ant.*) y se conocen bien en la técnica. A menudo, las proteínas expresadas a niveles altos se encuentran en cuerpos de inclusión insolubles. Los métodos para extraer proteínas de estos agregados se describen en Sambrook (*ant.*). Las proteínas, incluyendo las proteínas de inclusión, se pueden aislar de geles proteicos, liofilizar, moler en un polvo y usar como antígeno.

50 La transferencia de ADN en eucariotas, en particular en células humanas o de otro mamífero, es ahora una técnica convencional conocida por los expertos en la técnica. Los vectores se introducen en las células receptoras como ADN puro (transfección) mediante, por ejemplo, precipitación con fosfato cálcico (Graham y van der Eb (1973) Virology 52: 466) o fosfato de estroncio (Brash et al. (1987) Mol. Cell Biol. 7: 2013), electroporación (Neumann et al. (1982) EMBO J. 1: 841), lipofección (Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413), DEAE dextrano (McCuthan et al. (1968) J. Natl. Cancer Inst. 41: 351), microinyección (Mueller et al. (1978) Cell 15: 579), fusión de protoplastos (Schafner, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2163-2167), biolística, por ejemplo pistolas de granúlos (Klein et al. (1987) Nature 327: 70) o pistolas génicas. Como alternativa, el ADNc, o fragmentos del mismo, se pueden introducir por infección con vectores víricos. Se desarrollan sistemas que usan, por ejemplo, retrovirus (Bernstein et al. (1985) Gen. Engr'g 7: 235), adenovirus (Ahmad et al. (1986) J. Virol. 57: 267), o virus Herpes (Spaete et al. (1982) Cell 30: 295). Los polinucleótidos que codifican proteínas, como las proteínas de fusión, también se pueden liberar en las células diana *in vitro* mediante sistemas no infecciosos, tales como liposomas.

65 Usando las técnicas anteriores, los vectores de expresión que contienen un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión monomérico como se describe en el presente documento o ADNc, o fragmentos o variantes o mutantes del mismo, se pueden introducir en células humanas, células de mamífero de otras especies o células que

no son de mamíferos, como se desee. La elección de la célula se determina mediante la finalidad del tratamiento. Por ejemplo, se pueden usar células COS de mono (Gluzman (1981) Cell 23: 175-182) que producen niveles elevados del antígeno SV40 T y permiten la replicación de vectores que contienen el origen de replicación del SV40. De un modo similar, se pueden usar células de ovario de hámster chino (CHO), fibroblastos o linfoblastos NIH 3T3 de ratón.

Métodos de potenciación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno

La potenciación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto (p. ej., un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano) uniendo el receptor OX-40 en los linfocitos T CD4⁺ durante o después de la activación del antígeno se puede conseguir usando una amplia variedad de métodos. El método de elección dependerá principalmente del tipo de antígeno contra el que se desee potenciar la respuesta inmunitaria y más adelante se tratan varios métodos disponibles. Cualquiera que sea el método seleccionado, la proteína de fusión de OX-40L trimérica se debe administrar al animal de un modo tal que se presente a los linfocitos T del sujeto durante o poco después de la sensibilización de los linfocitos T por el antígeno. En un método de ejemplo se administra una proteína de fusión de OX-40L trimérica que comprende el polipéptido representado por la SEC ID N.º: 8.

Dado que la activación de los linfocitos T tiene lugar en un plazo de 7 días después de presentar un antígeno al sistema inmunológico (y a menudo en un plazo de aproximadamente 24-48 horas desde la exposición al antígeno), generalmente es preferible administrar la proteína de fusión de OX-40L trimérica al sujeto mediante el método seleccionado en un plazo de 10 días después de que el sistema inmunológico del sujeto se expone al antígeno. Normalmente, la proteína de fusión de OX-40L trimérica se administra de forma concurrente o en un plazo de 24 horas desde la exposición al antígeno. No obstante, es posible la administración posterior, por ejemplo en un plazo de aproximadamente 48 horas, en un plazo de aproximadamente 72 horas, hasta en aproximadamente 4-10 días de la exposición al antígeno. Cuando la proteína de fusión de OX-40L trimérica se administra de forma simultánea con el antígeno, generalmente es ventajoso administrar una forma del agente que tiene una estabilidad potenciada (tal como una mayor semivida, resistencia a la proteólisis etc.) en el cuerpo de modo que el agente permanecerá en el sistema circulatorio durante un periodo de tiempo suficiente para engancharse al receptor OX-40 durante o después de la sensibilización al antígeno. Favorablemente, la proteína de fusión de OX-40L trimérica descrita en el presente documento, que incluye un dominio de trimerización y un dominio de inmunoglobulina, exhibe dicha estabilidad potenciada en comparación con un dominio de OX-40L extracelular aislado o un polipéptido de fusión de OX-40L monomérico. En el alcance de la presente divulgación, un dominio del polipéptido se puede sustituir por el dominio de la inmunoglobulina siempre que el dominio polipeptídico seleccionado mantenga un incremento similar de la estabilidad.

Un experto en la técnica puede determinar la semivida de cualquier polipéptido de fusión de OX-40L seleccionado usando métodos estándar. Por ejemplo, tras la administración del polipéptido de fusión mediante inyección intravenosa, se puede extraer una pequeña muestra de sangre del sujeto, con muestras posteriores extrayéndose cada 6-24 horas durante el periodo de aproximadamente 10 días. Después, se determina la concentración del polipéptido de fusión presente en cada muestra (p. ej., usando métodos de cuantificación inmunológica estándar, como los tratados en Harlow & Lane (1988), por ejemplo ELISA). La semivida del polipéptido de fusión se define como el momento en el que la concentración del agente disminuye al 50 % de la que hay en la medición de la primera muestra.

En algunas situaciones, por ejemplo cuando el antígeno se presenta al sistema inmunológico durante un periodo prolongado (p. ej., en pacientes de cáncer), la proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede administrar más de 7 días después de la primera exposición del sistema inmunológico al antígeno. Por ejemplo, tras la extracción quirúrgica de un tumor primario de un paciente, se puede administrar una proteína de fusión de OX-40L trimérica para potenciar la respuesta inmunitaria a los antígenos tumorales presentes en las metástasis, de modo que se estimula la eliminación de dichas metástasis del cuerpo. En una situación tal, la administración de la proteína de fusión de OX-40L trimérica normalmente se producirá más de 7 días después de la de la primera exposición del sistema inmunológico a los antígenos tumorales, pero, no obstante estará presente después cuando los antígenos se presenten a los linfocitos T.

En contraste, cuando el antígeno frente al que se desea una respuesta inmunitaria es un antígeno soluble, generalmente es deseable administrar la proteína de fusión de OX-40L trimérica simultáneamente con, o en un plazo de aproximadamente 24 a 48 horas desde, la exposición al antígeno.

Mientras que la molécula que se engarza al receptor OX-40 estará en forma de una proteína, es decir, como un complejo hexamérico ensamblado que incluye dos proteínas de fusión de OX-40L triméricas, la preparación administrada al mamífero puede tomar una serie de formas, incluyendo una preparación de una proteína de fusión de OX-40L trimérica purificada, la preparación de un polipéptido de fusión de OX-40L purificado, la preparación de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de OX-40L trimérica, una célula o virus que expresa la proteína de fusión de OX-40L trimérica, o una preparación derivada de dicha célula o virus.

En su forma más simple, la preparación administrada al mamífero es una proteína de fusión de OX-40L hexamérica

(p. ej., formada por trómeros “dimerizados”), administrada en forma de dosificación convencional y preferentemente, combinada con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéutico. Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden ser sólidos o líquidos y pueden incluir tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, otros polipéptidos o proteínas tales como seroalbúmina, hidratos de carbono, agentes quelantes y otros estabilizantes y excipientes.

5 Vehículos sólidos adecuados incluyen lactosa, estearato de magnesio, terra alba, sacarosa, talco, ácido esteárico, gelatina, agar, pectina, goma arábica y manteca de cacao. La cantidad de un vehículo sólido variará ampliamente en función de qué vehículo se seleccione, pero será preferentemente, de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g por dosis de agente activo. Vehículos líquidos adecuados incluyen suero salino normal y solución salina tamponada neutra, opcionalmente con conservantes, estabilizantes y excipientes adecuados. El vehículo o diluyente también puede incluir material de liberación prolongada bien conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, diestearato de glicerol, bien solo o bien con una cera. Los ejemplos anteriores de vehículos farmacéuticos adecuados son solo ejemplos y un experto en la técnica reconocerá que se puede usar una amplia variedad de dichos vehículos. Los sistemas de liberación a base de liposomas también se pueden usar para liberar las proteínas de fusión de OX-40L triméricas. Los sistemas a base de liposomas, que se pueden usar para proporcionar una liberación medida del agente en el tiempo en la circulación sanguínea, se conocen bien en la técnica y se ilustran mediante los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs: 4.356.167; 5.580.575; 5.595.756; y 5.188.837 y los documentos citados en las mismas.

20 La formulación de la proteína de fusión trimérica, tal como una proteína de fusión de OX-40L trimérica, con un vehículo farmacéutico puede tomar muchas formas físicas, pero es preferentemente, una suspensión o solución líquida estéril, adecuada para inyección directa. Preferentemente, el sujeto recibirá la proteína de fusión de OX-40L trimérica en una formulación como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, en combinación con un vehículo farmacéutico), en la que la formulación incluye una cantidad clínicamente eficaz de la proteína de fusión.

25 Como se usa en el presente documento, “una cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad que tiene como resultado un efecto terapéuticamente significativo. Esta naturaleza de este efecto variará con el contexto en el que se use la proteína de fusión de OX-40L trimérica, por ejemplo, si la proteína de fusión se está administrando para tratar una afección existente (por ejemplo, para tratar una enfermedad infecciosa o un cáncer) o como un agente profiláctico (para evitar o reducir el riesgo de enfermedad o cáncer, por ejemplo recurrencia de un tumor o metástasis de un tumor). Si la proteína de fusión de OX-40L trimérica se está administrando para tratar a un paciente de cáncer, se apreciará que cualquier mejora en la afección del paciente es terapéuticamente significativa. Por tanto, en una situación tal, “una cantidad terapéuticamente eficaz” abarca cantidades de la proteína de fusión de OX-40L trimérica que tiene como resultado al menos una remisión parcial del cáncer así como cantidades que ralentizan o limitan la progresión posterior del cáncer. De un modo similar, en el contexto terapéutico en el que se esté usando el agente para potenciar la respuesta inmunitaria de un paciente a un agente infeccioso, tal como un virus o una bacteria, cuando el paciente ya está infectado con el agente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede producir un efecto terapéutico, que significa un efecto que tiene como resultado algún grado de recuperación de la infección o de mejoría de los síntomas clínicos.

40 En el contexto profiláctico, tal como una vacunación, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de OX-40L trimérica puede proporcionar una potenciación de la respuesta inmunitaria al antígeno diana, es decir produce una respuesta inmunitaria superior de la que se presentaría sin la administración de la proteína de fusión de OX-40L trimérica. La cuantificación de la respuesta inmunitaria por una vacunación se puede conseguir de cualquier modo estándar, por ejemplo la medición de los títulos de anticuerpos séricos para el nivel y/o la duración contra cualquier antígeno de ensayo conveniente, y/o linfoproliferación en respuesta al antígeno de ensayo in vitro.

50 Se apreciará que una dosis terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de OX-40L trimérica variará en función del contexto clínico (p. ej., si el agente se está usando terapéutica o profilácticamente), de las características del sujeto (edad, peso, otros medicamentos que esté tomando etc.) y de la gravedad de la afección. Por tanto, la evaluación de una dosis terapéuticamente eficaz se decidirá en última instancia por un médico, veterinario u otro profesional sanitario familiarizado con el sujeto. Normalmente, la administración de una proteína de fusión de OX-40L trimérica a un sujeto de acuerdo con los métodos de la presente divulgación implicará la administración de aproximadamente 10 ng a 1 g de la proteína de fusión de OX-40L trimérica por dosis, usándose habitualmente unidades de monodosis de aproximadamente 10 ng a 100 mg y también estando dentro del intervalo de uso habitual dosis específicas de hasta 1 mg o 10 mg.

60 La proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede administrar a un sujeto mediante una serie de vías, incluyendo las subcutánea o intravenosamente, o cuando el sujeto tiene un tumor, directamente en el lugar del tumor. El agente puede ser el único ingrediente activo en la composición, o se puede combinar con otros agentes que tienen un efecto beneficioso, tal como un interferón u otras moléculas estimuladoras del sistema inmunológico.

65 En el contexto profiláctico (vacuna), la proteína de fusión de OX-40L trimérica a menudo se administra a un sujeto en combinación con una preparación o formulación de vacuna convencional, tal como una preparación de vacuna que comprenda antígenos bacterianos o virales. La proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede combinar con la vacuna convencional o se puede administrar como una preparación por separado junto con la vacuna convencional. Por ejemplo, cuando la proteína de fusión de OX-40L trimérica se administra por separado, normalmente se

administra en un plazo de aproximadamente una semana desde que se administra de la vacuna. Las preparaciones de vacunas convencionales adecuadas para usar en la presente divulgación incluyen las preparadas con antígenos bacterianos purificados, bacterias muertas por calor, vacunas de subunidades y vacunas virales en base a virus vivos o atenuados. Una preparación de vacuna puede incluir un vehículo y/o adyuvante farmacéutico.

5 Cuando la proteína de fusión de OX-40L trimérica se administra al sujeto en una única preparación con los antígenos vacunales, la preparación se puede formular simplemente mezclando una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión de OX-40L trimérica con la preparación del antígeno. Como alternativa, la proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede producir junto con el antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno que se va a
10 administrar como vacuna es un antígeno bacteriano o una mezcla de antígenos bacterianos, la bacteria a partir de la que se prepara la preparación antigénica puede ser una bacteria transgénica que expresa la proteína de fusión de OX-40L trimérica. En una situación tal, la proteína de fusión de OX-40L trimérica se obtiene directamente en combinación con los antígenos bacterianos. De un modo similar, las vacunas que comprenden antígenos tumorales y la proteína de fusión de OX-40L trimérica se pueden preparar a partir de células tumorales que expresan la
15 proteína de fusión de OX-40L trimérica. Los métodos de expresión de proteínas tales como polipéptidos de fusión de OX-40L en células eucariotas y procariotas transgénicas se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen en textos de laboratorio estándar, tal como Sambrook y Ausubel, citado en lo que antecede.

20 En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno concreto se potencia administrando al sujeto una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L que es capaz de formar una proteína de fusión de OX-40L trimérica. Una molécula tal de ácido nucleico se administra, preferentemente, como componente de una célula o como parte de un genoma viral. Como alternativa, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L puede administrarse al sujeto como una molécula de ácido nucleico "desnuda".

25 Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L se puede introducir en una bacteria atenuada (es decir, una forma de la bacteria que no produce enfermedad significativa cuando se administra a un sujeto) en un vector plasmídico de forma que la bacteria secreta la proteína de fusión de OX-40L trimérica. La bacteria se puede administrar al mamífero del mismo modo que la vacuna bacteriana atenuada convencional.
30

Como alternativa, la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión trimérica, tal como ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de OX-40L triméricas, se puede introducir en el genoma de un virus que se usa como vacuna atenuada viva. Los virus atenuados incluyen aquellos en los que se ha delecionado un gen esencial, como se describe en las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.665.362 y 5.837.261. Los virus adecuados para este
35 fin incluyen virus de ADN, tales como virus adeno, herpes, papova, papiloma y parvovirus, así como virus de ARN, tales como poliovirus y virus de la gripe. Métodos para preparar virus portadores de secuencias de ácido nucleico heterólogo que se pueden usar como vacunas virales se describen en las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.665.362 y 5.837.261 (ant.); 5.338.683 y 5.494.807.

40 En otra realización, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L capaz de formar una proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede introducir en una célula tumoral. En muchos pacientes de cáncer, las células tumorales escapan a la detección por el sistema inmunológico mediante mecanismos tales como regulación por disminución del MHC y/o expresión de moléculas coestimuladoras. De acuerdo con ello, un método de tratamiento es eliminar las células tumorales del paciente e introducir las en los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo,
45 MHC de clase II, la molécula coestimuladora B7 y la molécula estimuladora/de adhesión CD2 (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea número EP 733.373 y las referencias citadas en la misma). De un modo similar, un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de OX-40L puede introducirse en las células tumorales para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales.

50 Todos los tipos de tumores son potencialmente sensibles al tratamiento mediante este enfoque, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de mama, de pulmón, de páncreas, de ovarios, de riñón, de colon y de vejiga urinaria, así como melanomas, sarcomas y linfomas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de fusión de OX-40L capaz de formar una proteína de fusión de OX-40L trimérica se incorporan en un vector adecuado para la expresión del polipéptido de fusión de OX-40L en células tumorales. Vectores adecuados incluyen vectores plasmídicos,
55 cosmídicos y virales, tales como retrovirus, adenovirus y herpesvirus. Para este fin se pueden usar virus inactivados, como los descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.665.362 y 5.837.261.

Además de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de proteína de fusión de OX-40L trimérica, también se pueden introducir en el vector otras moléculas de ácidos nucleicos para potenciar el efecto
60 inmunogénico. A modo de ejemplo, dichas otras moléculas de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos que codifican proteínas de MHC de clase II (incluyendo las subunidades α and β) y otras moléculas coestimuladoras, tales como B7.1 y B7.2. Si se desea, una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable también se puede introducir en el vector, de modo que dichas células tumorales transformadas con éxito con el vector se puedan seleccionar con facilidad.

65 Después, el vector se introduce en la célula tumoral mediante una de una serie de técnicas, tales como

electroporación, lipofección, cocultivo con células productoras de virus u otros medios estándar. En una realización de ejemplo, las células tumorales son células extraídas del sujeto (paciente) que se va a tratar. Como alternativa las células tumorales pueden ser células de una línea celular tumoral, tales como las líneas celulares tumorales humanas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

5 Opcionalmente, las células se pueden someter a detección selectiva para identificar las células en las que se introdujo el vector. La detección selectiva se puede realizar mediante cualquiera de una cierta variedad de procedimientos, incluyendo seleccionar la expresión del marcador seleccionable si se ha usado uno, o la detección selectiva de la expresión de la proteína de fusión de OX-40L trimérica sobre la superficie de las células. Este último
10 procedimientos se puede realizar de forma conveniente mediante citometría de flujo usando un anticuerpo marcado específico de la porción extracelular de OX-40L o del dominio Ig.

Posteriormente, las células tumorales se administran al sujeto en combinación con un vehículo adecuado tal como agua tamponada, solución salina o glicina. En una realización, ***cuando las células tumorales son células
15 inicialmente extraídas del paciente, se atenúan antes de administrarse al sujeto. Una célula atenuada es una que es metabólicamente activa pero que ya no puede proliferar. Los métodos para atenuar las células tumorales se conocen bien e incluyen los descritos en el documento EP 733.373.

En una realización alternativa, las membranas celulares de las células tumorales que incluyen la proteína de fusión de OX-40L trimérica se pueden administrar al paciente en lugar de las células tumorales intactas. Una preparación de membrana celular se puede preparar fácilmente rompiendo o lisando las células usando técnicas estándar, tales como prensa francesa, congelación-descongelación o ultrasonidos. Tras la rotura de las células, mediante centrifugación se obtiene una fracción enriquecida en membrana.

25 Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de fusión de OX-40L capaz de ensamblarse en una proteína de fusión de OX-40L trimérica se pueden administrar directamente a un sujeto en forma de ADN "desnudo", de modo que se produzca la expresión del polipéptido de fusión de OX-40L en el cuerpo del sujeto. Los métodos de administración del ADN desnudo a los animales de un modo que produzca la expresión de dicho ADN en el cuerpo del animal se conocen bien y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs:
30 5.620.896; 5.643.578 y 5.593.972 y las referencias citadas en las mismas.

La presente divulgación también abarca otros métodos de inmunoterapia para tratar afecciones tales como cáncer, incluyendo inmunoterapia adoptiva. Como se sabe en la técnica, la inmunoterapia adoptiva implica obtener células linfoides expuestas a un antígeno concreto, cultivar dichas células ex vivo en condiciones en las que la actividad de las células se potencia y después administrar las células a un individuo. Las células linfoides son, preferentemente, linfocitos T extraídos de un paciente de cáncer, por ejemplo linfocitos T de un ganglio linfático drenante. Como se ha tratado anteriormente, el engarce del receptor OX-40 en estas células con una proteína de fusión de OX-40L trimérica estimulará estas células y potenciará la generación de linfocitos T de memoria. De acuerdo con ello, los métodos proporcionan una forma de inmunoterapia adoptiva en la que la incubación de células linfoides ex vivo se realiza en un medio que contiene un polipéptido de fusión de OX-40L trimérico antes de la administración de las células a un paciente. Los detalles técnicos de los métodos para obtener células linfoides, el cultivo ex vivo de dichas células con estimulantes inmunitarios y la administración a pacientes se conocen en el campo y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.ºs: 4.690.915; 5.229.115; 5.631.006 y 4.902.288 y las referencias citadas en las mismas.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: producción de un polipéptido de fusión de OX-40L

50 Una proteína de fusión de OX-40L:Ig humana multimérica de ejemplo (mostrada esquemáticamente en la figura 1) se preparó del siguiente modo. La construcción implicó el ensamblaje de cuatro dominios: una secuencia señal, el dominio Fc de la IgG1, una cremallera de isoleucina derivada del factor de transcripción GCN4 de levadura y por último en el extremo C-terminal, el dominio extracelular completo del OX-40L humano.

55 El punto de partida fue un pCMVFlag.1-TriZP-BAFF. TriZP es la cremallera de isoleucina y se denomina ILZ. El dominio BAFF en este plásmido está flanqueado por los sitios de restricción Eco RI (5') y Xho I (3'). El dominio extracelular completo (en C-terminal del dominio transmembrana) de OX-40L se amplificó a partir de un plásmido que contiene la secuencia de codificación de OX-40L humano de longitud completa mediante PCR. Para esta reacción, el cebador 5' contenía un sitio Eco RI flanqueante y un cambio A>T en la secuencia de codificación para eliminar 26 bases en el sitio Eco RI cadena abajo. El cebador 3' contenía un sitio Xho I flanqueante, un codón de terminación y un cambio A>T de 13 bases del sitio Xho I para eliminar otro sitio Eco RI de interferencia en esta posición. La primera mutación de A a T tuvo como resultado la sustitución de isoleucina por fenilalanina (p. ej., como se muestra en la SEC ID N.º: 3, 9º aminoácido). La segunda mutación de A a T no alteró la secuencia de aminoácidos del dominio de OX-40L codificado. ***El dominio extracelular OX-40L amplificado se escindió con Eco RI and Xho I, se purificó con electroforesis en gel de agarosa (purificado en gel) y se clonó en el sitio Eco RI/Xho I desocupado por el dominio BAFF en el vector pCMV. Los ahora contiguos dominios ILZ:OX-40L se amplificaron
65

mediante PCR a partir de este nuevo plásmido de pCMV usando un cebador 5' que contiene un sitio Sac I flanqueante y el mismo cebador 3' usado amplificando el dominio OX40L inicialmente. Se usó clonación TOPO TA ligando, mediante topoisomerasa, el producto amplificado en el plásmido pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La misma estrategia se usó amplificando y clonando el dominio Fc- γ humano a partir de IgG1 en pCR 2.1. El fragmento Fc- γ de IgG1 se modificó previamente convirtiendo el residuo Cys (tgt) en la región bisagra en Thr (acc) correspondiente a la base 799 en BC 041037. El cebador 5' incluyó un sitio Nhe I flanqueante, una base adicional, A, manteniendo el marco de lectura para la siguiente etapa de clonación y la secuencia de codificación iniciada con el codón de Thr mutado. El cebador 3' contiene un sitio Sac I flanqueante y la secuencia de codificación termina con Lys (aaa) C-terminal de la IgG1. El inserto ILZ-OX-40L se escindió de pCR 2.1 mediante escisión con Sac I y Xho I, se purificó en gel y se clonó en Fc- γ pCR2.1 también cortado con Sac I y Xho I. Esto tiene como resultado la colocación contigua de Fc- γ , ILZ y OX-40L y la inserción del dipéptido, Leu-Gln, codificado por el sitio SacI añadido entre Fc- γ y ILZ. Para la expresión en células de mamífero, la construcción, FC-ILZ-OX-40L, se clonó en una versión modificada del vector de expresión pCEP4 (Invitrogen). El plásmido, designado pCEP D4-7, se modificó para incluir la secuencia señal de la proteína de la membrana basal BM40 adyacente al sitio de clonación múltiple. pCEP4 controla la transcripción desde el promotor de CMV. La expresión del gen EBNA del virus de Epstein Barr promueve la replicación autosómica del plásmido y tiene como resultado un número elevado de copias. El inserto Fc-ILZ-OX-40L se escindió de pCR2.1 usando Nhe I y Xho I, se purificó en gel y se ligó en pCEP D4-7 también cortado con Nhe I y Xho I. La construcción final se analizó mediante análisis de restricción, como se muestra en la figura 2. El inserto se secuenció confirmando la autenticidad de la proteína de fusión codificada.

Ejemplo 2: producción de un polipéptido de fusión de OX-40L

Con el fin de producir la proteína de fusión OX-40L multimérica, la construcción de fusión Fc-ILZ-OX-40L se introdujo en células HK 293 mediante transfección con lipofectamina. La línea celular HK 293 es una línea celular bien establecida usada extensamente para la expresión proteica en mamíferos. El pCEP D4-7 contiene un gen de resistencia a higromicina que permite la selección de colonias transfectadas de forma estable de células 293 en presencia de higromicina. Dado que pCEP D4-7 se replica autosómicamente, todas las células resistentes a higromicina se combinaron y expandieron en cultivos celulares monitorizando la síntesis de Fc-ILZ-OX-40L. Para la producción de proteínas las células se cultivaron en un biorreactor a escala de laboratorio (Cell-Max). La proteína de fusión se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína G. Un perfil de elución de la proteína G de ejemplo se muestra en las figuras 3A y B. Como se muestra en la figura 3B, la elución máxima se observó en las fracciones 6 y 7. La identidad de la proteína eluida se confirmó mediante inmunorreactividad usando IgG anti-humana (figuras 4A y B) y anticuerpos frente al ligando de OX-40 antihumanos (figuras 4C y D). En condiciones reductoras, se observó que el producto predominante migraba a aproximadamente 43 kD, consistente con un polipéptido de fusión monomérico. En condiciones no reductoras, se observaron especies de peso molecular alto. Se observó una banda fuerte a 86 kD consistente con la formación de dímeros unidos por puentes disulfuro entre dos dominios Fc. El ensamblaje en trímeros implica interacciones no covalentes entre OX-40L y los dominios de trimerización y deja un dominio Fc sin aparear. La asociación entre los dominios Fc no apareados en dos proteínas de fusión de OX-40L triméricas tiene como resultado la formación de hexámero en condiciones nativas. No obstante, en geles de SDS-PAGE no reductores no se observa nada más grande que los dímeros tras la elución en un pH ácido.

Aunque el análisis de F-ILZ-OX-40L, tras la elución a pH ácido indicó el ensamblaje covalente adecuado de subunidades, el análisis mediante cromatografía de exclusión por tamaño en condiciones no desnaturantes indicó que el pH ácido indujo una agregación no covalente de la proteína en estructuras de orden superior. Evitando esta agregación, la proteína de fusión se eluyó a partir de la columna de la proteína G usando un medio de elución ActiSep (Sterogene, Carlsbad, CA), tamponado a un pH entre 4 y 7. Esta única etapa dio un grado alto de purificación (figura 5) y generó el material en el que después se analizó la estructura y la actividad biológica.

La contribución del dominio ILZ al plegamiento de la proteína de fusión Fc:OX-40L recombinante se demostró comparando el perfil de elución de la cromatografía de exclusión por tamaño de Fc:ILZ:OX-40L y Fc:OX-40L, como se muestra en la figura 6. Fc:ILZ:OX-40L eluye como un pico considerablemente homogéneo y simétrico a aproximadamente 20 ml, correspondiente a una esfera equivalente con una masa de aproximadamente 570 kDa. Esto es aproximadamente dos veces la masa prevista pero probablemente se deba a la estructura asimétrica conferida por los tres dominios de la proteína de fusión. Por el contrario, en ausencia del dominio ILZ, muy poco de la proteína purificada eluye a 20 ml y en su lugar, eluye como agregados grandes en el volumen vacío o como componentes de peso molecular bajo que probablemente sean monómeros sin ensamblar. Esto indica que para la molécula humana, el dominio de trimerización de ILZ está implicado en el plegamiento productivo del dominio de unión al receptor extracelular recombinante de OX-40L.

Ejemplo 3: proteína de fusión OX-40L trimérica indujo proliferación de linfocitos T

La contribución funcional del dominio ILZ se analizó comparando la actividad coestimuladora de Fc:ILZOX-40L con Fc:OX-40L en un ensayo de proliferación *in vitro* (figura 7). La figura 7 ilustra la actividad biológica de Fc:ILZOX-40L humano recombinante con y sin el dominio ILZ. Se analizó la actividad biológica de la proteína recombinante *in vitro* mediante coestimulación de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en respuesta a anti-CD3. Placas de cultivo de noventa y seis pocillos se revistieron con anticuerpos de captura de Ig anti-humana de cabra e Ig anti-ratón de

cabra, ambos a 2 µg/ml. Las placas se incubaron con CD3 anti-humano de ratón a 2 ng/ml, seguido de diluciones seriadas por dos de la proteína de fusión de OX-40L recombinante (1600 a 3 ng/ml). Los linfocitos T CD4 humanos purificados que se habían activado con PHA y cultivado durante cuatro días con IL2 (10U/ml) se lavaron y a cada pocillo se añadieron 5 x 10⁴ células por pocillo. Las células se marcaron con timidina-³H durante las últimas 16 horas de un cultivo de 62 horas, se recogieron y se contaron. Los resultados, mostrados en la figura 7, se presentan como CPM medias con la desviación estándar calculada con los pocillos por triplicado. Los resultados indican que la proteína de fusión de OX-40L trimérica que contiene el dominio ILZ produjo una coestimulación/estimulación dependiente de la dosis (mitogénesis) de los linfocitos T CD4⁺ mientras que la construcción que carece de dominio ILZ estaba esencialmente inactiva.

En vista de las muchas posibles realizaciones a las que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas solo son ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define en las reivindicaciones siguientes. Por tanto, los autores de la presente invención reivindican como su invención todo lo que entra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> Providence Health System
 20 Weinberg, Andrew D.
 Morris, Nicholas P.
 Peters, Carmen
 <120> PROTEÍNA DE FUSIÓN OX-40-INMUNOGLOBULINA TRIMÉRICA Y MÉTODOS DE USO
 <130> 6727-66916-02/03
 25 <150> 60/678.420
 <151> 6-5-2005
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 30 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc feature '
 35 <222> (1) .. (408)
 <223> Dominio de unión al receptor OX-40
 <400> 1
 cagggtatcac atcgggtatcc tgcatttcaa agtatcaaag tacaatttac cgaatataag 60
 aaggagaaaag gtttcatcct cacttcccaa aaggaggatg aaatcatgaa ggtgcagaac 120
 aactcagtca tcatcaactg tgatgggttt tatctcatct ccctgaaggg ctacttctcc 180
 caggaagtca acattagcct tcattaccag aaggatgagg agcccctctt ccaactgaag 240
 aagggtcaggc ctgtcaactc cttgatggtg gcctctctga cttacaaaga caaagtctac 300
 ttgaatgtga ccactgacaa tacctccctg gatgaattcc atgtgaatgg cggagaactg 360
 attcttatcc atcaaaatcc tgggtgaattt tgtgtccttt aactcgag 408
 <210> 2
 40 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (1) .. (133)
 <223> Dominio de unión al receptor OX-40
 <400> 2
 Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Phe Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
 1 5 10 15

ES 2 457 067 T3

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
 20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
 35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
 50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
 65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
 85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
 100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
 115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu
 130

<210> 3

<211> 135

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<213> Dominio de cremallera de isoleucina

<400> 3

cttggtggcg gaagtatcaa acagatcgaa gataagattg aagagatctt gagcaaaatc 60

taccacattg aaaacgagat cgcgcgcat aagaaactga tcggcgaacg tggccatggc 120

ggtgggtcga attca 135

10 <210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Dominio de cremallera de isoleucina

<400> 4

Ile Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr
 1 5 10 15

His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg
 20 25 30

<210> 5

<211> 691

20 <212> AND

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (691)

25 <213> Dominio Fc de inmunoglobulina

<400> 5

ES 2 457 067 T3

```

gctagcaacc gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg 60
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 120
tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg 180
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa 240
cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 300
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatogaga aaaccatctc 360
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga 420
gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat 480
cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg 540
gctggactcc gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 600
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 660
gcagaagagc ctctcctgt ctccgggtaa a 691

```

```

<210> 6
<211> 230
<212> PRT

```

5 <213> Homo sapiens

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (230)
<213> Dominio Fc de inmunoglobulina

```

10 <400> 6

```

Leu Ala Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1           5           10           15

```

ES 2 457 067 T3

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 7

<211> 1240

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión del ligando de OX-40

<400> 7

ES 2 457 067 T3

gctagcaacc gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcttgggggg 60
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 120
tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg 180
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa 240
cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa 300
ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 360
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga 420
gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccaggacat 480
cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt 540
gctggactcc gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 600
gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 660
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa agagctcctt ggtggcggaa gtatcaaaca 720
gatcgaagat aagattgaag agatcttgag caaaatctac cacattgaaa acgagatcgc 780
gcgcattaag aaactgatcg gcgaacgtgg ccatggcggg ggtcgaatt cacaggtatc 840
acatcggtat cctcgatttc aaagtatcaa agtacaattt accgaatata agaaggagaa 900
aggtttcatc ctcaacttccc aaaaggagga tgaaatcatg aaggtgcaga acaactcagt 960
catcatcaac tgtgatgggt tttatctcat ctccctgaag ggetacttct cccaggaagt 1020
caacattagc cttcattacc agaaggatga ggagcccctc ttccaactga agaaggtcag 1080
gtctgtcaac tccttgatgg tggcctctct gacttcaaaa gacaaagtct acttgaatgt 1140
gaccactgac aatacctccc tggatgactt ccatgtgaat ggcggagaac tgattcttat 1200
ccatcaaaat cctggtgaat tttgtgtcct ttaactcgag 1240

<210> 8

<211> 410

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido de fusión del ligando de OX-40

<400> 8

ES 2 457 067 T3

Leu Ala Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 1 5 10 15
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 20 25 30
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 35 40 45
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 50 55 60
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 85 90 95
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 100 105 110
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 115 120 125
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 130 135 140
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 165 170 175
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 180 185 190
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 195 200 205
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 210 215 220
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Leu Leu Gly Gly Gly Ser Ile Lys Gln
 225 230 235 240

ES 2 457 067 T3

Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
 245 250 255

Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly His Gly
 260 265 270

Gly Gly Ser Asn Ser Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Phe Gln Ser
 275 280 285

Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu
 290 295 300

Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val
 305 310 315 320

Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe
 325 330 335

Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro
 340 345 350

Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala
 355 360 365

Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn
 370 375 380

Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile
 385 390 395 400

His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 405 410

<210> 9

<211> 408

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

caggatcac atcggatcc tcgaattcaa agtatcaaag tacaatttac cgaatataag 60

aaggagaaag gttcatcct cacttcccaa aaggaggatg aatcatgaa ggtgcagaac 120

aactcagtca tcatcaactg tgatgggtt tatctcatct ccctgaagg ctacttctcc 180

caggaagtca acattagcct tcattaccag aaggatgagg agcccctctt ccaactgaag 240

aaggtcaggt ctgtcaactc ctgatgggt gcctctctga cttacaaaga caaagtctac 300

ttgaatgtga ccaactgacaa tacctcctg gatgaactcc atgtgaatgg cggagaactg 360

attcttatcc atcaaaatcc tggatgaatta tgtgtccttt aactcgag 408

<210> 10

10 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

15 <400> 10

gctagcaacc gacaaaactc acacatgc 28

<210> 11

ES 2 457 067 T3

```

<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador oligonucleotídico
  <400> 11
  ctcgagttaa agcacacaaa attc      24
  <210> 12
  <211> 63
10 <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <220>
   <221> misc_feature
   <222> (1) .. (63)
15 <223> Señal secretora
   <400> 12
   atgagggcct ggatcttctt tctcctttgc ctggccggga gggctctggc agccccgcta      60
   gcn      63
   <210> 13
   <211> 21
20 <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <220>
   <221> misc_feature
   <222> (1) .. (21)
25 <223> Señal secretora
   <400> 13
   Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
   1           5           10           15

   Ala Ala Pro Leu Ala
   20

```

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión, que comprende en una orientación de N-terminal a C-terminal:
- 5 un dominio de inmunoglobulina, en el que el dominio de inmunoglobulina es un dominio Fc;
- un dominio de trimerización, en el que el dominio de trimerización es un dominio de trimerización superenrollado seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 a) un dominio de cremallera de isoleucina,
- b) TRAF2,
- 15 c) Trombospondina 1,
- d) Matrilina-4,
- e) CMP (Matrilina-1),
- 20 f) HSF1, o
- g) Cubilina; y
- un dominio de unión al receptor, en el que el dominio de unión al receptor es un dominio de unión al receptor del
- 25 ligando (L) de OX-40;
- en el que el polipéptido de fusión se autoensambla en una proteína de fusión trimérica.
2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión de OX-40L trimérica se puede unir al
- 30 receptor OX-40 y estimular al menos una actividad mediada por OX-40.
3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 2, en el que la actividad mediada por OX-40 es la proliferación de linfocitos T CD4+.
- 35 4. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el dominio de unión al receptor OX-40 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEC ID N.º: 2.
5. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el dominio de cremallera de isoleucina comprende una
- 40 secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEC ID N.º: 4 con la capacidad para formar un dominio de trimerización superenrollado.
6. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, en el que el dominio Fc de inmunoglobulina comprende los dominios CH2 y CH3 del FC de IgG humana.
- 45 7. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la SEC ID N.º: 8.
8. El polipéptido de fusión de la reivindicación 7, que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 8.
- 50 9. El polipéptido de fusión de la reivindicación 7, en el que el polipéptido está codificado por un ácido nucleico que hibrida en condiciones muy rigurosas con un ácido nucleico con la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º: 7.
10. El polipéptido de fusión de la reivindicación 9, en el que el polipéptido está codificado por un ácido nucleico con la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º: 7 o una secuencia de polinucleótidos que comprende al menos un
- 55 codón degenerado con respecto a la SEC ID N.º: 7 que codifica un polipéptido idéntico.
11. Una proteína de fusión que comprende una pluralidad de los polipéptidos de fusión de la reivindicación 1.
12. La proteína de fusión de la reivindicación 11, que consiste en tres o seis polipéptidos de fusión.
- 60 13. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de fusión de la reivindicación 1 a 10 o la proteína de fusión de la reivindicación 11 o 12.
14. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 13, la secuencia de polinucleótidos que comprende en
- 65 dirección de 5' a 3':

una secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio Fc;

una secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio de trimerización superenrollado; y

5 un polinucleótido que codifica el dominio de unión al receptor del ligando OX40.

15. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 13, en el que el ácido nucleico hibrida en condiciones muy rigurosas con un ácido nucleico con la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º: 7.

10 16. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N.º: 7.

15 17. Una composición que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 1 a 10 o la proteína de fusión de la reivindicación 11 o 12, o que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión de la reivindicación 1 a 10 o la proteína de fusión de la reivindicación 11 o 12.

20 18. Un polipéptido de fusión de la reivindicación 1 a 10 o la proteína de fusión de la reivindicación 11 o 12 o el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para usar en un método de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el método: administrar a un sujeto expuesto a un antígeno, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión, ácido nucleico recombinante o composición farmacéutica, de modo que se potencia la respuesta inmunitaria al antígeno por el sujeto.

25 19. La proteína de fusión, el ácido nucleico recombinante o la composición farmacéutica de la reivindicación 18, en la que el sujeto es un sujeto humano.

20. La proteína de fusión de la reivindicación 19, en la que el sujeto está expuesto al antígeno antes de administrar la proteína de fusión.

30 21. La proteína de fusión de la reivindicación 20, en la que la proteína de fusión se administra al sujeto entre aproximadamente 0 y 10 días después de la exposición al antígeno.

35 22. La proteína de fusión de la reivindicación 20 o 21, en la que el antígeno y la proteína de fusión se administran al mismo tiempo.

23. La proteína de fusión de la reivindicación 20 o 21, en la que la proteína de fusión se administra expresando un ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L, en el que el polipéptido de fusión se ensambla en la proteína de fusión en al menos una célula del sujeto.

40 24. La proteína de fusión de la reivindicación 23, en la que el ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L se introduce ex vivo en al menos una célula y al menos una célula que comprende el ácido nucleico recombinante se introduce en el sujeto.

45 25. La proteína de fusión de la reivindicación 24, en la que la al menos una célula es una célula presentadora de antígenos o una célula tumoral.

50 26. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en la que el método comprende administrar la proteína de fusión introduciendo en el sujeto un vector viral o plasmídico que comprende el ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de OX-40L, en el que el polipéptido de fusión se ensambla en la proteína de fusión.

27. La proteína de fusión de la reivindicación 26, en la que el vector viral es un vector adenovírico, un vector retrovírico o un vector herpesvírico.

55 28. La proteína de fusión de la reivindicación 27, en la que el vector viral es un virus atenuado o inactivado.

29. La proteína de fusión de la reivindicación 18, en la que el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno tumoral.

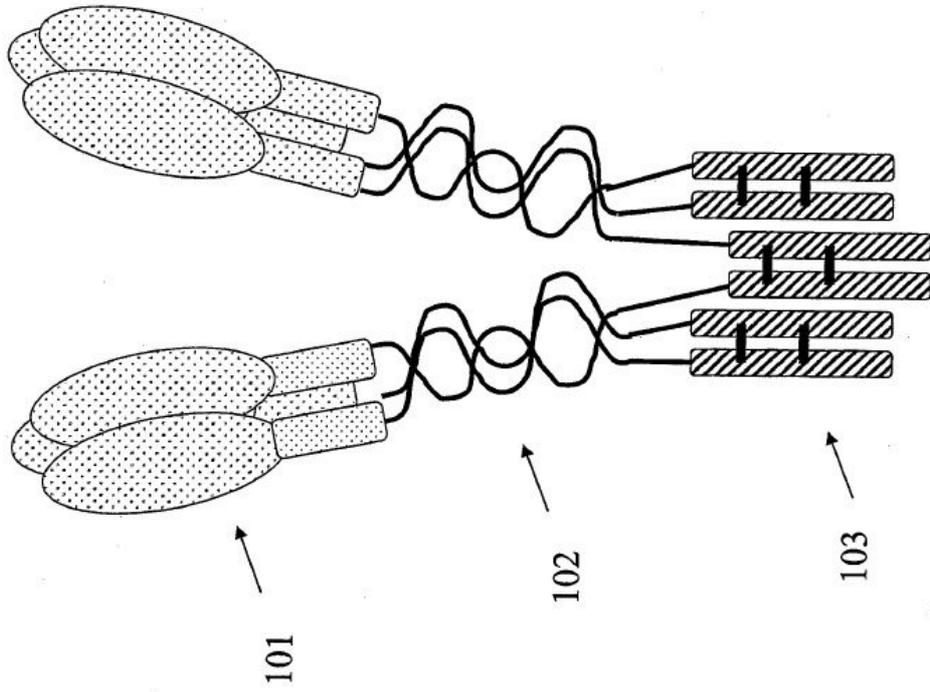


FIG. 1

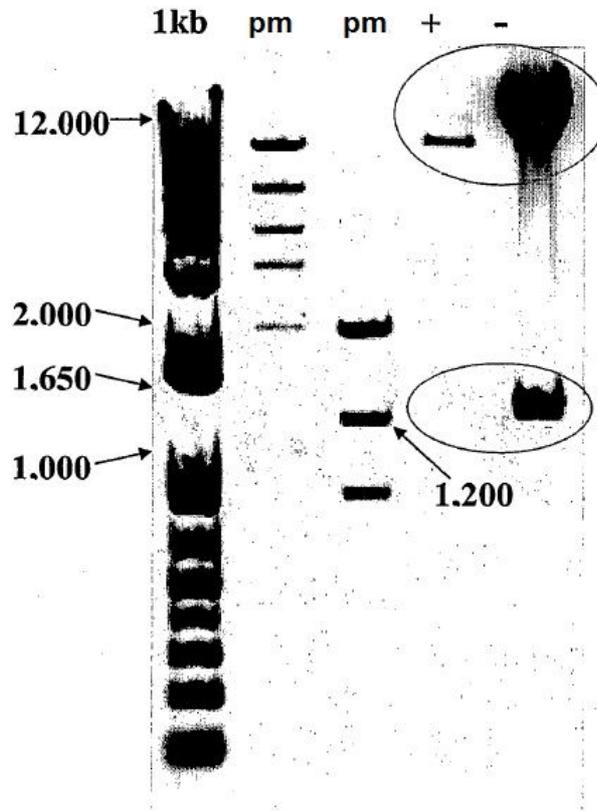


FIG. 2

FIG. 3A

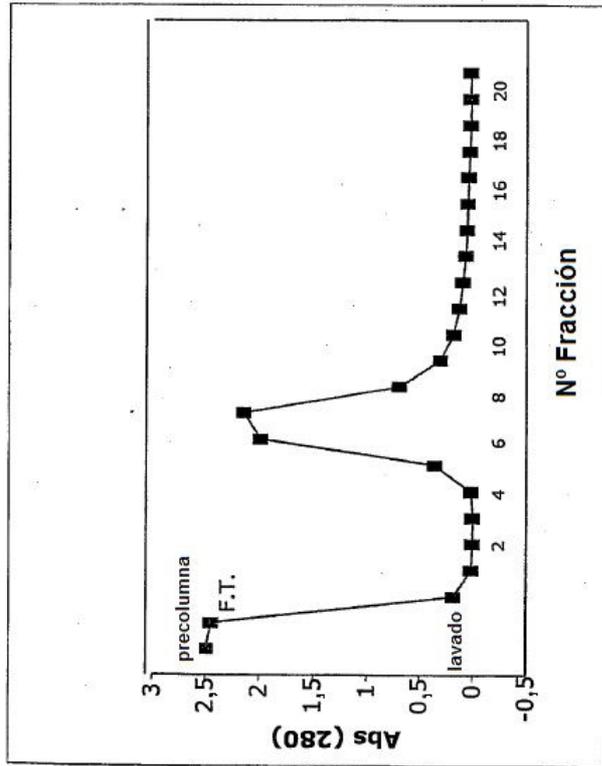
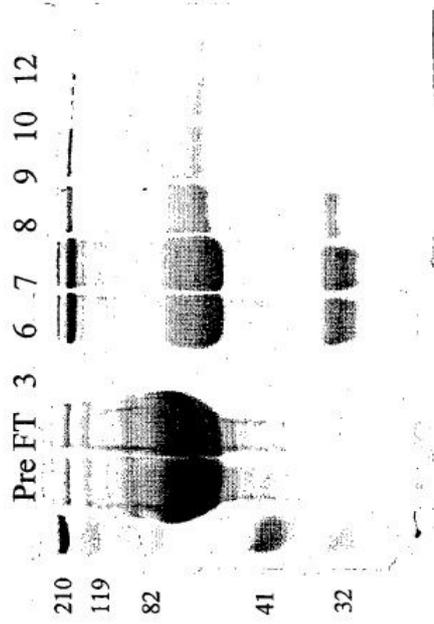


FIG. 3B



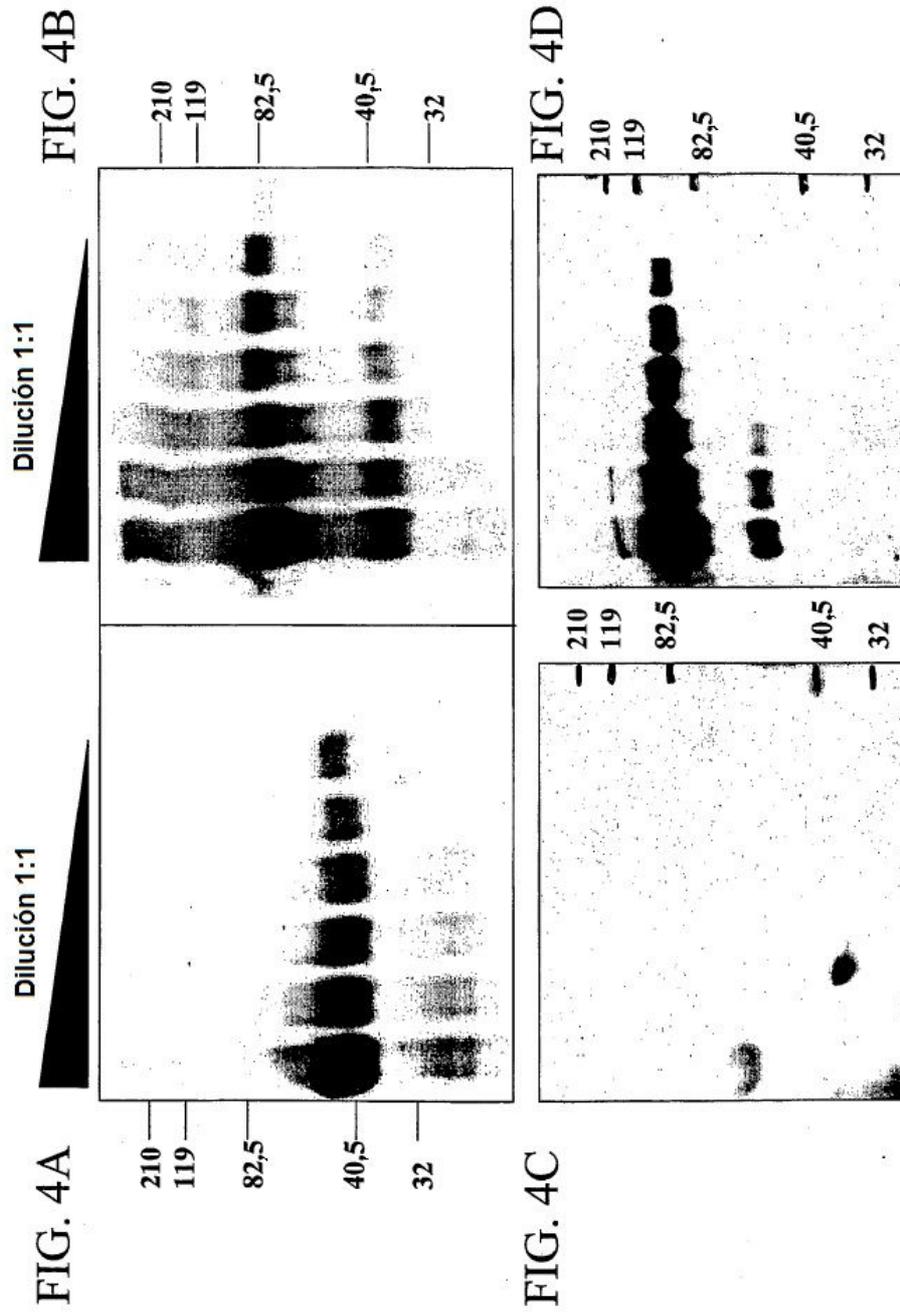
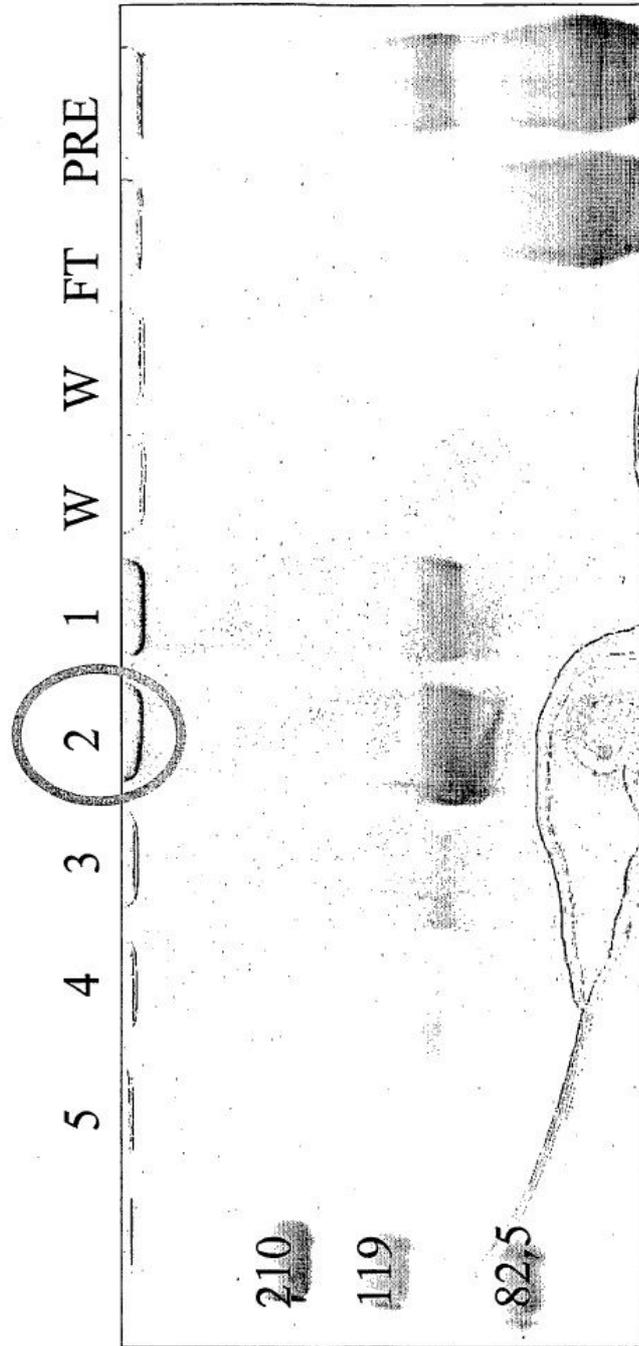


FIG. 5



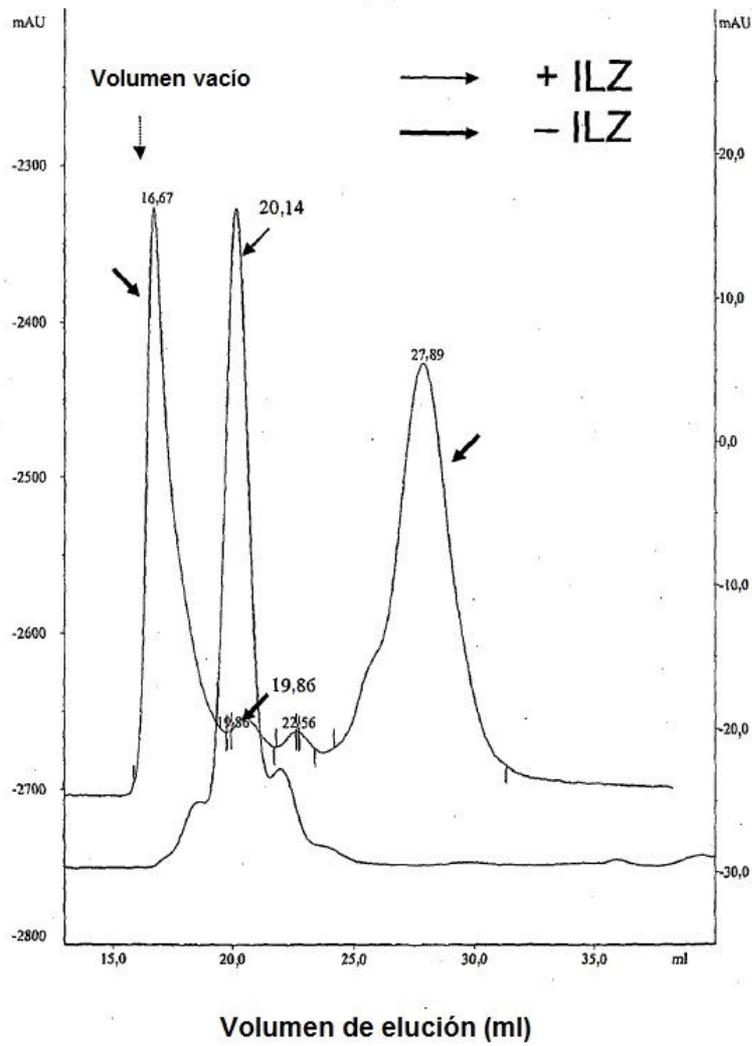


FIG. 6

FIG. 7

