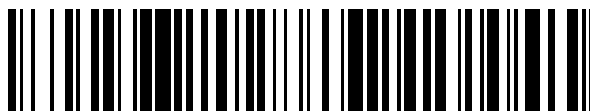


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 333**

51 Int. Cl.:

C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2010 PCT/US2010/027000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10105068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2010 E 10751427 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2406388**

54 Título: **Proteínas de fusión OX40/TRAIL**

30 Prioridad:

13.03.2009 US 159941 P

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA-CENTER FOR TECHNOLOGY
TRANSFER (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

TYKOCINSKI, MARK, L.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 609 333 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión OX40/TRAIL

5 La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden un dominio de unión a OX40 y un dominio de unión al receptor TRAIL, a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, a dichas proteínas de fusión para su uso en medicina, a dichas proteínas de fusión y dichas composiciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento de distintas enfermedades, y a una secuencia genética que codifica dicha proteína de fusión para su uso en métodos de tratamiento de distintas enfermedades.

10

Información de los antecedentes

15 Una interacción compleja entre señales positivas y negativas regula la activación de células T y el mantenimiento de la función efectora de células T. Los miembros de la superfamilia del ligando TNF/receptor TNF figuran de manera prominente en esta matriz de señales, uniéndose a las células del sistema inmunitario, así como con células de otros sistemas orgánicos. De esta manera, los miembros de la superfamilia TNF contribuyen a la homeostasis tisular y la patogénesis, por medio de los efectos sobre la supervivencia y muerte celular, diferenciación celular, e inflamación. Desde el punto de vista de la patogénesis autoinmunitaria, los miembros interesantes de la superfamilia de ligandos de TNF son el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y el ligando OX40.

20

25 El TRAIL se une con varios receptores equivalentes diferentes de la superfamilia de receptores TNF, dando lugar algunos al desencadenamiento de las rutas de señalización intracelulares y otros actuando simplemente como receptores señuelo. Los receptores desencadenantes en los seres humanos son TRAIL-R1, TRAIL-R2 y osteoprotegrina, y en los ratones el único receptor desencadenante es el DR5. Virtualmente todas las células del sistema inmunitario (linfocitos T, linfocitos B, células citolíticas naturales, células dendríticas, monocitos, granulocitos) regulan positivamente el TRAIL de superficie y/o liberan TRAIL soluble almacenado en vesículas secretoras en respuesta al interferón y otras señales de activación. El TRAIL inhibe la autoinmunidad en varios modelos animales. La prueba de la capacidad de TRAIL para inhibir la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple (ms), llegó de los experimentos que invocaban en los ratones knockout TRAIL $-/-$, el receptor soluble TRAIL (sDR5) o mAb anti-TRAIL neutralizantes capaces de bloquear la función de TRAIL y las células dendríticas derivadas de células madre embrionarias que co-expresan TRAIL y MOG patógeno (péptido glucoproteico de oligodendrocitos de mielina). De manera interesante, en pacientes con MS, el TRAIL soluble ha aparecido como un marcador de respuesta para la terapia de IFN- β , en los que responden al tratamiento más probablemente muestran una inducción precoz y sostenible de TRAIL soluble tras la terapia. Aun así, el impacto de TRAIL sobre la MS/EAE puede ser más complejo, por ejemplo, la sugerencia de que TRAIL puede promover la apoptosis de células cerebrales. Tanto TRAIL como FasL se han implicado en la inhibición de células T y la inducción de apoptosis en células T.

30

35

40 El CD134, también conocido como receptor OX40, es un miembro de la superfamilia de receptores TNF, y se encuentra predominantemente en células T activadas (Lamb et al., 1999 Cytometry 38: 238-243), mientras que su ligando, OX40L (también un miembro de la superfamilia de TNF), se expresa en células B activadas, células dendríticas y células endoteliales. La señalización OX40L:OX40 también se asocia con la supervivencia de las células de memoria efectoras y su función (Gramaglia et al., 2000 J Immunol 165: 3043-3050); (Soroosh et al., 2006 J Immunol 176: 5975-5987); (Soroosh et al., 2007 J Immunol 179: 5014-5023).

45

El documento US 2005/158823A1, Wiley SR et al. (2005) describe el TRAIL como una citocina inductora de apoptosis para ciertas células diana, incluyendo células cancerosas y células infectadas con virus.

50 La esclerosis múltiple es una enfermedad neurológica debilitante, y a pesar de un grupo en expansión de opciones de tratamiento, sigue existiendo una necesidad apremiante de agentes terapéuticos más eficaces. Aunque se desconoce la etiología precisa de MS, están surgiendo características clave de su patogénesis y evolución clínica. Se piensa que las células efectoras patógenas son cruciales para dirigir la enfermedad, y por lo tanto muchas rutas terapéuticas convergen en estas células, con objetivos tales como bloquear su activación y reactivación, eliminarlas a partir de depósito de células T más grandes, e interfiriendo su tránsito a sitios de patogénesis en el SNC.

55

60 La terapia genética localizada en la enfermedad desmielinizante autoinmunitaria del sistema nervioso central (SNC) ha evolucionado enormemente durante años. La terapia inmunogenética local en MS y EAE se ha convertido en una opción viable aunque las lesiones en estas enfermedades están diseminadas por todo el SNC. En comparación con la vía de suministro sistémico, la administración de inmunógenos localmente en el SNC ha sido más eficaz. La inyección de ADN desnudo tras la incorporación en lípidos catiónicos da lugar a una expresión transitoria. El uso de los vectores víricos deficientes en replicación tales como vectores adenovíricos o VHS da lugar a la expresión fiable de la proteína y el tratamiento satisfactorio de EAE. La transferencia genética se ha vuelto por lo tanto, en una opción viable, particularmente cuando se desea una expresión de inmunógenos localizada, tal como en las articulaciones, SNC, y otros espacios/compartimentos del cuerpo.

65

Lo que se necesita son proteínas de fusión que proporcionen una constelación de actividades asociadas con cada uno de estos importantes ejes de señalización, para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la esclerosis múltiple, tanto por administración sistémica y localizada.

5 Sumario de la invención

En consecuencia, en un aspecto la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprenden un primer dominio y un segundo dominio, en el que el primer dominio es un polipéptido que une un ligando OX40 y el segundo dominio es un polipéptido que se une a un receptor TRAIL y dirige señales inhibitoras a través de receptores equivalente sobre las células T u otras células que albergan el receptor TRAIL,

a) donde el primer dominio es al menos una parte del dominio extracelular OX40 y el segundo dominio es al menos una parte del dominio extracelular de TRAIL; o

b) donde el primer dominio es OX40 y el segundo dominio es FasL.

En aspectos adicionales, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión anterior, así como la proteína de fusión anterior y las composiciones farmacéuticas anteriores para su uso en medicina, y para su uso en métodos de tratamiento o mejoría de una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria o cáncer en un paciente.

La solicitud desvela un método para inhibir la proliferación y diferenciación de células T en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administración de una proteína de fusión OX40/TRAIL a un paciente.

La solicitud desvela además una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, donde el primer dominio es un polipéptido que se une a un ligando OX40 y el segundo dominio es un polipéptido que tienen una función inhibitora.

La invención proporciona también secuencias para su uso en un método de tratamiento o mejoría de una enfermedad inmunitaria, enfermedad autoinmunitaria o cáncer en un paciente, donde las secuencias genéticas codifican proteínas de fusión OX40/TRAIL humanas específicas de la presente invención.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes más fácilmente a partir de los siguientes dibujos, la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención se entenderá mejor cuando se lea en conjunto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, se muestran en los dibujos las realizaciones que son preferidas en el presente. Se debería entender, sin embargo, que la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones que se muestran en los dibujos.

La Figura 1 es una imagen que demuestra que la validación de la expresión del gen de transferencia de luciferasa intratecal y cutánea en el SNC se detectaba tras el suministro intratecal de pLuc/ND (panel de la izquierda) y pLuc/SBC21 basado en transposón (panel del medio) 72 h tras la inyección de los respectivos plásmidos de expresión. La expresión de luciferasa en la almohadilla plantar se detectaba 24 h después de la inyección intradérmica de pLuc/ND (panel de la derecha).

La Figura 2, que comprende las Figuras 2A y 2B, es una serie de imágenes de demostración del ensamblaje y expresión de proteínas quiméricas que incorporan OX40.

La Figura 2A es una representación esquemática de las secuencias codificantes de OX40TRAIL humano y OX41Fcy1 humano. P1 – P4 designan las localizaciones de los cebadores utilizados para el ensamblaje OX40TRAIL, mientras que P1 y P5 – P7 designan los cebadores utilizados para el ensamblaje de OX40 Fcy1. Estas secuencias codificantes quiméricas respectivas se subclonaron en el vector de expresión pND, y se incorporaron ambas a la secuencia líder OX40 para la expresión in vivo. El cebador P8 reemplazaba a P1 para el ensamblaje en el vector LGFP empleado para la expresión in vitro de OX40TRAIL y OX40Fcy1.

La Figura 2B es una imagen que representa el análisis de transferencia de Western de la expresión de la proteína OX40·TRAIL en transfectantes. En este extremo, se ejecutó el medio acondicionado generado a partir de las células transfectadas establemente con pOX40·TRAIL/SecTag (calles de la izquierda) o pOX40·Fcy1/SecTag (calles de la derecha) en geles de acrilamida al 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se sondearon directamente con un Ac IgG antihumano (panel superior). Posteriormente, las membranas se despegaron y se volvieron a sondear con un Ac anti-OX40 humano (panel inferior).

La Figura 3, comprende las Figuras 3A hasta 3C, es una serie de imágenes que demuestran la inhibición de la hipersensibilidad por contacto por OX40TRAIL y OX40Fcy1.

La Figura 3A es un gráfico que resume los resultados de los experimentos en los que los ratones se sensibilizan por vía subcutánea con NP-O-Su y se tratan tras 5 días con inyecciones intradérmicas en el pie derecho o con

vehículo solo (2x PBS) , vector pND solo, pOX40-Fcγ1/ND, o pOX40-TRAIL/ND. 24 horas después todos los ratones se desafiaron con NP-O-Su en su pie derecho y con vehículo solo (DMSO) en su pie izquierdo. Las almohadillas plantares se midieron en otras 24 h. El eje y muestra la diferencia media en el grosor de la almohadilla plantar entre el pie derecho e izquierdo, con $N > 5$ para cada grupo. * diferencia significativa ($P < 0,05$) a partir del grupo de vector vacío; ** diferencia significativa a partir de los grupos de vector vacío y tratados con vehículo, ambos determinados utilizando un ensayo ANOVA de una vía.

La Figura 3B es una serie de imágenes que representan el análisis histopatológico en las almohadillas plantares de animales tratados. Había un edema significativo (flechas) en las almohadillas plantares derechas de los que se inyectaron con el vector pND solo (panel superior de la derecha) o no se inyectaron con el plásmido (abajo a la izquierda), mientras que las almohadillas plantares de los que se inyectaron con pOX40TRAIL/ND no presentaban edema significativo (abajo a la derecha). La inflamación observada es específica de antígeno ya que no se observaron infiltrados inflamatorios o edema en los pies izquierdos sin desafiar (superior izquierdo). La barra muestra 50 μm .

La Figura 3C es un gráfico que resume el efecto inmunomodulador local del OX40-TRAIL expresado cutáneamente. La sensibilización y desafío se llevaron a cabo como se ha expuesto en 3A anteriormente. Solo los pies derechos de los ratones recibieron pOX40-TRAIL/ND o pND, como se muestra, mientras que los pies derechos e izquierdos se desafiaron con NP-O-Su. Se midió el grosor de la almohadilla plantar 25 horas después del desafío con el agente sensibilizante. El eje y muestra la diferencia media del grosor de la almohadilla plantar (el grosor de los pies de ratones intactos se utilizó como línea basal), con $N \geq 5$ para cada grupo. * diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre los pies derechos e izquierdos de animales tratados con pND (vacío) y pOX40-TRAIL, con 5 animales por grupo y utilizando un ensayo ANOVA de una vía.

La Figura 4, comprende las Figuras 4A a 4D, es una serie de imágenes que demuestran la supresión de EAE por expresión intratecal de OX40-TRAIL.

La Figura 4A es un gráfico que representa los resultados de los ratones desafiados con MOG₃₈₋₅₀ tratados con una única inyección intratecal de plásmidos de complejos lípido-ADN el día 8 tras el desafío. A los animales se les asignaron valores clínicos diariamente. El eje y muestra la media de valoraciones clínicas en los grupos tratados con el vector pND solo ($n = 9$) y pOX40-TRAIL ($n = 8$).

La Figura 4B es un gráfico que descubre las valoraciones clínicas diarias sumadas para cada ratón individual en el experimento descrito en 4A y luego promediadas para dar como resultado las valoraciones clínicas acumuladas medias. * diferencia significativa entre los grupos tratados con el vector pND vacío y pOX40-TRAIL ($P \leq 0,05$).

La Figura 4C es un gráfico que representa los resultados de los animales desafiados y tratados como en 4A anteriormente, excepto por el uso del vector pSBC21 solo ($n = 21$; 3 experimentos agrupados) y pOX40-TRAIL/SBC21 ($n = 25$; 3 experimentos agrupados). Se muestran las valoraciones clínicas medias. Inserción: Análisis de transferencia de Western de las membranas sondeadas con Ac anti-OX40 humano, como se describe en Materiales y Métodos, que muestran la expresión de las proteínas de fusión que contienen OX40 en medios acondicionados de células CHO-S transfectadas con pOX40-TRAIL/LGFP (calle 1) y líquido cefalorraquídeo de los animales inyectados por vía intratecal con pOX40-TRAIL/SBC21 (calle 2).

La Figura 4D es un gráfico que representa la media de las valoraciones clínicas acumuladas para el experimento descrito en 4C anteriormente. * diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los dos grupos se determinó utilizando un ensayo ANOVA de una vía.

La Figura 5, comprende las Figuras 5A a 5C, es una serie de imágenes que demuestran la función supresora aumentada asociada con la quimerización OX40-TRAIL.

La Figura 5A es un gráfico que representa los resultados de los ratones desafiados con MOG₃₈₋₅₀ tratados con una única inyección intratecal el día 8 tras el desafío o con el vector pSBC21 solo ($n = 10$), pOX40/SBC21 ($n = 9$), pTRAIL/SBC21 ($n = 9$), o pOX40-TRAIL/SBC21 ($n = 7$). La media de las valoraciones clínicas acumuladas se calculó basándose en 17 días de observación tras el tratamiento. * diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo del vector pSBC21 solo. ** diferencia significativa ($p < 0,005$) entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo del vector SBC21 solo, determinada utilizando un ensayo ANOVA de una vía.

La Figura 5B es un gráfico que representa los resultados de los ratones descritos en 5A ($n = 3$) sacrificados el día 17, perfundidos de manera transcardíaca con PBS seguido por formalina en tampón fosfato, y se recuperaron sus cerebros y médulas espinales para el análisis histopatológico. Las secciones se tiñeron con H/E y se examinaron con ocultación y se asignaron las valoraciones en cuanto a desmielinización, infiltración monocitos/linfocitos, y supuración, así como una valoración de la lesión, como se describe en Materiales y Métodos.

La Figura 5C es una imagen de secciones teñidas con azul luxol rápido que demostraban una reducción de infiltrados inflamatorios (flecha) en los ratones tratados con pOX40-TRAIL/SBC21 (panel derecho), según se compara en los ratones tratados con el vector pSBC21 solo (panel izquierdo). Era evidente una desmielinización extensa (asteriscos) en ambos paneles. La barra mostrada define 50 μm .

Descripción detallada

Esta invención se refiere a OX40/TRAIL y proteínas de fusión relacionadas, y su uso en métodos para tratar enfermedades autoinmunitarias y cáncer.

En un aspecto de la presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, donde el primer dominio es un polipéptido que se une a un ligando OX40 y el segundo dominio es un polipéptido que se une a un receptor TRAIL y dirige señales inhibitoras por medio de los receptores equivalentes en células T otras células que albergan el receptor TRAIL,

a) donde el primer dominio es al menos una parte del dominio extracelular de OX40 y el segundo dominio es al menos una parte del dominio extracelular de TRAIL; o

b) donde el primer dominio es OX40 y el segundo dominio es FasL.

Definiciones

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tiene el mismo significado que entiende un experto habituado en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar algunos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

Como se utilizan en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tienen el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

“Aproximadamente” como se utiliza en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, significa que engloba variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos desvelados.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “proteínas de fusión” se refiere a proteínas quiméricas que comprenden secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas diferentes. Normalmente, las proteínas de fusión resultan de técnicas combinatorias in vitro bien conocidas en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, “biológicamente activo o inmunológicamente activo” se refiere a proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención que tienen una función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o actividad inmunológica (pero no necesariamente en el mismo grado) como las proteínas tipo silvestre individuales que están en los bloques construidos de las proteínas de fusión de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, una “eliminación” se define como un cambio en la secuencia de aminoácidos en el que uno o más restos de aminoácido están ausentes en comparación con la proteína de tipo silvestre.

Como se utiliza en el presente documento, una “inserción” o “adición” son un cambio en la secuencia de aminoácidos que ha resultado en la adición de uno o más restos de aminoácido en comparación con la proteína de tipo silvestre.

Como se utiliza en el presente documento una “sustitución” resulta del remplazo de uno o más aminoácidos por diferentes aminoácidos, respectivamente, en comparación con la proteína de tipo silvestre.

Como se utiliza en el presente documento, el término “variante” significa cualquier polipéptido que tiene una sustitución de, una eliminación de o una adición de uno (o más) aminoácidos a partir o en la secuencia, incluyendo las variaciones alélicas, en comparación con la proteína tipo silvestre, siempre y cuando la proteína de fusión variante resultante mantenga la menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de la actividad biológica o inmunológica en comparación con las proteínas de tipo silvestre que se utilizan en la presente invención. DE manera adicional, aunque en general es deseable que las variantes presenten un aumento de capacidad para unirse a una molécula determinada, en algunas realizaciones las variantes pueden diseñarse con una actividad ligeramente reducida en comparación con otras proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, en los casos en los que se quisiera como fin atenuar la actividad, por ejemplo, disminuir la citotoxicidad. Además, las variantes o derivados se pueden generar para que se unan más selectivamente a una de las variantes del receptor TRAIL (hay tres receptores TRAIL en seres humanos). Además, las variantes o derivados se pueden generar para que tengan propiedades de multimerización alteradas. Cuando las variantes se modifican genéticamente, se podría hacer para el dominio extracelular TRAIL completo, o para el dominio extracelular que se incorpora en la propia proteína de fusión.

Preferentemente, las variantes o derivados de las proteínas de fusión de la presente invención mantienen la hidrofobia/hidrofilia de la secuencia de aminoácidos. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo desde 1, 2 o 3 a 10, 20 o 30 sustituciones siempre que la secuencia modificada mantenga la capacidad para actuar como una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos de origen no natural, por ejemplo, para aumentar la semivida plasmática.

Las sustituciones conservadoras se conocen en la técnica, por ejemplo según la tabla posterior. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferentemente en la misma línea de la tercera columna se pueden sustituir unos por otros.

10

ALIFÁTICOS		No – polares	GAP ILV
		Polares –sin carga	CSTM NQ
		Polares – cargados	DE KR
AROMÁTICOS			HFWY

El término “derivado” como se utiliza en el presente documento en relación con la secuencia de aminoácidos significa modificación química de una proteína de fusión de la invención.

15 “Codificar” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para funcionar como matriz para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas que resultan de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente al gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Se puede hacer referencia tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y que habitualmente se proporciona en los listados de secuencias, como a la cadena no codificante, que se utiliza como matriz de la transcripción de un gen o un ADNc como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

25 Como se utiliza en el presente documento “endógeno” se refiere a cualquier material de o producido en un organismo, célula, tejido o sistema.

Como se utiliza en el presente documento, el término “exógeno” se refiere a cualquier material introducido desde o producido fuera de un organismo, células, tejido o sistema.

30

El término “expresión” como se utiliza en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótido particular dirigidas por su promotor.

35 La expresión “vector de expresión” como se utiliza en el presente documento se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto genético capaz de ser transcrito. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen entonces en una proteína, polipéptido, o péptido. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de secuencias de control, que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante a la que se une operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que tienen también otras funciones.

45 Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de secuencias que lo flanquean en un estado natural, es decir, un fragmento de ADN que se ha separado de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento, es decir, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se encuentra naturalmente. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes a los que acompaña naturalmente el ácido nucleico, es decir, ARN, ADN o proteínas, que lo acompañan naturalmente en la célula. El término incluye además, 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 una procarionota o eucariota, o que existe como una molécula separada (es decir, como un ADNc o un fragmento de ADNc genómico producido por PCR o digestión de enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

55 En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se presentan habitualmente. “A” se refiere a adenosina, “C” se refiere a citosina, “G” se refiere a guanosina, “T” se refiere a timidina, y “U” se refiere a uridina.

5 A menos de que se especifique otra cosa, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de otra y que codifica la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótido que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones hasta el punto que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede en alguna versión contener un intrón(es).

10 El término “polinucleótido” como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, ácidos nucleicos y polinucleótidos se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en “nucleótidos” monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se utiliza en el presente documento los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por medios disponibles en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando tecnología de clonación convencional y PCR™, y similares, y por medios sintéticos.

20 El término “polipéptido” como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de restos de aminoácido, que tienen habitualmente una secuencia definida. Como se utiliza en el presente documento el término polipéptido incluye mutuamente los términos “péptido” y “proteína”.

El término “promotor” como se utiliza en el presente documento se define como una secuencia de ADN que es reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótido.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “secuencia promotora/reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto genético unida operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia puede incluir una secuencia amplificadora y otros elementos reguladores que se necesitan para la expresión del producto genético. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, la que expresa el producto genético de una manera específica de tejido.

35 Un promotor “constitutivo” es una secuencia de nucleótidos, que cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto genético, hace que el producto genético se produzca en una célula en la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor “inducible” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto genético, hace que el producto genético se produzca en una célula sustancialmente cuando está presente en la célula un inductor que se corresponde con el promotor.

40 Un promotor “específico de tejido” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto genético, hace que el producto genético se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.

45 El término “ARN” como se utiliza en el presente documento se define como el ácido ribonucleico.

La expresión “ADN recombinante” como se utiliza en el presente documento se define como un ADN que se produce uniendo piezas de ADN de diferentes orígenes.

50 La expresión “polipéptido recombinante” como se utiliza en el presente documento se define como un polipéptido producido utilizando métodos de ADN recombinante.

55 Como se utiliza en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad de una composición terapéutica suficiente para proporcionar un efecto beneficioso a un mamífero al que se administra la composición.

60 El término “transfectado” o “transformado” o “transducido” como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso por el cual se transfiere o introduce un ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula “transfectada”, “transformada” o “transducida” es la que ha sido transfectada, transformada o transducida con un ácido nucleico exógeno. La célula incluye el sujeto primario y su progenie.

La frase “bajo el control transcripcional” o “unido operativamente” como se utiliza en el presente documento significa que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

65 El término “vacuna” como se utiliza en el presente documento se define como un material que se utiliza para provocar una respuesta inmunitaria tras la administración del material a un mamífero.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para suministrar el ácido nucleico aislado en el interior de una célula. Se conocen en la técnica muchos vectores que incluye, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuesto iónicos o anfífilos, plásmidos, y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. También se tiene que considerar que el término incluye compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de un ácido nucleico a las células, tal como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos, y similares.

El término "virus" como se utiliza en el presente documento se define como una partícula que consiste en un ácido nucleico (ARN o ADN) encerrado en una cubierta proteica, con o sin una envoltura lipídica externa, que es capaz de replicarse en una célula completa.

Como se utiliza en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluyendo como se utilizan en los ejemplos y a menos de que se especifique expresamente otra cosa, todos los números se deben leer como si estuvieran precedidos por la palabra "aproximadamente", incluso si el término no aparece expresamente. También, cualquiera de los intervalos mencionados en el presente documento tiene la intención de incluir todos los sub-intervalos incluidos en los mismos.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, varios aspectos de la invención pueden presentarse en forma de formato. Se debería entender que la descripción en formato rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería considerar como una limitación inflexible de la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo debería considerarse que se desvelan específicamente todos los sub-intervalos posibles así como los valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 a 6 se debería considerar que se desvelan específicamente sub-intervalos tales como desde 1 a 3, desde 1 a 4, desde 1 a 5, desde 2 a 4, desde 2 a 6, desde 3 a 6, etc., así como los números individuales en ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

La presente invención proporciona, en un aspecto, una proteína de fusión que actúa en el eje de señalización OX40 y TRAIL, por ejemplo, una proteína de fusión que tiene un primer dominio que comprende un polipéptido que se une a un ligando OX40; y un segundo dominio que comprende un polipéptido que se une a un receptor TRAIL y dirige las señales inhibitoras por medio de receptores equivalentes en las células T u otras células que albergan el receptor TRAIL,

a) donde el primer dominio es al menos una parte del dominio extracelular de OX40 y el segundo dominio es al menos una parte del dominio extracelular de TRAIL; o

b) donde el primer dominio es OX40 y el segundo dominio es FasL. En particular el primer dominio es un polipéptido que tiene la capacidad de interferir la capacidad del ligando OX40 para la activación por medio de su receptor OX40, y el segundo dominio es un polipéptido que puede dirigir señales inhibitoras por medio de receptores equivalentes en las células T y otras células que albergan el receptor TRAIL.

Los primeros dominios adecuados en el contexto del eje de señalización OX40/TRAIL incluye, por ejemplo, la propia proteína OX40, variantes o derivados de la proteína OX40 de tipo silvestre, u otros polipéptidos y proteínas específicamente hechas a medida para unirse al ligando OX40, y evitar la señalización de este ligando por medio de su receptor OX40, tales como anticuerpos que se unen al ligando OX40, partes de anticuerpos que se unen al ligando OX40, y derivados de lipocalina modificados para unirse al ligando OX40. Preferentemente, el primer dominio de la proteína de fusión de esta realización es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína OX40, específicamente la parte del dominio extracelular que es necesaria para la unión del ligando OX40 y la interferencia con su capacidad para inhibir y activar un receptor OX40 unido a una membrana. Las variantes de la forma de tipo silvestre del dominio extracelular también se incluyen en la presente invención, o la parte del dominio extracelular responsable de la unión con OX40, siempre que la variante proporcione un nivel similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.

En consecuencia, el término "polipéptido que se une a un ligando OX40" como se utiliza en el presente documento incluye la proteína OX40; el dominio extracelular de la proteína OX40; un polipéptido que es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína OX40, la parte responsable para la unión a un ligando OX40; anticuerpos contra el ligando OX40; lipocalinas modificadas para unirse al ligando OX40; y variantes y/o derivados de estos. Se entiende que el término "OX40" engloba un polipéptido que es la secuencia de aminoácidos completa de la proteína OX40, que incluye los dominios citoplasmático, transmembrana y extracelular, así como los polipéptidos que son porciones más pequeñas de la proteína, tales como el dominio extracelular o una parte del dominio extracelular. En una realización el primer dominio en el par de señalización OX40/TRAIL es al menos una parte del dominio extracelular de un receptor OX40 humano.

Los segundos dominios adecuados en el contexto del eje de señalización OX40/TRAIL incluyen, por ejemplo, la propia proteína TRAIL, variantes o derivados de la proteína TRAIL u otros polipéptidos o proteínas que se diseñan específicamente para inhibir la activación de células T u otras células y/o inducir la apoptosis por medio del receptor TRAIL, tal como un Ac anti-TRAIL agonista, y variantes y derivados de estos. Preferentemente, el segundo dominio

5 de la proteína de fusión en esta realización es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína TRAIL, específicamente la porción que es necesaria para la unión a un receptor TRAIL. Las variantes de la forma silvestre del dominio extracelular de la proteína TRAIL, o la parte del dominio extracelular responsable de la unión con el receptor TRAIL, también se incluyen en la presente invención, siempre que las variantes proporcionen un nivel

10 similar de actividad biológica que la proteína de tipo silvestre.
En consecuencia, la expresión "polipéptido que se une al receptor TRAIL" como se utiliza en el presente documento incluye la proteína TRAIL; el dominio extracelular de la proteína TRAIL; un polipéptido que es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína TRAIL, la parte responsable de la unión a un receptor TRAIL; anticuerpos contra un receptor TRAIL; lipocalinas modificadas para unirse a un receptor TRAIL; y variantes y/o derivados de cualquiera

15 de estos. El término "TRAIL" se entiende que abarca polipéptidos que se corresponden con la secuencia de aminoácidos completa de la proteína TRAIL, incluyendo los dominios citoplasmático, transmembrana y extracelular, o una parte del dominio extracelular. En una realización el segundo dominio del par de señalización OX40/TRAIL es al menos una parte del dominio extracelular de la proteína TRAIL humana.

20 En una realización, la presente invención comprende una proteína de fusión OX40/TRAIL. En otra realización la expresión "proteína de fusión OX40/TRAIL" se refiere a la proteína de fusión específica identificada por SEQ.ID.NO.: 1:

SEQ.ID.NO. 1 OX40-TRAIL humana

25 MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG
MVSRCRSQNTVCRPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ
DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT
LQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQQGPSTRPVE
VPGGRAETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK
ALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKEN
TKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELK
ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG

En otra realización la expresión "proteína de fusión OX40/TRAIL" se refiere a la proteína de fusión específica identificada por SEQ.ID.NO.: 2:

30 **SEQ.ID.NO. 2 OX40-TRAIL humana**

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNG
MVSRCRSQNTVCRPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ
DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHT
LQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQQGPSTRPVE
VPGGRARGPQRVA AHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSY
PDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMD
HEASFFGAFLVG

35 Tanto SEQ.ID.NO. 1 y SEQ.ID.NO. 2 incluye péptidos de señal originales; estos péptidos pueden variar según las necesidades del usuario, el sistema de expresión, y otros factores, como entendería un experto en la técnica. Los péptidos de señal se conocen bien en la técnica, y se puede utilizar cualquier péptido de señal que se desee,

incluyendo los reconocidos/previstos por el software de reconocimiento de péptidos de señal disponible públicamente que conocen los expertos en la técnica.

- 5 En realizaciones adicionales, la proteína de fusión OX40/TRAIL es una variante y/o un derivado de la secuencia de aminoácidos que se presenta en SEQ.ID.NO. 1. En un aspecto adicional más de la presente invención, el componente TRAIL de cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento se pueden sustituir con otra proteína inhibidora, es decir, una proteína que evita la activación de una respuesta inmunitaria y/o induce apoptosis, anergia, y/o cualquier otra forma de no respuesta en células T u otros tipos celulares, tales como células B, células citolíticas naturales (NK), células NKT, células linfoides progenitoras, células dendríticas, 10 monocitos/macrófagos, células del linaje de macrófagos basadas en tejidos con capacidad de presentación de antígenos, y cualquiera de varias células presentadoras de antígeno no profesionales, por ejemplo, las células endoteliales. Ejemplos de proteínas inhibidoras incluyen, pero no se limitan a FasL, TNF, PDL-1, PDL-2, B7x, B7-H3 y CD31.
- 15 Por ejemplo, BTLA es un importante receptor inhibidor, B7x puede ser el ligando, además de otros ligandos que están por descubrir. DE manera similar CTLA-4 es otro receptor importante, y los ligandos que dirigen este inhibidor del receptor CTLA-4 incluyen algunas de las moléculas B7, así como Ac agonistas. En este caso las proteínas de fusión serían proteínas de fusión OX40/B7x y OX40/B7, respectivamente.
- 20 Existe la apreciación creciente de que las células B también pueden ser claves para dirigir la autoinmunidad. También se desvelan inhibidores adicionales de ligandos (fusionados con FnI4) que dirigen los receptores inhibidores de células B, tales como CD100 (que se une a CD72), CD5 (también se une a CD72), CD72 (que se une a CD5), Ep-CAM (unido a LAIR-1), agonistas de Fc-gamma-RII, CD22, PDL-1, PDL-2, CD66a, y PRI-B.
- 25 La bibliografía está repleta de ejemplos adicionales, tales como los que se enumeran en Sinclair, N. "Why so Many Coinhibitory Receptors?", *Scand. J. Immunol.* 50, 10-13 (1999); Melero, I. et al. "Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy", *Nature Rev. Cancer* 7:95-106 (2007); y Zang, X. et al., "The B7 Family and Cancer Therapy: Costimulation and Coinhibition", *Clin. Cancer Res.* 13: 5271-5279 (2007). Cualquiera de las proteínas inhibidoras mencionadas anteriormente se desvela por las proteínas de fusión y los métodos de la presente solicitud, 30 y se hace referencia en el presente documento como "polipéptidos que tienen una función inhibidora".

En consecuencia, la presente invención proporciona inter alia un par de fusión OX40/FasL. La solicitud desvela además OX40/pares de proteína de fusión, tales como OX40/PDL-1, OX40/PDL-2, OX40/TNF, OX40/CD100, OX40/CD5, OX40/CD72, OX40/Ep-CAM, OX40/Fc-gamma-RII, OX40/CD22, OX40/CD66a, OX40/PIR-B, OX40/B7x, 35 OX40/B7-H3 y OX40/CD31. Cualquiera de los primeros dominios descritos anteriormente en el contexto de los ejes de señalización OX40/TRAIL, por ejemplo, polipéptidos que se unen a un ligando OX40, serían primeros dominios adecuados.

40 En una realización, las proteínas de fusión de la presente invención inhiben la activación del sistema inmunitario evitando o reduciendo la proliferación y diferenciación de células T específicas de mielina. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención inhiben la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, IL-8, RANTES, IP-10 y MCP-1, o inhiben la potenciación de otras citocinas/quimiocinas, tales como TNF- α y IL-1 β ; o inhibe la inducción de metaloproteinasas de la matriz tales como MMP-1 y MMP-9; o inhiben la secreción de prostaglandinas E2 de fibroblastos y sinoviocitos. La presente invención abarca la inhibición/regulación 45 negativa de cada una de las citocinas que están promovidas por el ligando OX40 o moduladas negativamente por el ligando TRAIL.

50 En otras realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención inhiben la proliferación de células T autorreactiva, la producción de anticuerpos autorreactiva, y las reacciones inflamatorias.

La mayoría (aunque no todos) los miembros de la familia de los receptores TNF (TNFR) son proteínas transmembrana tipo II. Estas proteínas contienen un dominio extracelular que se caracterizan estructuralmente por la presencia de uno a seis dominios ricos en cisteína (CRD). El CRD típico es aproximadamente de 40 aminoácidos de longitud y contiene seis restos de cisteína conservados que forman tres puentes disulfuro intracatenarios. El 55 propio CRD está compuesto normalmente por dos módulos estructurales distintos.

TRAIL

60 TRAIL es una proteína de membrana tipo II que tienen 291 aminoácidos y se ha secuenciado para varias especies, incluyendo, pero no limitados a ratón: Swiss Prot. N° de acceso P50592; human: Swiss Prot. N° de acceso P50591; Rattus norvegicus: NCBI Acceso NP_663714; Siniperca chuatsi (Perca china): NCBI Acceso AAX77404; Gallus gallus (pollo): NCBI Acceso BAC79267; Sus scrofa (Cerdo): NCBI Acceso NP_001019867; Ctenopharyngodon idella (Carpa forrajera): NCBI Acceso AAW22593; y Bos taurus (ganado bovino): NCBI Acceso XP_001250249.

65 El dominio extracelular de TRAIL comprende los aminoácidos 39-281, y el dominio TNF responsable de la unión con el receptor es del aminoácido 121-280, basándose en los modelos de homología de TNF. La parte de la proteína

que particularmente importante para conferir la actividad se ha identificado. Véase, por ejemplo, "Triggering cell death: The crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor", Hymowitz SG, et al., *Am.Mol.Cell.* 1999 Oct; 4(4):563-71), que expone los aminoácidos más importantes para la unión de TRAIL a su receptor y la actividad son los aminoácidos alrededor del área de zinc tal como los aa (191-201-205-207-236-237) y los aminoácidos (150-216). véase también 1) Krieg A et al 2003 *Br. J of Cancer* 88: 918-927, que describe dos variantes TRAIL humanas sin actividad apoptótica, TRAIL- γ y TRAIL β ; 2) "Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL y CD95L", D Berg et al., *Cell death and differentiation* (2007)14,2021-2034; y 3) "Crystal Structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity", S. Cha et al., *J. Biol. Chem.* 275: 31171-31177 (2000).

OX40

El OX40, un miembro de la superfamilia de los TNFR, es un polipéptido de 277 aminoácidos de longitud. La región extracelular tiene los aminoácidos 29-214, siendo los aminoácidos 31-166 de esta la región de homología con TNFR, con tres CRD. La estructura y algunos sitios de unión críticos de OX40 y el ligando OX40 se han determinado. Compaan, D. et al., "The crystal structure of the Costimulatory OX40-OX40L complex", *Structure* 14: 1321-1330 (2006). Los CRD de OX40 parecen ser importantes para la unión del receptor del ligando OX40, incluyendo CD1, aa 30-65; CRD2, aa 67-81 y CRD3, aa 109-125. OX40 se ha secuenciado para varias especies diferentes, incluyendo pero sin limitarse a, ratón Swiss Prot. N° de acceso P47741: human: Swiss Prot. N° de acceso P43489; y rat: Swiss Prot. N° de acceso 15725.

Modificación

La presente invención se refiere a OX40/TRAIL y proteínas de fusión relacionadas. La invención también engloba variantes de las proteínas de fusión. Aunque en general es deseable que las variantes presenten un aumento de capacidad de unión a una molécula determinada, en algunas realizaciones, las variantes pueden diseñarse para que tengan una actividad ligeramente reducida en comparación con otras proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, en casos en los que se tenga como fin atenuar la actividad. Además, se pueden generar variantes o derivados que se unirían más selectivamente a una de las variantes de receptor TRAIL (hay tres receptores TRAIL en seres humanos). Además, se pueden generar variantes o derivados que tendrían propiedades de multimerización alteradas. Cuando se modifican variantes, se podría hacer en el dominio TRAIL extracelular completo, o en el componente del dominio extracelular que se incorpora en la propia proteína de fusión.

Preferentemente, las variantes o derivados de las proteínas de fusión de la presente invención mantienen la hidrofobia/hidrofilia de la secuencia de aminoácidos.

La invención también proporciona una modificación química de una proteína de fusión de la invención. Ejemplos no limitantes de dichas modificaciones pueden incluir pero no están limitadas a ésteres alifáticos o amidas del extremo carboxílico o de restos que contienen cadenas laterales carboxílicas, O-acil derivados de restos que contienen grupos hidroxilo, y N-acil derivados del aminoácido del extremo amino o restos que contienen grupos amino, por ejemplo, lisina o arginina.

Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, la producción de una proteína de fusión conjugada con polietilenglicol (PEG), o la adición de PEG durante la síntesis química de un polipéptido de la invención. Las modificaciones de polipéptidos o partes de los mismos pueden incluir también la reducción/alquilación; acoplamiento químico a un vehículo apropiado o tratamiento suave con formalina.

Otros derivados de las proteínas de fusión de la presente invención incluyen la incorporación de restos de aminoácido no naturales, o restos de aminoácido fosforilados tales como restos de fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina. Otras modificaciones potenciales incluyen la sulfonación, biotinilación, o la adición de otros restos, particularmente los que tienen formas moleculares a los grupos fosfato.

Los derivados también incluyen polipéptidos modificados por glicosilación. Estos se pueden producir modificando los patrones de glicosilación durante la síntesis y procesamiento en distintos sistemas de expresión alternativos en huéspedes eucariotas, o durante etapas de procesamiento adicionales. Los métodos para producir las modificaciones de glicosilación incluyen la exposición de las proteínas de fusión a enzimas de glicosilación derivadas de las células que llevan a cabo normalmente dicho procesamiento, tales como las enzimas de glicosilación de mamífero. De manera alternativa, se pueden utilizar enzimas de glicosilación para eliminar los carbohidratos unidos durante la producción en sistemas de expresión en eucariotas. DE manera adicional, también se puede modificar la secuencia codificante de manera que se añada un sitio(s) de glicosilación o se eliminen o incapaciten sitios de glicosilación. Además, si no se desea la glicosilación, las proteínas se pueden producir en un sistema de expresión en procariontas.

Las variantes y/o derivados de las proteínas de fusión de la invención se pueden preparar por síntesis química o utilizando mutagénesis dirigida al sitio [Gillman et al., *Gene* 8:81 (1979); Roberts et al., *Nature* 328:731 (1987) o Innis (Ed.), 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, N.Y.] o el método de

reacción en cadena de la polimerasa [PCR; Saiki et al., Science 239:487 (1988)], como se ejemplifica por Daugherty et al. [Nucleic Acids Res. 19:2471 (1991)] para modificar ácidos nucleicos que codifican los receptores completos.

5 Se pueden introducir modificaciones adicionales tales como las que estabilizan adicionalmente el trímero TRAIL y/o aumentan la unión al receptor TRAIL; y se pueden añadir espaciadores/enlazadores para alterar la distancia entre los dos componentes estructurales de la proteína de fusión, así como para alterar la flexibilidad de esta región. En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión de la presente invención pueden comprender además la adición de uno o más dominios de polipéptidos adicionales para facilitar la purificación de la proteína, para aumentar la expresión de la proteína recombinante, o para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante. Dichos dominios
10 que facilitan la purificación/expresión/solubilidad incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes metálicos tales como los módulos histidina-triptófano que permiten la purificación de metales inmovilizados (Porath J (1992) Protein Expr Purif 3-26328 1), dominios de proteína A que permiten la purificación de inmunoglobulina inmovilizada y el dominio que se utiliza en el sistema de purificación por afinidad/extensión FLAGS (Immunex Corp, Seattle, Wash.). La inclusión de una secuencia de enlazador escindible tal como el Factor Xa o enterocinasas (Invitrogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y OX40/TRAIL es útil para facilitar la purificación.

Los vectores de expresión de fusión adicional incluyen pGEX (Pharmacia, Piscataway, N.J.), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRITS (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan la glutatión S transferasa (GST), proteína de unión a maltosa B, o proteína A, respectivamente, para dirigirse a la proteína recombinante. También se
20 pueden utilizar EBV, BKV y otros vectores de expresión episómicos (Invitrogen). Además, también se pueden utilizar vectores de expresión lentivíricos y retrovíricos. Además, se pueden invocar uno cualquiera de varios sistemas de expresión in vivo diseñados para un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en organismos para producir las proteínas de fusión especificadas en el presente documento.

25 En otra realización una proteína de fusión de la presente invención puede contener una secuencia de señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de la proteína de fusión se puede aumentar por medio del uso de una secuencia de señal heteróloga. Las secuencias de señal se caracterizan normalmente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos, que se escinden generalmente de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Dichos péptidos de
30 señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia de señal de las proteínas maduras según pasan a través de la ruta secretoria. Por lo tanto, la invención está relacionada con los polipéptidos descritos que tienen una secuencia de señal, así como a polipéptidos en los que se ha escindido proteolíticamente la secuencia de señal (es decir, los productos de la escisión).

35 Con el fin de aumentar la estabilidad y/o reactividad, las proteínas de fusión de la presente invención también se pueden modificar para incorporar uno o más polimorfismos en la secuencia de aminoácidos que resulta de la variación alélica natural. De manera adicional, se pueden sustituir o añadir D-aminoácidos, aminoácidos no naturales o análogos no aminoácidos para producir una proteína de fusión modificada en el alcance de la presente invención.

40 Las secuencias de aminoácidos de la presente invención se pueden producir por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifican las mismas en un sistema de expresión adecuado.

Además, o alternativamente, la propia proteína de fusión se puede producir utilizando métodos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos deseada, completamente o en parte. Por ejemplo, se pueden sintetizar
45 polipéptidos por técnicas en fase sólida, escindidos de la resina, y purificados por cromatografía líquida de altas prestaciones de preparación (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman y Co, New York N.Y.). La composición de los polipéptidos sintéticos se puede confirmar por análisis de aminoácidos o secuenciación (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman). De manera adicional, la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de la invención, o cualquier parte de la misma, se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinada utilizando métodos químicos con una secuencia de otras subunidades, o
50 cualquier parte de la misma, para producir un polipéptido variante.

Los ensayos para medir la actividad inmunológica de cualquier homólogo, derivado o variante de cualquier proteína de fusión de la presente invención se conocen bien en la técnica.

55 Por ejemplo, se pueden invocar uno cualquiera de varios ensayos convencionales para controlar la producción de citocinas, como una medida de la activación y diferenciación de células inmunitarias. Por ejemplo, para hacer el seguimiento de la activación de células T, se puede emplear la interleucina-2 como marcador, que se puede ensayar como se describe en Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:1333 (1989). También está disponible un kit para un ensayo de la producción de interferones en Genzyme Corporation (Cambridge, Mass.). También se puede emplear
60 inmunofluorescencia y citometría de flujo para controlar la producción de citocinas en una base celular, y para controlar los marcadores de superficie celular que reflejan los estados de activación celular y/o diferenciación. Se conocen huéspedes de dichos marcadores, están disponibles ampliamente anticuerpos de detección, y se conocen bien en la técnica los marcadores.

65

Un ensayo común para la proliferación de células T se lleva a cabo midiendo la incorporación de timidina tritiada. La proliferación de células T se puede medir in vitro determinando la cantidad de timidina marcada con ³H incorporada en el ADN replicante de células cultivadas. Por lo tanto, se puede cuantificar la tasa de síntesis de ADN y, a su vez, la tasa de división celular.

5 Otro ensayo para controlar la proliferación de células T se basa en la carga de células T con el colorante CFSE, y el seguimiento posterior por citometría de flujo de la dilución de este colorante que acompaña las sucesivas divisiones celulares. Además para comprobar la inhibición de la proliferación de células T, la bioactividad de la proteína de fusión también se puede comprobar evaluando su capacidad para inducir apoptosis en líneas celulares tumorales
10 positivas al receptor TRAIL en las que el desencadenamiento del receptor TRAIL da lugar a apoptosis. Combinando estas células con otras células que tienen OX40L en sus superficies, se puede evaluar si los nuevos derivados de la proteína de fusión se anclan a OX40L y por tanto tienen aumentada su actividad proapoptótica dirigida por TRAIL de esta manera.

15 Composiciones farmacéuticas y regímenes de dosificación

La administración de las composiciones de la presente invención es normalmente parenteral, por inyección intravenosa subcutánea, intramuscular, o intraperitoneal, o por infusión o por cualquier otro método sistémico aceptable. La administración por infusión intravenosa se prefiere, normalmente durante un curso de tiempo de
20 aproximadamente 1 a 5 horas. Además, hay una variedad de métodos para suministro oral de las proteínas terapéuticas, y se pueden aplicar a las proteínas de fusión terapéuticas de la presente invención.

A menudo, las dosificaciones del tratamiento se titulan en aumento desde un nivel bajo para optimizar la seguridad y eficacia. En general, las dosificaciones diarias se encontrarán en un intervalo de aproximadamente 0,01 a 20 mg de proteína por kilogramo de peso corporal. Normalmente, el intervalo de dosificación será desde aproximadamente 0,1
25 a 5 mg de proteína por kilogramo de peso corporal.

Se pueden hacer varias modificaciones o derivados de las proteínas de fusión, tal como la adición de cadenas de polietilenglicol (PEGilación), para influenciar en sus propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas.

30 Para administrar la proteína de fusión por una administración distinta a la par enteral, puede ser necesario revestir la proteína con, o co-administrar la proteína con, un material que evite su inactivación. Por ejemplo, se puede administrar la proteína con un adyuvante incompleto, co-administrarse con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan
35 et al., (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Una "cantidad eficaz" de una composición de la invención es una cantidad que mejorará uno o más de los parámetros bien conocidos que caracterizan las afecciones médicas producidas por enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple. Muchos de dichos parámetros y afecciones se han descrito. Una cantidad eficaz, en
40 el contexto de la esclerosis múltiple, será la cantidad de proteína de fusión que es suficiente para conseguir uno o más de los siguientes: disminución de la gravedad de los síntomas; disminución de la duración de las exacerbaciones de la enfermedad; aumento de la frecuencia y duración de la remisión/periodos libres de síntomas de la enfermedad; evitar la discapacidad y disfunción fijas; y/o evitar/atenuar la progresión crónica de la enfermedad. Clínicamente, esto resultaría en una mejoría de los síntomas visuales (pérdida de visión, diplopía), trastornos de la
45 marcha (debilidad, inestabilidad axial, pérdida sensorial, espasticidad, hiperreflexia, pérdida de destreza), disfunción de las extremidades superiores (debilidad, espasticidad, pérdida sensorial), disfunción de vejiga (urgencia, incontinencia, hesitación, vaciado incompleto), depresión, labilidad emocional, discapacidad cognitiva. Patológicamente el tratamiento con proteínas de fusión de la presente invención reduce uno o más de los siguientes, tales como pérdida de mielina, rotura de la barrera hematoencefálica, infiltración perivascular de células
50 mononucleares, anormalidades inmunológicas, formación de cicatrices gliales y proliferación de astrocitos, producción de metaloproteinasas, y alteración de la velocidad de conducción.

Aunque las composiciones de la presente invención se pueden administrar en solución simple, normalmente se utilizan más en combinación con otros materiales tales como vehículos, preferentemente vehículos farmacéuticos,
55 Los vehículos farmacéuticos útiles pueden ser cualquier sustancia compatible, no tóxica adecuada para suministrar las composiciones de la invención a un paciente. El agua estéril, alcohol, grasas, ceras, y sólidos inertes se pueden incluir en un vehículo. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables (agentes tampón, agentes dispersantes) también se pueden incorporar en la composición farmacéutica. En general, las composiciones útiles para la administración parenteral de dichos fármacos se conocen bien; por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science,
60 17ª Ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990). De manera alternativa, las composiciones se pueden introducir en el cuerpo del paciente por sistemas de suministro farmacológicos por implante [Urquhart et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199 (1984)].

Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en muchas formulaciones de dosificación convencional. Las formulaciones comprenden normalmente al menos un principio activo, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones pueden incluir las que son adecuadas para su administración oral,
65

rectal, nasal o parenteral (incluyendo la subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se puede preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Véase, por ejemplo, Gilman et al. (eds.) (1990), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8ª Ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, supra, Easton, Pa.; Avis et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, N.Y.; Lieberman et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, N.Y.; y Lieberman et al. (eds.) (1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, N.Y.

En realizaciones adicionales, la presente invención contempla la administración de las proteínas de fusión por métodos de terapia genética, por ejemplo, por la administración de un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión de interés. Los bloques que constituyen la proteína (por ejemplo, el primer y segundo dominios) de las proteínas de fusión de la presente invención se han caracterizado bien, tanto las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas como las secuencias de aminoácidos de las proteínas resultantes. La modificación genética de dichos ácidos nucleicos por métodos de ADN recombinante está en la capacidad de un experto en la técnica. La optimización del codón, con el fin de maximizar los rendimientos de proteína recombinante, en escenarios celulares particulares, también está en las capacidades del experto en la técnica. La administración de un ácido nucleico aislado que codifica la proteína de fusión se engloba en la expresión "administrar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de la invención". Los métodos de terapia genética se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 que desvela el uso de métodos de terapia genética para generar anticuerpos intracelulares. Los métodos de terapia genética han sido demostrados satisfactoriamente en pacientes humanos. Véase, por ejemplo, Baumgartner et al., *Circulation* 97: 12, 1114-1123 (1998), y más recientemente, Fatham, C.G. 'A gene therapy approach to treatment of autoimmune diseases', *Immun. Res.* 18:15-26 (2007); y la Patente de EE. UU. Nº 7.378.089. Véase también Bainbridge JWB et al. "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital Amaurosis". *N Engl J Med* 358:2231-2239, 2008; y Maguire AM et al. "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's Congenital Amaurosis". *N Engl J Med* 358:2240-8, 2008.

Hay dos estrategias principales para introducir un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión (opcionalmente contenido en un vector) en las células de los pacientes; in vivo y ex vivo. Para el suministro in vivo se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, normalmente en el sitio en el que se necesita la proteína de fusión. Para el tratamiento ex vivo, se retiran las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Pat de EE. UU. Nº 4.892.538 y 5.283.187). Existe una variedad de técnicas disponibles para la introducción de ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped que se pretende. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, método de precipitación en fosfato cálcico, etc. Normalmente los vectores que se utilizan para suministro ex vivo del gen son los vectores retrovíricos y lentivíricos.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico in vivo preferidas incluyen la transfección con vectores víricos tales como adenovirus, virus del herpes simple I, virus adeno-asociados), sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo), ADN desnudo, y sistemas de expresión basados en transposón. Para revisar el marcaje conocido actualmente y los protocolos de terapia genética véase Anderson et al., *Science* 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673.

"Terapia genética" incluye tanto la terapia genética convencional donde se consigue un efecto duradero por un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos genéticos, que implican la administración una vez o repetidamente un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos sin carga. Las proteínas de fusión OX40/TRAIL de la presente invención pueden suministrarse utilizando métodos de terapia genética, por ejemplo localmente en lechos tumorales, por vía intratecal, o sistémica (por ejemplo, por medio de vectores que se dirigen a tipos de tejido específicos, por ejemplo, vectores víricos adeno-asociados específicos de tejido). En algunas realizaciones, las células primarias (tales como linfocitos o células madre) de un individuo se pueden transfectar ex vivo con un gen que codifique cualquiera de las proteínas de fusión de la presente invención, y luego devolviendo las células transfectadas al cuerpo del individuo.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención son adecuadas para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos del sistema inmunitario, que incluyen pero no se limitan a, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, neutropenia autoinmunitaria, autoinmuncitopenia, anemia hemolítica, síndrome anti-fosfolípido, dermatitis, enteropatía sensible al gluten, encefalomiелitis alérgica, miocarditis, policondritis recurrente, enfermedad cardíaca reumática, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía de IgA), esclerosis múltiple, neuritis, uveítis, oftalmia, poliendocrinopatías, púrpura (por ejemplo púrpura de Henloch-Schoenlein), enfermedad de Reiter, síndrome de Stiff-Man, inflamación pulmonar autoinmunitaria, miocarditis, glomerulonefritis de IgA, enfermedad de depósito denso, enfermedad cardíaca reumática, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus insulino dependiente, y ojo inflamatorio autoinmunitario, tiroiditis autoinmunitaria, hipotiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto), lupus eritematoso sistémico, lupus discoide, síndrome de Goodpasture, Pénfigo, autoinmidades de receptor tales como, por ejemplo,

(a) enfermedad de Grave, (b) miastenia gravis, y (c) resistencia a la insulina, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, artritis reumatoide, escleroderma con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad mixta de tejido conjuntivo, polimiositis/dermatomiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad, glomerulonefritis tales como glomerulonefritis primaria y nefropatía de IgA, penfigoide bulloso, síndrome de Sjögren, diabetes mellitus, y resistencia a fármacos adrenérgicos (incluyendo la resistencia a fármacos adrenérgicos con asma o fibrosis quística), hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, otros fallos de glándulas endocrinas, vitíligo, vasculitis, post-IM, síndrome de cardiopatía, urticaria, dermatitis atópica, asma, miopatías inflamatorias, y otros trastornos inflamatorios, granulomatosos, degenerativos, y atróficos.

10 En una realización, las proteínas de fusión de la presente invención se utilizan para tratar la esclerosis múltiple.

En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden utilizar para tratar varios tipos de cáncer. El TRAIL soluble se ha asociado con la inducción de apoptosis en ciertos tipos de células tumorales. Además, para ciertos tipos de tumor, la inflamación puede ser en ese momento pro-tumorigénica. Por lo tanto, una proteína de fusión TRAIL se puede utilizar para destruir células tumorales directamente, bloquear la inflamación pro-tumorigénica, y además, se pueden utilizar para bloquear la angiogénesis. El componente OX40 (el primer dominio) en este caso localizaría el TRAIL en las células positivas a ligando OX40 (por ejemplo, en el endotelio tumoral y/o en las propias células tumorales).

20 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular reglado positivamente. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o cánceres linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de riñón o renal, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma de células escamosas del pulmón, cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye el cáncer gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, tecoma, arrhenoblastoma, hepatoma, cánceres hematológicos que incluyen el linfoma no Hodgkin (NHL), mieloma múltiple y cánceres hematológicos agudos, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de glándulas salivares, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, leiomiomas, carcinomas del tracto urinario, carcinoma tiroideo, tumor de Wilm, así como linfoma de células B (incluyendo el linfoma no Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado medio/folicular; NHL de grado intermedio difuso; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de alto grado de células escindidas no grande; enfermedad NHL masiva; linfoma de células de manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo tras el trasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el que se asocia a tumores cerebrales), y síndrome de Meigs. “Tumor” como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celulares neoplásicos, sean malignos o benignos, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

45 “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección patológica o trastorno diana. Un sujeto se “trata” satisfactoriamente si, tras recibir una cantidad terapéutica de una proteína de fusión de la invención de acuerdo con los métodos de la presente invención, el sujeto presenta una reducción observable y medible o la ausencia de uno o más síntomas de una enfermedad particular. Por ejemplo, para el cáncer, la reducción del número de células cancerosas o la ausencia de células cancerosas; la reducción del tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente parar) de la metástasis tumoral; inhibición, hasta cierto punto, del crecimiento tumoral; aumento del tiempo de remisión, y/o alivio hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados al cáncer específico; reducción de morbilidad y mortalidad, y mejoría en la calidad de vida. La reducción de los signos o síntomas de una enfermedad puede sentirla también el paciente. El tratamiento puede conseguir una respuesta completa, definido como la desaparición de todos los signos del cáncer, o una respuesta parcial, en la que el tamaño del tumor disminuye, preferentemente más del 50 %, más preferentemente el 75 %. Un paciente también se considera tratado si el paciente experimenta una estabilidad de la enfermedad. En una realización preferida, los pacientes de cáncer están libres de progresión del cáncer incluso después de un año, preferentemente tras 15 meses. Estos parámetros para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejoría de la enfermedad son fácilmente medibles por los procedimientos de rutina familiares para un médico experto en la técnica.

60 En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden utilizar para tratar enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, rechazo de injertos, o enfermedad de injerto contra el huésped o huésped contra el injerto.

65

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan con fines solamente de ilustración, y la invención no se limita a estos Ejemplos, sino más bien engloba todas las variaciones que son evidentes de las enseñanzas que se proporcionan en el presente documento.

Los materiales y métodos empleados en los experimentos descritos en el presente documento se describen ahora.

Construcciones de plásmido:

La secuencia codificante del dominio extracelular OX40 humano (29-214) se unió en fase al del dominio extracelular del TRAIL humano (98-281). Esta quimerización se consiguió por medio de ensamblaje por PCR, utilizando clones EST de la ATCC como matrices (Huang et al. 2001 Int Immunol 13: 529-539). Los cebadores que se utilizaron para este ensamblaje eran los siguientes:

P1: GGGTTACCAGGATGTGCGTGGGGGC (SEQ ID NO: 3)
 P2: GTGGAGTCCCCGGGGGCCGTGCGGAAACCATTTCTACAGTT (SEQ ID NO: 4)
 P3: AACTGTAGAAATGGTTTCCGCACGGCCCCGGGGACCTCCAC (SEQ ID NO: 5)
 P4: ATTTGCGGCCGCTTATTAGCCAACTAAAAGGC (SEQ ID NO: 6)
 P5: GTGAGTTTTGTGTCAGATTTGGGCTCAGGGCCCTCAGGAGTCACCA (SEQ ID NO: 7)
 P6: TGGTGACTCCTGAGGGCCCTGAGCCAAATCTGACAAAACCTCAC (SEQ ID NO: 8)
 P7: ATTTGCGGCCGCTTATCATTACCCGGCAGAGAGGAGAG (SEQ ID NO: 9)
 P8: ATAGGCGGCCCATCATCACCATCATCTCCACTGTGTCGGGGACA (SEQ ID NO: 10)

Para la expresión in vivo, se emplearon el plásmido pND y el plásmido SBC21 'sleeping beauty' basado en transposón (Ivics et al., 1997 Cell 91: 501-510). Como es evidente por las secuencias de cebador anteriores, se incorporó un sitio de enzima de restricción KpnI en el cebador P1, y se incorporó un sitio NotI en los cebadores P4 y P7, para la subclonación en pND. Para la subclonación en pSBC21, se sustituyó un sitio HindIII por el sitio NotI en los cebadores P4 y P7. Los productos de la PCR se unieron en el plásmido pCR2.1 por clonación TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las construcciones se digirieron con KpnI y NotI, y los casetes movilizados se unieron en los sitios correspondientes de pND. El vector pND, originalmente un amable regalo de Gary Rhodes (UC-Davis), tiene un armazón de pUC19, un promotor CMV que incluye un intrón A (Chapman et al., 1991 Nucleic Acids Res 19: 3979-3986), e intrones BGH subclonados. Para los fines de la subclonación pSBC21, la secuencia codificante OX40-TRAIL, movilizada con digestión KpnI/HindIII, se unió en los sitios correspondientes del vector pMF, que contiene el promotor EF1 α . Posteriormente, el casete EF1 α -OX40-TRAIL se subclonó en pSBC21, tras la digestión con NotI.

Para verificar la actividad intratecal de los plásmidos pND y pSBC21 de expresión, se produjeron construcciones indicadoras de luciferasa pLUc/ND y pLuc/SBC21 utilizando estrategias de subclonación similares. Específicamente, para el vector de expresión pND, la secuencia codificante para la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) se subclonó a partir de pGL2 (Promega, Madison, WI) y se ligó en pND utilizando los sitios Sall y NotI. Para la construcción de expresión de luciferasa basada en pSBC21, la secuencia codificante de luciferasa de pTAL-Luc (BD Biosciences; San Jose, CA) se movilizó con HinIII y BamHI, y se subclonó en los sitios respectivos de pMFneo, y a su vez, el casete de expresión que englobaba el promotor EF1 α y la secuencia codificante de luciferasa se movilizó con NotI y se subclonó en pSBC21.

Para la expresión in vitro y la purificación de la proteína, se empleó una versión modificada del plásmido de expresión LGFP, pIRES2-EGFP (Clontech), en el que se insertó secuencialmente una secuencia Kozak completa (GCCGCCACC) y una secuencia de señal IgK (líder) (posicionada corriente arriba de un sitio de clonación múltiple, el sitio de entrada interna del ribosoma para el virus de la encefalomiocarditis (ECMV) y la secuencia codificante (GFP). En este extremo, se aprovecharon el sitio AscI y una secuencia codificante 6x His en el oligonucleótido cebador P8, y el sitio XhoI en los cebadores P4 y P7. La subclonación colocaba las secuencias codificantes OX40TRAIL u OX40 Fcy1 en el sitio de clonación múltiple de este vector, corriente abajo y en fase con la secuencia líder IgK, y corriente arriba del indicador GFP en el ARNm bicistrónico codificado (para facilitar la identificación de células que producen la proteína recombinante). El ADN plasmídico se propagó en *E. coli* y se aisló libre de toxinas en un kit de aislamiento de ADN (Endofree Maxi Kit, Qiagen).

Formación de imágenes de bioluminiscencia:

Se llevó a cabo la inyección intradérmica de ADN desnudo en la parte dorsal del pie derecho de cada ratón, utilizando una jeringa de tuberculina. Cada ratón recibió 20 μ g de ADN disuelto en 2x PBS, en un volumen total de 20 μ l. Para la expresión en el SNC, los ratones recibieron el día 8 tras el desafío una inyección intratecal lenta en la cisterna magna, utilizando una jeringa Hamilton, de 3 μ g de ADN en 9 μ l de lípido (MLRI). La mezcla de ADN: MLRI se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 30 min antes de la inyección. En el caso de los ratones que recibieron las construcciones de expresión de luciferasa, se llevó a cabo la formación de imágenes 24 o 72 h más tarde. Inmediatamente después de la inyección i.v. de 150 μ g/kg de peso corporal de D-luciferina en solución salina tampón fosfato, los ratones se anestesiaron con ketamina y xilacina (Sigma Aldrich). La formación de imágenes, utilizando un dispositivo de cámara

acoplada enfriada (Xenogen, Hopkinton, MA) y un tiempo de recolección de 1 minuto, se inició a los 6 min tras la administración de D-luciferina.

Transferencia de Western:

5 Se procesaron alícuotas de 20 μ l de medio acondicionado generado de transfectantes estables pOX40-TRAIL/SecTag o pOX40 Fcy1/Sec Tag en geles de acrilamida al 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon directamente con un Ac policlonal conjugado con peroxidasa anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch, Inc.; 1:6.000). Las transferencias se desarrollaron utilizando el reactivo
10 Chemiluminiscence Plus (PerkinElmer Life Sciences, Inc.). Las membranas se despegaron del Ac anti-IgG utilizando el Tampón Western Blot Stripping (Pierce, Inc), y luego se sondearon con Ac de conejo policlonal anti-OX40 humano (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:5.000) como Ac primario, y Ac de cabra policlonal conjugado con peroxidasa anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:10.000) como Ac secundario, y luego se desarrolló como se ha descrito anteriormente.

Hipersensibilidad por contacto:

Se sensibilizaron subcutáneamente ratones C57BL/6 hembra de cuatro semanas de edad, que se obtuvieron en Jackson Laboratories, con NP-O-Su (Biosearch Technologies, Inc) en DMSO como se había descrito previamente
20 (Yellayi et al., 2000 Endocrine 12: 207-213). Cinco días tras la sensibilización, se llevó a cabo una inyección intradérmica de ADN desnudo en la parte dorsal del pie derecho utilizando una jeringa de tuberculina. Cada pie derecho recibió 20 μ g de ADN disuelto en 2x PBS en un volumen total de 20 μ l, como se ha descrito anteriormente (Chesnoy S et al., 2002 Mol Ther 5: 57-62), mientras que se inyectó solo 2x PBS en el pie izquierdo. 24 horas después, los ratones se volvieron a sensibilizar en sus pies derechos con NP-O-Su, mientras que sus pies
25 izquierdos recibieron solo DMSO. Se midió el grosor de la almohadilla plantar 24 h tras la re-sensibilización, se sacrificaron los animales, y se recolectaron los pies para la sección y el análisis histopatológico. Se analizó la diferencia de grosor entre el pie izquierdo y el derecho. En este caso, se utilizó como línea basal el grosor de los pies de ratones intactos.

30 Para verificar que la supresión era local y no sistémica, se inyectó el pie derecho con ADN y el izquierdo con 2x de PBS solo, y luego ambos pies se desafiaron con antígeno. En este caso se determinó el grosor de la almohadilla plantar entre los pies.

Inducción de EAE y administración genética intratecal: Se inmunizaron subcutáneamente ratones C57BL/6 hembra
35 de ocho semanas de edad con 300 μ g de péptido MOG (38-50) en 200 μ l de PBS: adyuvante de Freund incompleto 1:1 que contenía (a una concentración final de 2,5 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis H37RA) divididos en dos inyecciones de 100 μ l cada una, una en cada flanco. Se administró toxina pertussis (10 ng en 200 μ l de PBS) i.p. inmediatamente, así como 48 h después. Para el tratamiento, se administró a los animales el día 8 post-desafío una
40 única inyección intratecal (10 μ l de la mezcla inyectada lentamente en la cisterna magna utilizando una jeringa Hamilton) de complejos ADN-lípidos, que contenían 3 μ g de ADN en 9 μ l de lípido (MLRI), que se había preincubado a 37 °C durante 30 min antes de la inyección.

Se observaron los ratones diariamente y se asignó una valoración clínica basándose en la siguiente secuencia: 0,
45 sin signos clínicos; 1, cojera trasera, 2, extremidades traseras débiles; 3 extremidades traseras paralizadas; 4, extremidades delanteras débiles y extremidades traseras paralizadas; 5, moribundo o muerto. Se suministró a los ratones con una valoración de 3 o más de transgel (Charles River, Wilmington, MA) para la hidratación para evitar la muerte por deshidratación, junto con pienso en el suelo de cada jaula de ratón.

Histopatología:

50 Los pies se fijaron en formalina tampón neutro, y se descalcificaron durante 24 horas antes de embeberlos en parafina. Los cerebros y las médulas espinales se fijaron en un 10 % de solución salina tampón fosfato durante una noche, y se embebieron en parafina. Se montaron las secciones (4 mm) en portaobjetos, se quitó la cera, se rehidrataron y se tiñeron con hematoxilina y eosina o azul luxol rápido y violeta de cresilo según los protocolos convencionales.

Se valoraron las características histopatológicas en la médula espinal. Las médulas espinales se valoraron en cuanto a la desmielinización, y los componentes celulares de lesiones inflamatorias en las secciones se graduaron
60 en una escala de 0-3. La desmielinización en las secciones se evaluó utilizando la tinción con azul luxol rápido específico de mielina de la materia blanca, con la siguiente valoración: 0 sin desmielinización evidente; 1, 0-10 % de materia blanca desmielinizada; 2, 10-30 % desmielinizada; 3, > 30 % desmielinizada. Se identificaron las células monocíticas y linfocíticas en las lesiones desmielinizadas por la morfología en las secciones teñidas con H y E, y se valoraron de la siguiente manera: 0, sin células mononucleares evidentes; 1, < 50 células mononucleares por campo a bajo aumento (10x); 2, 50-100 células mononucleares por campo a bajo aumento; 3, > 100 células mononucleares
65 por campo a bajo aumento (10x). Para la valoración de supuración, se identificaron los neutrófilos en las lesiones desmielinizantes por morfología en secciones teñidas con H y E, y se valoraron de la siguiente manera: 0, sin células

neutrófilas; 1, < 5 neutrófilos por campo a bajo aumento (10x); 2, 5-10 neutrófilos por campo a bajo aumento; 3, > 10 células neutrófilas por campo a bajo aumento. La valoración de la lesión es una valoración total que se obtiene sumando las valoraciones de desmielinización, monocitos/linfocitos y supuración.

5 Se describen ahora los resultados de los experimentos presentados en este Ejemplo.

Validación de la estrategia de transferencia genética in vivo por medio de formación de imágenes de luminiscencia

10 Como una primera etapa, se estableció la fiabilidad de la transferencia genética cutánea utilizando los vectores pND y SBC21, que incorporan los promotores CMV y EF1 α , respectivamente. Se insertó la secuencia codificante del indicador luciferasa corriente abajo de los promotores respectivos en dos vectores de expresión, generando pLuc/ND y pLuc/SBC21. Se inyectaron por vía intradérmica 20 μ g de la construcción de expresión pLuc/ND en los pies derechos de los ratones. La expresión de luciferasa era fácilmente detectable por formación de imágenes de bioluminiscencia en el pie (derecho) inyectado para pLuc/ND (Fig. 1, panel de la derecha), con una pequeña
15 disminución de la expresión a las 72 h (en comparación con las 24 h post-inyección; datos no mostrados). La expresión de luciferasa no se detectaba en ninguno de los pies izquierdos no inyectados (Fig. 1, panel derecho).

También se evaluó la capacidad de estas construcciones indicadoras de luciferasa para dirigir la expresión en el SNC. Se inyectaron por vía intratecal complejos vector-liposoma pLuc/ND y pLuc/SBC21, y se observaba una fuerte
20 expresión en el SNC reproducible para ambas construcciones de expresión a las 72 h post-inyección (Fig. 1, paneles izquierdo y del medio) y hasta una semana (datos no mostrados).

Disminución local de la hipersensibilidad de contacto por OX40·TRAIL

25 Habiendo documentado la utilidad de los vectores pND y pSBC21 para el suministro genético local (cutáneo e intratecal) utilizando un indicador de luciferasa, se aplicaron los vectores a una expresión proteica inmunomoduladora local. Para este fin, se diseñó un nuevo TSCP, OX40·TRAIL (Fig. 2A, panel superior), en el que el dominio extracelular de OX40 (una proteína de membrana Tipo I) se une al de TRAIL (una proteína de membrana Tipo II). La secuencia codificante quimérica para esta proteína de fusión, así como una secuencia codificante para
30 OX40·Fc γ ₁ (Fig. 2A, panel inferior) se subclonaron en el vector de expresión pLGFP. A su vez, las construcciones de expresión resultantes pOX40·TRAIL/LGFP y pOX40·Fc γ ₁/LGFP se transfectaron establemente en células CHO-S. Como se muestra en la Fig. 2B, ambas proteínas codificadas podían detectarse fácilmente en medios acondicionados de los transfectantes, se verificaron los tamaños esperados (44 kD para OX40·TRAIL; 49 kD para OX40·Fc γ ₁) en transferencias de Western de geles desnaturalizantes reductores.

35 Para permitir la expresión in vivo, se unieron las mismas secuencias codificantes OX40·TRAIL y OX40·Fc γ ₁ en el casete de expresión de pND, corriente abajo del promotor CMV, generando pOX40·TRAIL/ND y pOX40·Fc γ ₁/ND. Se inyectaron 20 μ g de cada uno por vía intradérmica en las almohadillas plantares derechas de ratones 5 días tras la sensibilización con NP-O-Su. Estos pies se re-sensibilizaron con NP-O-Su 24 h tras la administración de la
40 construcción de expresión, y se midió el grosor de la almohadilla plantar 24 h tras la re-sensibilización. Ambas construcciones de expresión que contenían OX40 daban como resultado reducciones significativas ($p < 0,05$) del grosor de la almohadilla plantar en comparación con los grupos de control con el vector solo o sin vector (Fig. 3A). Notablemente, la evaluación histopatológica revelaba una reducción significativa del edema de los pies que recibieron las proteínas de fusión inmunoinhibidoras, sin resistencia de infiltración mononuclear persistente (Fig.,
45 3B). No se veía inflamación en los pies izquierdos no inyectados, no sensibilizados.

Para determinar si se produce una supresión inmunitaria generalizada tras el suministro genético cutáneo, se inyectó por vía intradérmica pOX40·TRAIL/ND (20 μ g) en las almohadillas plantares derechas 24 h antes de la re-sensibilización en ambos pies. Eran evidentes disminuciones significativas del grosor de la almohadilla plantar
50 solamente en los pies (derechos) inyectados con plásmidos (Fig. 3C), sugiriendo que la inmunosupresión es predominantemente local y que no hay un efecto sistémico significativo de la proteína recombinante que se expresa cutáneamente.

OX40·TRAIL disminuye la gravedad de EAE de manera más eficaz que sus componentes OX40 y TRAIL aislados

55 Habiendo validado la eficacia inmunoinhibidora de OX40·TRAIL por transferencia genética vía cutánea en el modelo clásico de hipersensibilidad de contacto, se evaluó la eficacia de OX40·TRAIL en otro contexto de suministro genético local, a saber, la transferencia genética intratecal a nivel de EAE. Específicamente, los ratones se inyectaron por vía intratecal 8 días tras el desafío con MOG con 3 μ g de pOX40·TRAIL/ND frente al vector plásmido pND solo, formando un complejo con 9 μ l de MLRI (en un volumen total de 10 μ l). Como se muestra en las Fig. 4A y
60 4B, una única inyección intratecal de pOX40·TRAIL/ND reducía significativamente la gravedad de EAE en los ratones.

Se observó una supresión incluso mayor con el vector pSBC21, que incorpora el promotor EF1 α para la expresión genética (Fig. 4C, 4D). Los análisis de transferencia de Western del líquido cefalorraquídeo de animales que recibían la construcción de expresión pOX40·TRAIL/SBC21 mostraban cantidades fácilmente detectables de proteína 10 días

tras la inyección intratecal (Fig. 4C, inserción).

Se añadió otra dimensión a este análisis comparando la función de la proteína OX40·TRAIL quimérica con la de sus partes componentes (OX40, TRAIL), expresadas cada una aisladas. Para este fin, se construyeron dos construcciones de expresión adicionales pOX40/SBC21 y pTRAIL/SBC21. De manera importante, la administración intratecal de pOX40·TRAIL/SBC21 8 días tras el desafío con MGO (es decir, antes de la aparición de los síntomas de EAE) disminuía significativamente las valoraciones de EAE hasta el día 17, en comparación con el tratamiento con pOX40/SBC21, pTRAIL/SBC21, o solo el vector pSBC21 (Fig. 5A, 5B). Este hallazgo de mayor funcionalidad de la proteína de fusión, en comparación con sus partes componentes, era paralela a la del otro par de fusión, CTLA-4·FasL (Huang y Tykocinski, 2001).

Histopatología en los ratones tratados con pOX40·TRAIL/SBC21

No había diferencias significativas en la proliferación específica de MOG y producción de citocinas en los linfocitos de la periferia de los ratones tratados con OX40·TRAIL (datos no mostrados). Entonces se examinaron las características histopatológicas del modelo de ratón EAE tratado con OX40·TRAIL, o los elementos componentes aislados de la proteína de fusión. Para este experimento, los inventores seleccionaron ratones de cada grupo con una valoración clínica de 2,0-2,5 el día 17. Se examinaron las características histopatológicas de los cerebros y médulas espinales, y se asignaron las valoraciones basándose en las características histopatológicas: desmielinización, infiltración celular mononuclear, supuración, y valoración compuesta por la suma de las otras valoraciones. Incluso en los ratones de los dos grupos con valoraciones y niveles clínicos de desmielinización, las valoraciones de otras características histopatológicas se diferenciaban significativamente en los ratones tratados con OX40·TRAIL. Había menos leucomielitis supurativa e infiltración perivascular en los animales tratados con OX40·TRAIL que se sacrificaron el día 17, en comparación con los ratones tratados con el vector (Fig. 5C). Además, los valores de infiltración de monocitos/linfocitos, supuración, e histopatológicos compuestos eran significativamente menores para los animales tratados con pOX40·TRAIL/SBC21, en comparación con los tratados con pOX40/SBC21 o pTRAIL/SBC21 (Fig. 5B).

La Fig. 5C muestra las características histológicas de la desmielinización e inflamación de los ratones tratados con OX40·TRAIL en comparación con los ratones de control. Existe un grado equivalente de desmielinización en las médulas espinales de los ratones tratados con OX40·TRAIL y con solo el vector. Sin embargo, hay una disminución pronunciada de la celularidad de las lesiones desmielinizadas en los ratones tratados con OX40·TRAIL en comparación con los tratados con el vector solo (Figs. 5B y 5C). En particular, había un descenso en el contenido de monocitos/linfocitos y granulocitos en las lesiones desmielinizadas del grupo tratado con OX40·TRAIL. Estos datos sugieren que hay un diferente resultado de desarrollo de la lesión en los ratones tratados con OX40·TRAIL en comparación con los ratones que no reciben OX40·TRAIL. La disminución en el valor de monocitos/linfocitos y la disminución en el número de granulocitos en los ratones tratados con OX40·TRAIL sugieren que el OX40·TRAIL tiene efectos diferenciales en varios componentes celulares de las células que infiltran el SNC.

Ya que las realizaciones particulares de la presente invención se han descrito anteriormente con fines ilustrativos, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer numerosas variaciones de los detalles de la presente invención sin alejarse de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA Tykocinski, Mark L
 <120> Proteínas de fusión OX40/TRAIL
 <130> 46483-5183-00-WO
 <150> US 61/159.941
 <151> 13-03-2009
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 398
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1

ES 2 609 333 T3

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

ES 2 609 333 T3

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln
210 215 220

Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala
225 230 235 240

Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
245 250 255

Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
260 265 270

Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
275 280 285

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

Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
305 310 315 320

Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
325 330 335

Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
340 345 350

Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
355 360 365

Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
370 375 380

Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
385 390 395

5
<210> 2
<211> 379
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

ES 2 609 333 T3

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile
 210 215 220

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 225 230 235 240

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
 245 250 255

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu

ES 2 609 333 T3

aactgtagaa atggtttccg cacggccccc ggggacctcc ac 42

5 <210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador 4

<400> 6
attgcggcc gottattagc caactaaaaa ggc 33

15 <210> 7
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador 5

<400> 7
gtgagtttg tcagattgg gctcagggcc ctcaggagtc acca 44

25 <210> 8
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador 6

<400> 8
tggtagctcc tgagggccct gagcccaaat ctgacaaaac tcac 44

35 <210> 9
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador 7

<400> 9
attgcggcc gottatcatt taccggcag agaggagag 39

50 <210> 10
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 8

55 <400> 10
ataggcgcg ccatcatcac catcatctcc actgtgtcgg ggaca 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión que comprende un primer dominio y un segundo dominio, donde el primer dominio es un polipéptido que se une a un ligando OX40 y el segundo dominio es un polipéptido que se une a un receptor TRAIL y dirige señales inhibitoras por medio de los receptores equivalentes en las células T u otras células que albergan el receptor TRAIL,
- 10 a) donde el primer dominio es al menos una parte del dominio extracelular de OX40 y el segundo dominio es al menos una parte del dominio extracelular de TRAIL; o
b) donde el primer dominio es OX40 y el segundo dominio es FasL.
- 15 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde el segundo dominio comprende una proteína que induce apoptosis por medio del receptor TRAIL.
3. La proteína de fusión de las reivindicaciones 1 o 2, donde el primer dominio interfiere la capacidad de dicho ligando OX40 para la activación por medio de un receptor OX40.
- 20 4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO. 2.
5. La proteína de fusión de la cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 7. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en medicina.
8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en un método para tratar o mejorar una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad aloinmunitaria, o un cáncer en un paciente.
- 30 9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición de la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.
10. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde la proteína de fusión es para su administración parenteral.
- 35 11. Una secuencia genética para su uso en un método de tratamiento o mejoría de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad aloinmunitaria o un cáncer en un paciente, donde la secuencia genética codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 40

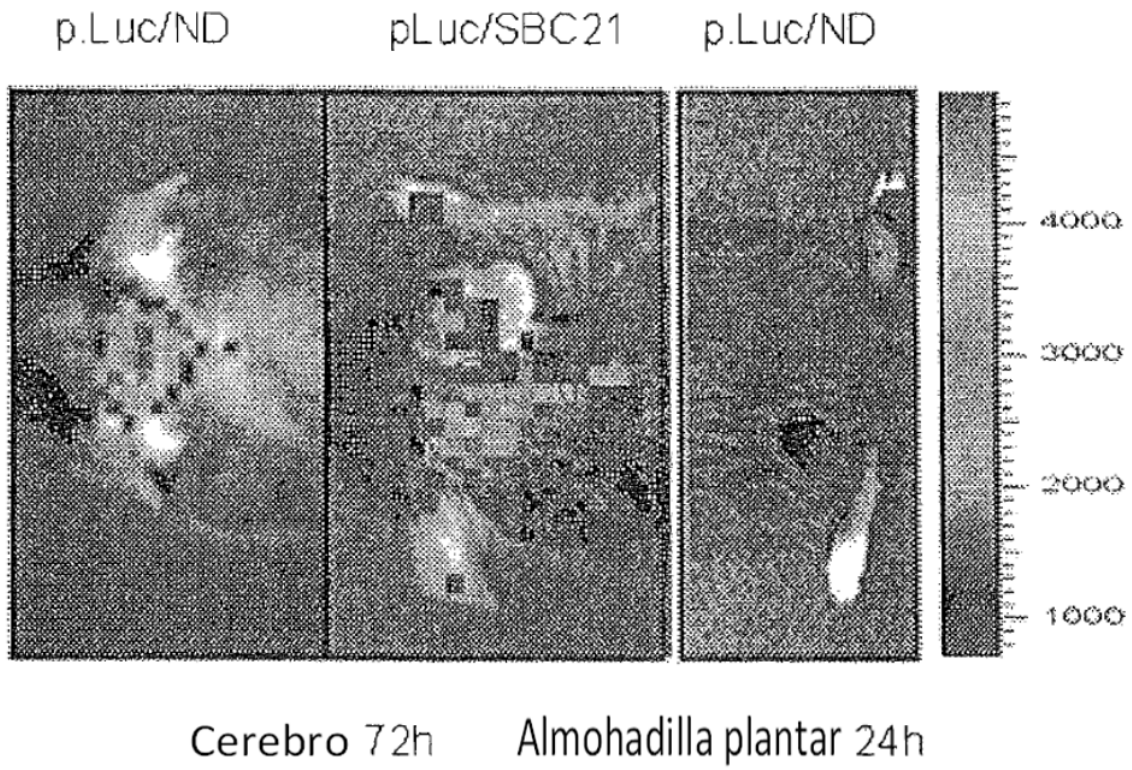


Figura 1

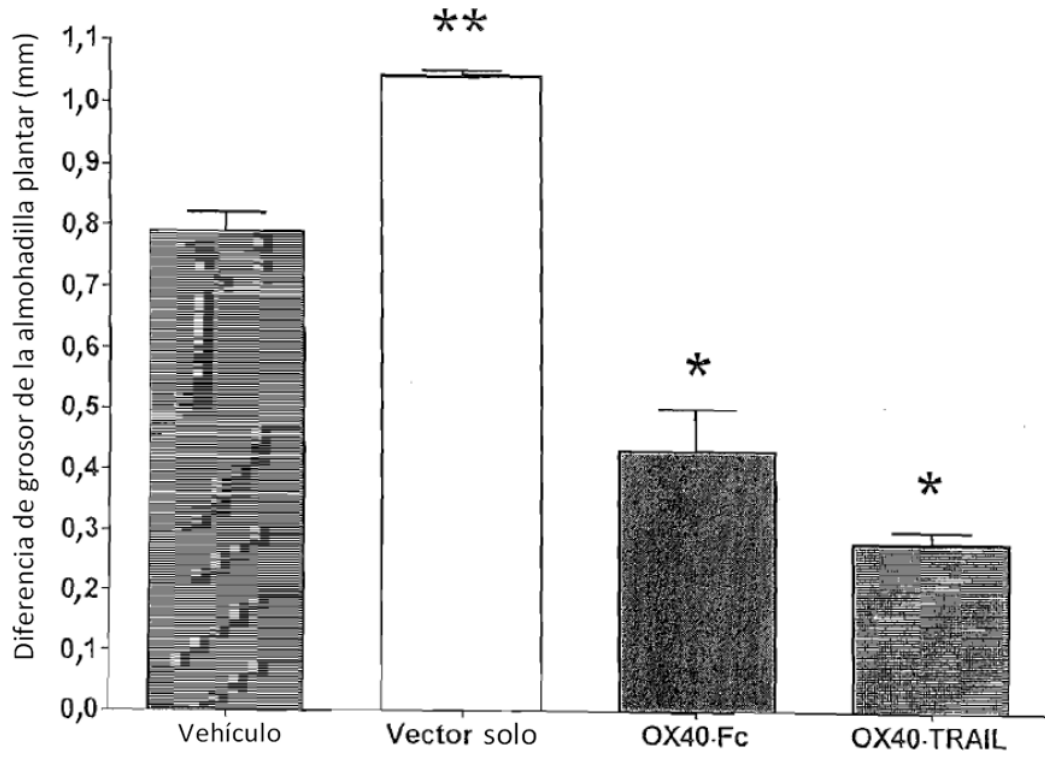


Figura 3A

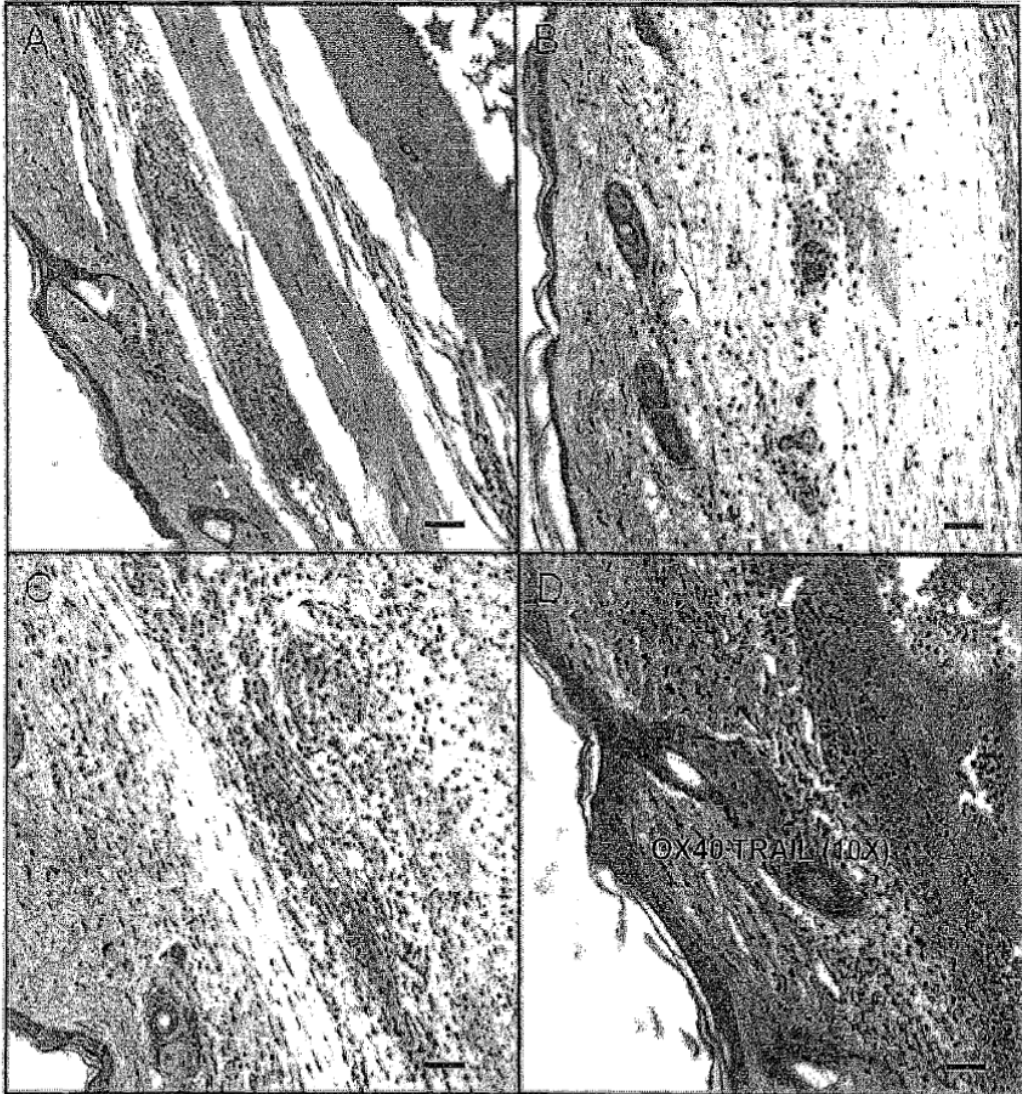


Figura 3B

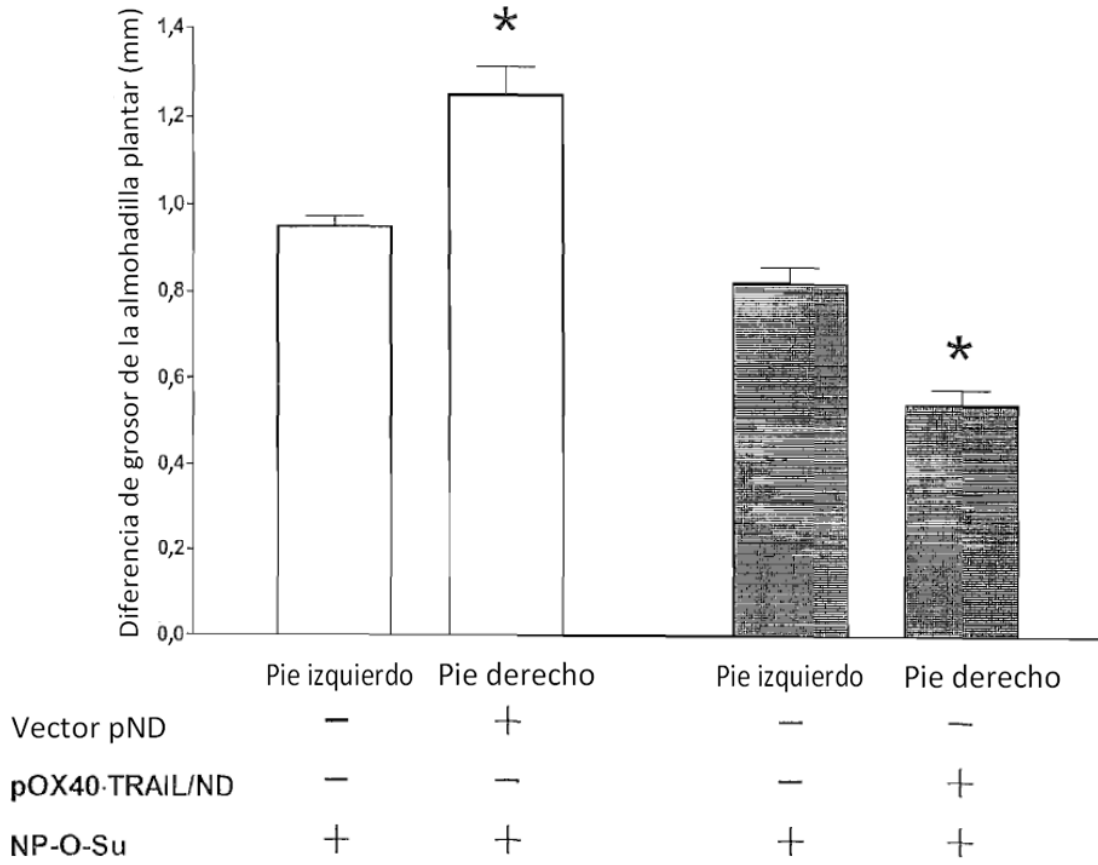


Figura 3C

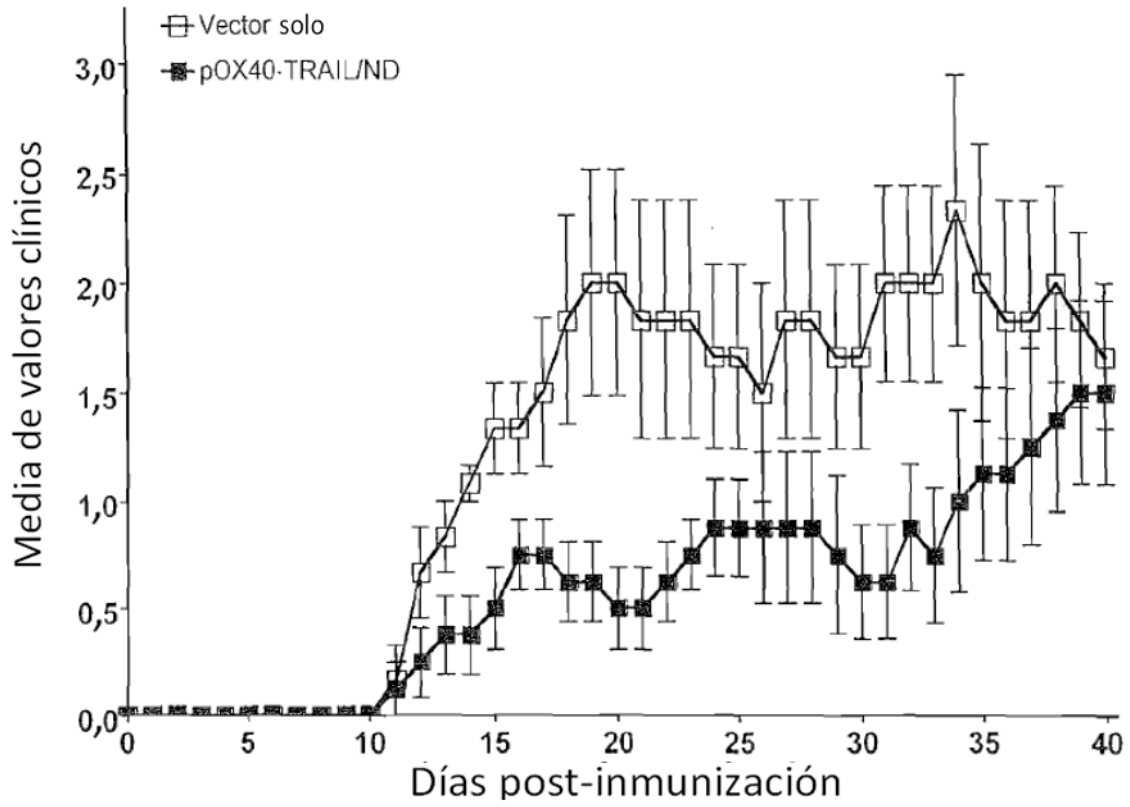


Figura 4A

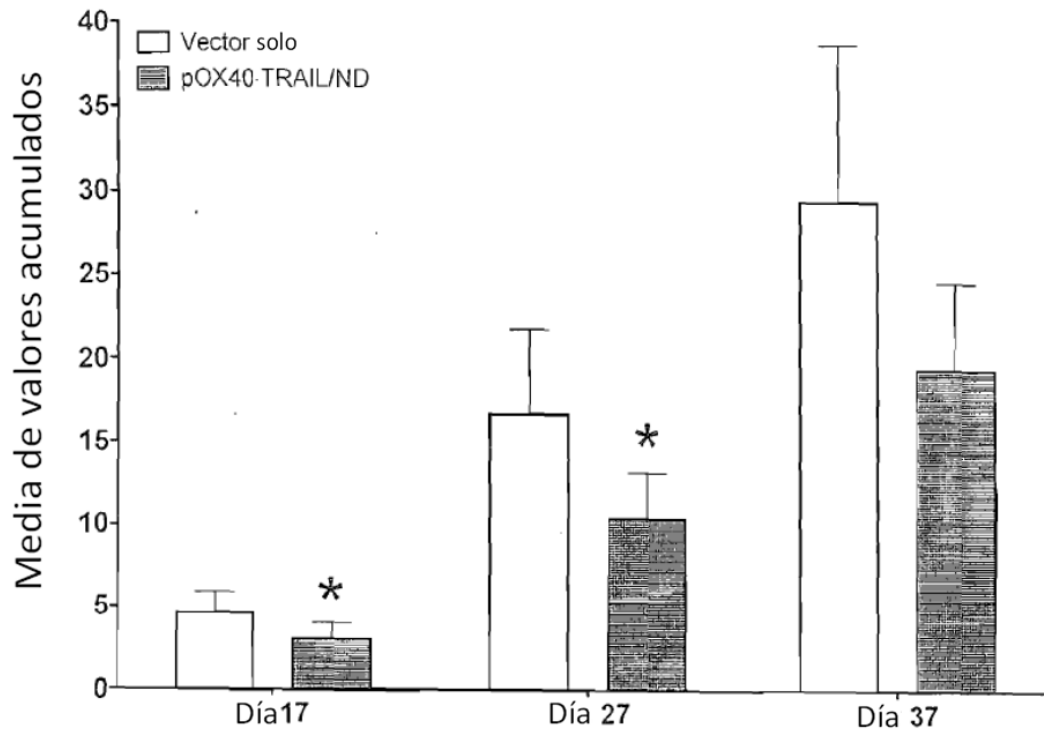


Figura 4B

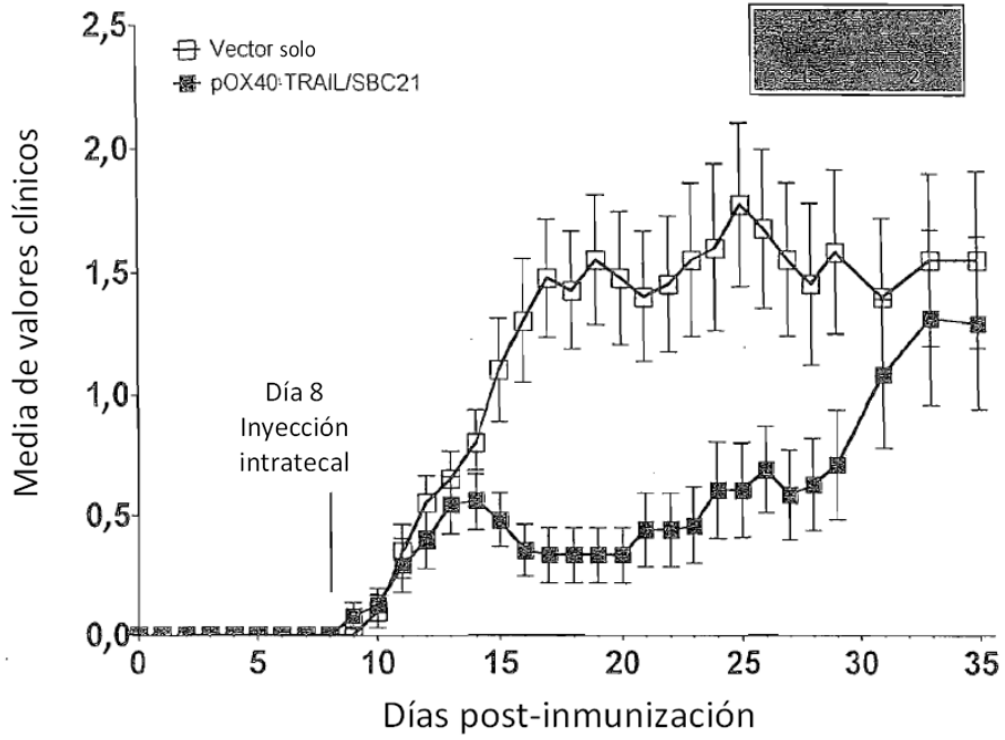


Figura 4C

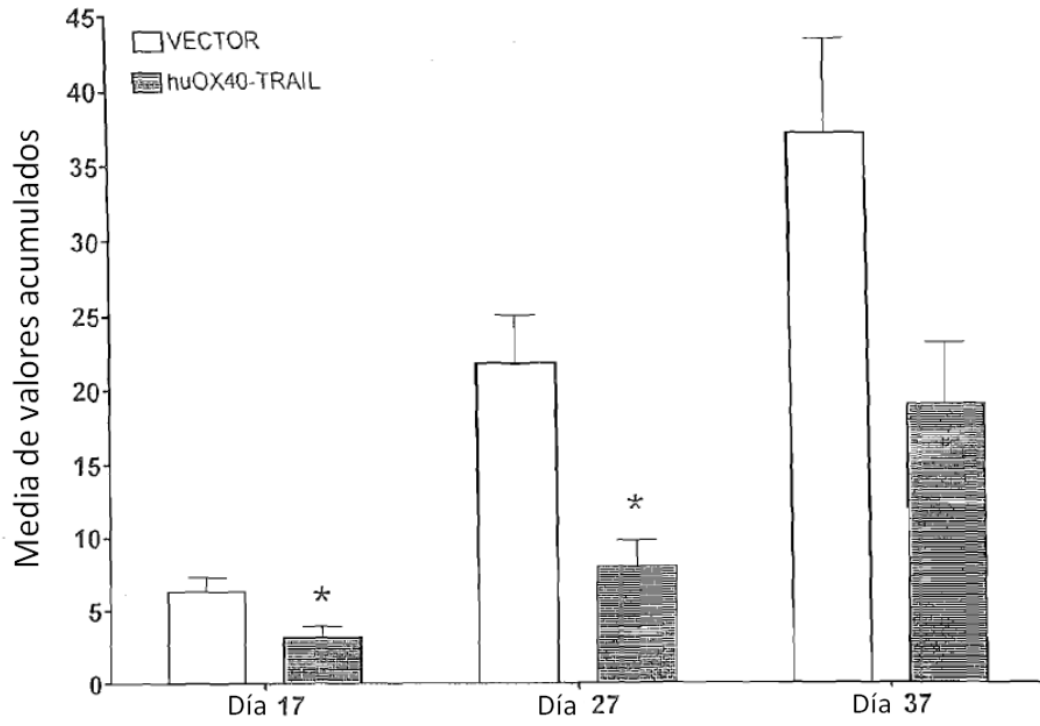


Figura 4D

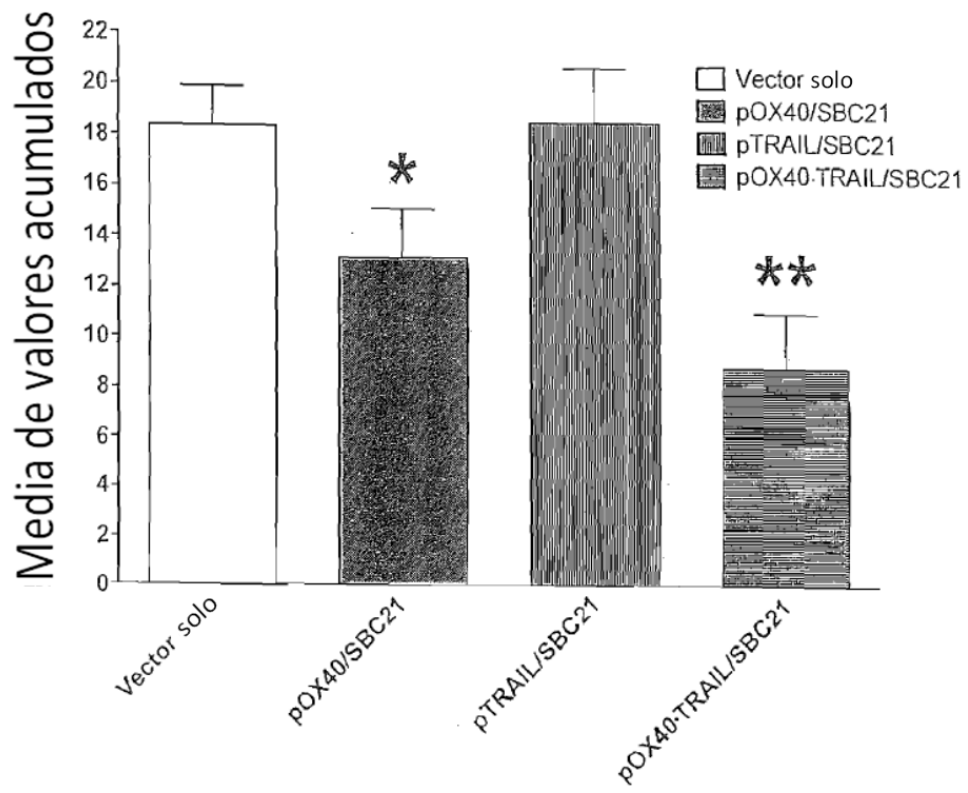


Figura 5A

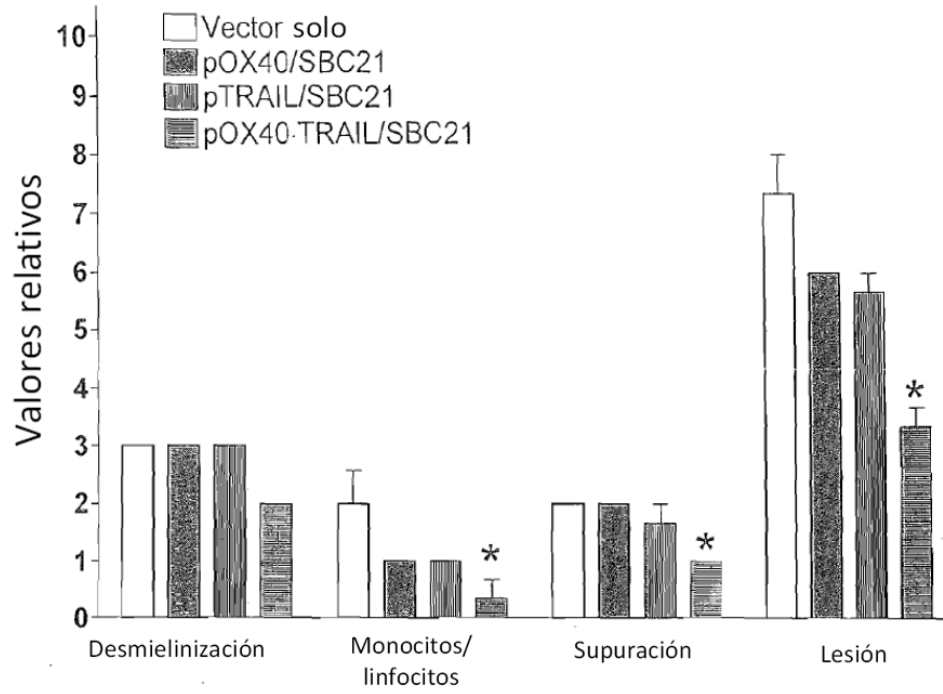


Figura 5B

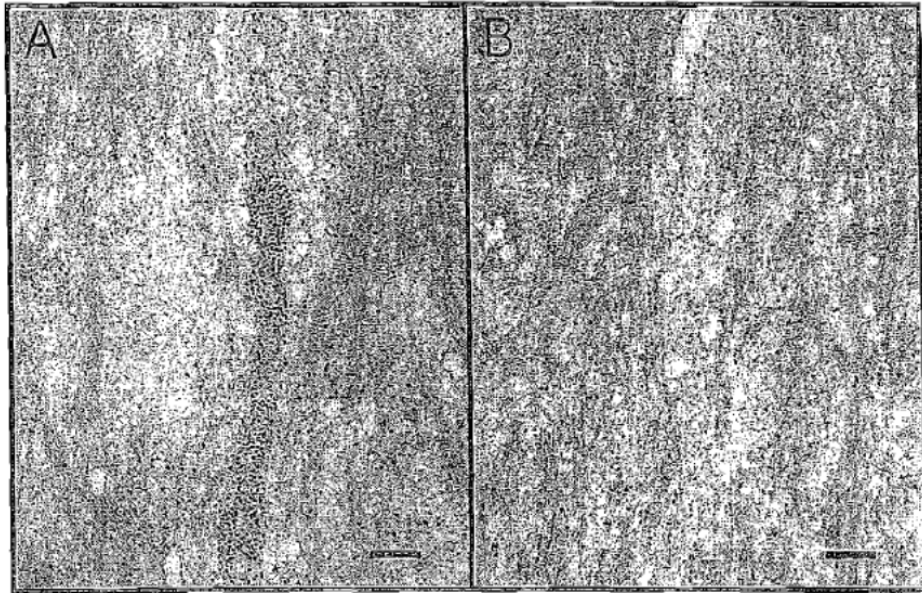


Figura 5C