

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 368**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2015 PCT/US2015/027270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2015 E 15721089 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3134430**

54 Título: **Proteínas agonistas del receptor de TRAIL de cadena sencilla**

30 Prioridad:

23.04.2014 US 201461983152 P

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

14.06.2018

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (50.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US y
APOGENIX AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HILL, OLIVER;
GIEFFERS, CHRISTIAN;
THIEMANN, MEINOLF;
BUCHANAN, FRITZ, G.;
PHILLIPS, DARREN, C. y
LAPPE, SUSAN, E.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 672 368 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 agonistas del receptor de TRAIL de cadena sencilla

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/983152, presentada el 23 de abril de 2014.

Campo de la invención

- 10 La presente invención proporciona proteínas agonistas del receptor de TRAIL específicas que comprenden tres dominios TRAIL solubles y un fragmento Fc, moléculas de ácidos nucleico que codifican las proteínas agonistas de receptor de TRAIL y usos de la mismas. Las proteínas agonistas de receptor de TRAIL son sustancialmente no agregantes y adecuadas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o de investigación.

15 Antecedentes de la invención

Se sabe que la trimerización de citocinas de la superfamilia de TNF (TNFSF) es necesaria para una eficaz unión al receptor y activación. Los complejos triméricos de citocinas de la superfamilia de TNF, sin embargo, son difíciles de preparar a partir de unidades monomérica recombinantes.

- 20 El documento WO 01/49866 y WO 02/09055 divulgan proteínas de fusión recombinantes que comprenden una citocina de TNF y un componente de multimerización, particularmente una proteína de la familia de la proteína C1 q o una colectina. Una desventaja de estas proteínas de fusión es, sin embargo, que el dominio de trimerización habitualmente tiene un gran peso molecular y/o que la trimerización es bastante ineficaz.

- 25 Schneider *et al.* (J Exp Med 187 (1989), 1205-1213) describen que los trímeros de citocinas de TNF se estabilizan por motivos de estabilización ubicados en el extremo N. En CD95L, la estabilización del trímero de dominio de unión al receptor está supuestamente causada por dominios de aminoácidos del extremo N que están ubicados cerca de la membrana citoplasmática.

- 30 Shiraishi *et al.* (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) describen que el dominio de unión a receptor de CD95L puede estabilizarse por motivos superenrollados de hélices- α artificiales (cremallera de leucina) ubicados en el extremo N. Se descubrió, sin embargo, que la orientación de las cadenas polipeptídicas entre sí, por ejemplo, orientación paralela o antiparalela, es muy difícil de predecir. Además, el número óptimo de repeticiones heptaméricas en el motivo de cremallera superenrollado es difícil de determinar. Además, las estructuras superenrolladas tienen la tendencia a formar agregados macromoleculares después de alterar el pH y/o la fuerza iónica.

- 40 El documento WO 01/25277 se refiere a polipéptidos oligoméricos de cadena sencilla que se unen a un dominio de unión a ligando extracelular de un receptor celular, en los que el polipéptido comprende al menos tres sitios de unión a receptor de los que al menos uno es capaz de unirse a un dominio de unión a ligando del receptor celular y al menos uno es incapaz de unirse de forma eficaz a un dominio de unión a ligando del receptor celular, por lo que los polipéptidos oligoméricos de cadena sencilla pueden unirse al receptor, pero no pueden activar el receptor. Por ejemplo, los monómeros se obtienen de ligandos de citocinas de la familia de TNF, particularmente de TNF- α .

- 45 El documento WO 2005/103077 divulga polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden al menos tres monómeros de un miembro del ligando de la familia de TNF y al menos dos conectores peptídicos que unen los monómeros de los miembros de la familia del ligando de TNF a otro. Los experimentos recientes, sin embargo, han demostrado que estos polipéptidos de fusión de cadena sencilla muestran agregación indeseada.

- 50 El documento WO 2010/010051 divulga polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden tres dominios de citocina de la familia de TNF solubles y al menos dos conectores peptídicos. Los polipéptidos de fusión descritos son sustancialmente no agregantes.

- 55 Además, el trabajo previo, incluyendo el de Papadopoulos *et al.* (Cancer Chemother Pharmacol, 2015, DOI 10.1007/s00280-015-2712-0), ha demostrado que la superagrupación del receptor de TRAIL puede provocar toxicidad.

- 60 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de agonistas del receptor de TRAIL novedosos que muestren alta actividad biológica, alta estabilidad, baja toxicidad y permitan una fabricación recombinante eficaz.

Sumario de la invención

- 65 La presente invención proporciona proteínas agonistas del receptor de TRAIL que muestren baja degradación proteolítica, larga semivida y baja superagrupación del receptor de TRAIL *in vivo* (junto con toxicidad concomitante).

Las proteínas agonistas del receptor de TRAIL descritas en este documento generalmente comprenden: (i) un primer dominio de citocina TRAIL soluble; (ii) un primer conector peptídico; (iii) un segundo dominio TRAIL soluble; (iv) un segundo conector peptídico; (v) un tercer dominio TRAIL soluble; y (vi) un fragmento Fc de anticuerpo.

5 En este documento se describen polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden: (i) un primer dominio TRAIL soluble, (ii) un primer conector peptídico, (iii) un segundo dominio TRAIL soluble, (iv) un segundo conector peptídico, (v) un tercer dominio TRAIL soluble y (vi) un fragmento Fc de anticuerpo. El fragmento Fc de anticuerpo (vi) puede estar ubicado en el extremo N respecto al primer dominio TRAIL (i) y/o en el extremo C respecto al tercer dominio TRAIL (v). De acuerdo con la presente invención, el fragmento Fc de anticuerpo está ubicado en el extremo C respecto al tercer dominio TRAIL (v). En una realización, el polipéptido es sustancialmente no agregante. El segundo y/o el tercer dominio de TRAIL soluble puede ser un dominio acortado en el extremo N que opcionalmente comprende mutaciones de secuencia de aminoácidos.

15 Al menos uno de los dominios TRAIL solubles, particularmente al menos uno de los dominios TRAIL solubles (iii) y (v), puede ser un dominio TRAIL soluble con una secuencia del extremo N que empieza entre el aminoácido Gln120 y Val122 de TRAIL humano y en el que Arg21 puede estar remplazada por un aminoácido neutro, por ejemplo, Ser o Gly. Al menos uno de los dominios TRAIL solubles, particularmente al menos uno de los dominios TRAIL solubles (iii) y (v), puede ser un dominio TRAIL soluble con una secuencia del extremo N seleccionada de (a) Arg121 - Val122 - Ala123 y (b) (Gly/Ser)121 - Val122 - Ala123. El dominio TRAIL soluble puede finalizar con el aminoácido Gly281 de TRAIL humano y/u opcionalmente comprende una mutación en las posiciones R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 o D269 o en dos o más de dichas posiciones. De acuerdo con la presente invención, el dominio TRAIL soluble (i) consiste en los aminoácidos Gln120 - Gly281 de TRAIL humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y los dominios TRAIL solubles (iii) y (v) consisten en los aminoácidos Arg121 - Gly281 de TRAIL humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

25 El primer y segundo conectores peptídicos (ii) y (iv) pueden tener independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, y u 8 aminoácidos, y preferiblemente son conectores de glicina/serina, que comprenden opcionalmente un resto de asparagina que puede estar glucosilado. De acuerdo con la presente invención, el primer y el segundo conectores peptídicos (ii) y (iv) consisten en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. El polipéptido puede comprender además un dominio peptídico señal del extremo N, por ejemplo, de la SEQ ID NO: 12, que puede comprender un sitio de escisión por proteasa, y/o que además comprende un elemento del extremo C que puede comprender y/o conectar con un dominio de reconocimiento/purificación, por ejemplo, una marca de Estreptomina de acuerdo con la SEQ ID NO: 13.

35 De acuerdo con la presente invención el fragmento Fc de anticuerpo (vi) se fusiona al dominio TRAIL soluble (i) y/o (v) mediante un conector de bisagra de la SEQ ID NO: 11. El fragmento Fc de anticuerpo (vi) puede consistir en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10 o 17. De acuerdo con la presente invención, el fragmento Fc de anticuerpo (vi) consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10. El polipéptido puede comprender las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, 15 o 18.

40 En este documento se describe una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19, 20 o 21.

45 También se describe en este documento una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende un polipéptido que tiene a secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 o 30.

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19. En una realización, los dos polipéptidos se unen covalentemente mediante tres enlaces disulfuro intercatenarios formados entre los restos de cisteína 513, 519 y 522 de cada polipéptido.

55 En una realización, uno o más de los restos de asparagina en las posiciones 168 y 337 del uno o más polipéptidos están en N-glucosilados. En otra realización, los restos de asparagina en las posiciones 168 y 337 del uno o más polipéptidos están ambos N-glucosilados.

60 En otra realización, el uno o más polipéptidos están además modificados de forma postraduccional. En otra realización, la modificación postraduccional comprende la glutamina del extremo N modificada en piroglutamato.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención y uno o más vehículos diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión

que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. En otro aspecto la presente invención proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. En una realización adicional, la célula de la invención es una célula eucariota. En otra realización, la célula de la invención es una célula de mamífero. En otra realización, la célula de la invención es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otras realizaciones, la célula se selecciona del grupo que consiste en células CHO-DBX11, CHO-DG44, CHO-S y CHO-K1. La célula puede seleccionarse del grupo que consiste en células Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK-293, NIH-3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0, CRL7030, HsS78Bst, PER.C6, SP2/0-Agl4 y de hibridoma.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a TRAIL. La proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse en solitario. La proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de un segundo agente. En otra realización, la enfermedad o trastorno asociado a TRAIL se selecciona del grupo que consiste en: tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazos de trasplante. En una realización, los tumores son tumores sólidos. En una realización, los tumores surgen del grupo de cánceres que consisten en sarcoma, cáncer esofágico y cáncer gástrico. En otra realización, los tumores surgen de sarcoma de Ewing o fibrosarcoma. En otra realización, los tumores surgen del grupo de cánceres que consiste en carcinoma broncopulmonar no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario cánceres de cabeza y cuello y cáncer broncopulmonar microcítico (SCLC). En otra realización, los tumores son tumores linfáticos. En una realización, los tumores son tumores hemáticos. En otra realización, los tumores surgen de linfoma no hodgkiniano, leucemia, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de linfocitos B, linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL) o tricoleucemia. En otra realización, los trastornos autoinmunitarios son enfermedades reumatoides, enfermedades artríticas o enfermedades reumatoides y artríticas. En una realización adicional, la enfermedad o trastorno es artritis reumatoide. En otra realización, la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa. En una realización adicional, la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis múltiple.

El segundo agente puede ser un agente quimioterapéutico, radioterapéutico o biológico. El segundo agente puede seleccionarse del grupo que consiste en Duvelisib, Ibrutinib, Navitoclax, y Venetoclax. El segundo agente puede ser un agente apoptótico. El segundo agente apoptótico puede seleccionarse del grupo que consiste en Bortezomib, Azacitidina, Dasatinib y Gefitinib. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en este documento pueden administrarse a un paciente por administración intravenosa o subcutánea. Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden administrarse a un paciente por administración oral, parenteral, intramuscular, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intraceliaca, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intramedular, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

En una realización, la proteína agonista del receptor de TRAIL se administra como un único bolo. En otra realización, la proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse en varias dosis divididas. La proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse a aproximadamente 0,1-100 mg/kg. En una realización, la proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse a una dosis seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 1,25-7,5, 2,5-7,5, 2,5-15, 5-15, 5-7,5, 1-20, 1-50, 7-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 y 10-100 mg/kg. En otras realizaciones, la proteína agonista del receptor de TRAIL está presente en composiciones farmacéuticas a aproximadamente 0,1-100 mg/ml. En una realización, la proteína agonista del receptor de TRAIL está presente en composiciones farmacéuticas a una cantidad seleccionada del grupo que consiste en: aproximadamente 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-20, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 o 10-100 mg/ml. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse a un sujeto. Una cantidad profilácticamente eficaz de la proteína agonista del receptor de TRAIL puede administrarse a un sujeto.

55 Descripción de las figuras

Figura 1 Estructura de dominios de un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende tres dominios TRAIL. Dominios TRAIL solubles I., II., III.

60 Figura 2 Imagen esquemática que representa la estructura general de TRAIL. ■■■ Membrana celular, extremo N localizado dentro de la célula,

1. plegamiento- β antiparalelo del dominio de unión a receptor (RBD),
2. superficie de contacto de RBD y membrana celular,
3. sitio de escisión por proteasa.

65

- Figura 3 Imagen esquemática que representa la estructura del trímero de TRAIL natural. Las estructuras cilíndricas representan RBD. Los extremos N conectan los RBD con la membrana celular.
- 5 Figura 4 Imagen esquemática que representa la estructura de tres dominios solubles que comprenden el dominio de unión a receptor de un TRAIL. Dominios TRAIL solubles I., II., III.
- Figura 5 Trimerización de los dominios solubles que comprende el RBD de TRAIL, caracterizado porque los extremos N y C de los tres dominios solubles forma una superficie.
- 10 Figura 6 Imagen esquemática que representa la estructura del TRAIL de cadena sencilla que comprende todo o una parte de la región de tallo que ilustra la necesidad de conectores más largos para compensar la distancia hasta el extremo N del siguiente dominio soluble.
- Figura 7 Proteína de fusión scFv-TRAIL conocida de la técnica.
- 15 Figura 8 Proteína de fusión Fc-TRAIL conocida de la técnica.
- Figura 9A Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo Fab adicional.
- 20 Figura 9B Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo scFv adicional.
- Figura 10 Dimerización de dos polipéptidos de fusión de scFc fusionados en el extremo N mediante puentes disulfuro.
- 25 Figura 11 Dimerización de dos polipéptidos de fusión de scFc fusionados en el extremo C mediante puentes disulfuro.
- Figura 12 Dimerización de polipéptidos de fusión de cadena sencilla mediante un conector.
- 30 Figura 13 Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo Fab adicional fusionado además a un segundo polipéptido de fusión o a un polipéptido de fusión de scFv.
- Figura 14 Dimerización de dos polipéptidos de fusión de scFab mediante puentes disulfuro.
- 35 Figura 15 Polipéptidos de fusión de scFc fusionados en el extremo N que comprenden además un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
- Figura 16 Polipéptidos de fusión de scFc fusionados en el extremo C que comprenden además un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
- 40 Figura 17A La proteína agonista del receptor de TRAIL ejemplar que se muestra con el dominio peptídico señal del extremo N se expone en la SEQ ID NO: 14. La proteína madura (que no incluye el dominio peptídico señal del extremo N) se expone en la SEQ ID NO: 19.
- 45 Figura 17B Imagen esquemática que representa la estructura global y la secuencia indicada de una proteína agonista del receptor de TRAIL ejemplar.
- Figura 18 Configuración de ensayo del ELISA para la cuantificación de los agonistas del receptor de TRAIL que contienen un dominio Fc.
- 50 Figura 19 Una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 19 induce muerte celular en líneas de células tumorales humanas *in vitro*. Las células SKM-1, Colo205 o Jurkat se trataron con concentraciones crecientes de la proteína agonista del receptor de TRAIL durante 24 horas y se evaluó la viabilidad celular.
- 55 Figuras 20(A-C) Una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sinergiza con los agentes antioncogénos *in vitro*. Las células SU-DHL-4 se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína agonista del receptor de TRAIL en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de venetoclax (figura 20A) o navitoclax (figura 20B) durante 24 horas. Como alternativa, se trataron células NCI-H596 (figura 20C) con concentraciones crecientes de la proteína agonista del receptor de TRAIL en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas de docetaxel (DTX) durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó y se determinó la sinergia por suma de Bliss.
- 60
- 65

Figura 21 Efecto de la proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de carcinoma colorrectal Colo205.

5 Figura 22 Efecto de la proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de leucemia mieloide aguda SKM-1.

10 Figura 23 Efecto de la proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de carcinoma broncopulmonar no microcítico H460LM.

15 Figuras 24(A-G) Efecto de la proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en modelos PDX. Rombos, tratados con proteína agonista del receptor de TRAIL; cuadrados, no tratados. Los volúmenes de tumor se muestran para (A) CTG-0069, (B) CTG-0167, (C) CTG-0293, (D) CTG-0785, (E) CTG-0714, (F) CTG-0136 y (G) CTG-0485.

20 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se descubrió que la fusión de un dominio de unión a receptor de TRAIL de cadena sencilla a un dominio Fc produce un agonista del receptor de TRAIL hexavalente que proporciona alta actividad biológica combinada con buena estabilidad. Por consiguiente, se proporciona un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende al menos tres dominios TRAIL solubles conectados por dos conectores peptídicos y en el extremo N y/o el extremo C de un fragmento Fc de anticuerpo.

Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena sencilla es no agregante. La expresión "no agregante" se refiere a un contenido de monómero de la preparación de $\geq 50\%$, preferiblemente $\geq 70\%$ y más preferiblemente $\geq 90\%$. La relación de contenido de monómero a contenido de agregado puede determinarse examinando la cantidad de formación de agregado usando cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). La estabilidad respecto a la agregación puede determinarse por SEC después de periodos de tiempo definidos, por ejemplo, de unos pocos a varios días, hasta semanas y meses en diferentes condiciones de almacenamiento, por ejemplo, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la proteína de fusión, para clasificarla como sustancialmente no agregante, se prefiere que el contenido de monómero sea como se define anteriormente después de un periodo de tiempo de varios días, por ejemplo, 10 días, más preferiblemente después de varias semanas, por ejemplo, 2, 3 o 4 semanas, y mucho más preferiblemente después de varios meses, por ejemplo, 2 o 3 meses de almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El polipéptido de fusión de cadena sencilla puede comprender dominios adicionales que pueden estar ubicados en el extremo N y/o el extremo C del mismo. Los ejemplos de dominios de fusión adicionales son, por ejemplo, un dominio peptídico señal del extremo N que puede comprender un sitio de escisión por proteasa o un elemento del extremo C que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación. De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende una marca de Estreptomina en su extremo C que está fusionada mediante un conector. Una marca de Estreptomina ejemplar que incluye un corto conector de serina se muestra en a SEQ ID NO: 13.

La proteína agonista del receptor de TRAIL de la presente invención comprende tres dominios solubles derivados de TRAIL. Preferiblemente, esos dominios solubles se obtienen de un TRAIL de mamífero, particularmente humano que incluye variantes alélicas y/o derivados de los mismos. Los dominios solubles comprenden la parte extracelular de TRAIL, que incluye el dominio de unión a receptor sin dominios localizados en membrana. Como otras proteínas de la superfamilia de TNF, TRAIL se ancla a la membrana mediante una parte del extremo N de 15-30 aminoácidos, la llamada región de tallo. La región de tallo contribuye a la trimerización y proporciona una determinada distancia hasta la membrana celular. Sin embargo, la región de tallo no es parte del dominio de unión a receptor (RBD).

De forma importante el RBD se caracteriza por una ubicación particular de sus aminoácidos del extremo N o C. Dichos aminoácidos están inmediatamente adyacentes y están localizados de forma central al eje del trímero. Los primeros aminoácidos del extremo N del RBD forman una hebra beta antiparalela con los aminoácidos del extremo C del RBD (figuras 2 y 3).

Por tanto, la hebra beta antiparalela del RBD forma una superficie de contacto con la membrana celular, que se conecta a y se ancla dentro de la membrana celular mediante los aminoácidos de la región de tallo. Es muy preferido que los dominios TRAIL solubles de la proteína agonista del receptor de TRAIL comprendan un dominio de unión a receptor del TRAIL que carece de alguno de los aminoácidos de la región de tallo (figuras 4 y 5). Por lo demás, no se requeriría un conector largo que conecte el extremo C de uno de los dominios solubles con el extremo N del siguiente dominio soluble para compensar la región de tallo del extremo N del siguiente dominio soluble (figura 6), que podría provocar la inestabilidad y/o la formación de agregados.

Una ventaja adicional de dichos dominios solubles es que los aminoácidos del extremo N y C del RBD no son accesibles para ninguno de los anticuerpos antifármaco. Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena sencilla puede formar una estructura trimérica ordenada que comprende al menos un sitio de unión funcional para el receptor de TRAIL respectivo.

5 La proteína agonista del receptor de TRAIL comprende tres sitios de unión al receptor de TRAIL funcionales, es decir, secuencias de aminoácidos que pueden formar un complejo con un receptor de TRAIL. Por tanto, los dominios solubles pueden unirse al receptor de TRAIL correspondiente. En una realización, al menos uno de los dominios solubles tiene capacidad de activación del receptor, por lo que puede verse afectada la actividad apoptótica y/o proliferativa. En una realización adicional, uno o más de los dominios solubles se seleccionan por no tener capacidad de activación del receptor.

15 El dominio TRAIL soluble puede obtenerse de TRAIL humano como se muestra en la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, los dominios TRAIL solubles se obtienen de TRAIL humano, particularmente partiendo de los aminoácidos 120-122 y comprenden particularmente los aminoácidos 120-281, 121-281 o 122-281 de la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el aminoácido Arg121 de la SEQ ID NO: 1 puede remplazarse por un aminoácido no cargado, por ejemplo, Ser o Gly.

Tabla 1: Secuencia de proteína TRAIL humana

SEQ ID NO	Secuencia
1	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELK QMQDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQV/KWQ LRQLVRKMILRTSEETISTVQEKKQNISPLVRERGPQRVAHI TGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLH LRNGELVIHEKGFYYYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIY KYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKEND RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVG

20 Como se indica anteriormente, los dominios TRAIL solubles pueden comprender las secuencias de tipo silvestre indicadas en la SEQ ID NO: 1. Debe apreciarse, sin embargo, que es posible introducir mutaciones en uno o más de estos dominios solubles, por ejemplo, mutaciones que alteran (por ejemplo, aumentan o disminuyen) las propiedades de los dominios solubles. En una realización, pueden seleccionarse dominios solubles que no puedan unirse al receptor de citocinas correspondiente.

25 El dominio TRAIL soluble (i) puede comprender un mutante de TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo que se una y/o active el receptor 1 de TRAIL (TRAILR1) y/o el receptor 2 de TRAIL (TRAILR2). La unión y/o actividad del mutante puede determinarse, por ejemplo, por los ensayos descritos en van der Sloot *et al.* (PNAS, 2006, 103:8634-8639), Kelley *et al.* (J. Biol. Chem., 2005, 280:2205-2215), o MacFarlane *et al.* (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270).

35 El mutante puede generarse por cualquier técnica y es conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, las técnicas descritas en van der Sloot *et al.* (PNAS, 2006, 103:8634-8639), Kelley *et al.* (J. Biol. Chem., 2005, 280:2205-2215), o MacFarlane *et al.* (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270) y puede comprender cualquier tipo de mutaciones estructurales, por ejemplo, sustitución, eliminación, duplicación y/o inserción de un aminoácido. Una realización preferida es la generación de sustituciones. La sustitución puede afectar al menos a un aminoácido de TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento. En una realización preferida, la sustitución puede afectar al menos a uno de los aminoácidos de TRAIL, por ejemplo, TRAIL humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). Las sustituciones preferidas a este respecto afectan al menos a uno de los siguientes aminoácidos de TRAIL humano de la SEQ ID NO: 1: R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269. Las sustituciones de aminoácido preferidas de TRAIL humano de la SEQ ID NO: 1 son al menos una de las siguientes sustituciones: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R o D269K.

45 La sustitución o sustituciones de aminoácido pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, por ejemplo, TRAIL humano, en o sobre cualquiera de TRAILR1 o de TRAILR2. Como alternativa, la sustitución o sustituciones de aminoácido pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, por ejemplo, TRAIL humano, a o sobre ambos de TRAILR1 y TRAILR2. La unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 pueden verse afectadas positivamente, es decir, unión más fuerte, más selectiva o más específica y/o más activación del receptor. Como alternativa, la unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 puede verse afectada negativamente, es decir, unión más débil, menos

selectiva, o menos específica y/o menos o ninguna activación del receptor.

Los ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o activación tanto de TRAILR1 como de TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la tabla 1 de MacFarlane *et al.* (véase anteriormente) y pueden comprender un mutante de TRAIL humano con las dos siguientes sustituciones de aminoácido de la SEQ ID NO: 1 Y213W y S215D o con la siguiente sustitución de un único aminoácido: Y189A.

Los ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o activación de TRAILR1 pueden encontrarse, por ejemplo, en la tabla 1 de MacFarlane *et al.* (véase anteriormente) y pueden comprender un mutante de TRAIL humano con las cuatro siguientes sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 N 199V, K201R, Y213W y S215D o con las cinco siguientes sustituciones de aminoácido: Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D, o pueden encontrarse en la tabla 2 de Kelley *et al.* (véase anteriormente) y pueden comprender un mutante de TRAIL humano con la seis siguientes sustituciones de aminoácido: Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V y K201R, o con Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R y K201R.

Los ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o activación de TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la tabla 1 de MacFarlane *et al.* (véase anteriormente) o en la tabla 2 de Kelley *et al.* (véase anteriormente) y pueden comprender un mutante de TRAIL humano con las seis siguientes sustituciones de aminoácido de la SEQ ID NO: 1: Y189Q, R191 K, Q193R, H264R, I266L y D267Q, o pueden encontrarse en la tabla 2 de van der Sloot *et al.* (véase anteriormente) y pueden comprender un mutante de TRAIL humano con la siguiente sustitución de un único aminoácido: D269H, o con las dos siguientes sustituciones de aminoácidos: D269H y E195R o D269H y T214R.

Por tanto, una realización preferida es una proteína agonista del receptor de TRAIL como se escribe en este documento, en la que al menos uno de los dominios solubles comprende un mutante de TRAIL o de un dominio de unión a receptor del mismo que se une y/o activa TRAILR1 y/o TRAILR2.

Ejemplos adicionales de mutantes de TRAIL, que muestran agregación del receptor inducida por TRAIL reducida son H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q) y H177 (S, T).

Una realización preferida de una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende un mutante de TRAIL o de un dominio de unión a receptor como se describe en este documento es una proteína agonista del receptor de TRAIL en la que el componente (i) comprende al menos una sustitución de aminoácido, particularmente como se indica a continuación.

Dicha sustitución de aminoácido afecta al menos a una de las siguientes posiciones de aminoácido de TRAIL humano (SEQ ID NO: 1): R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269.

Dicha sustitución de aminoácido es al menos una de las siguientes: R130E, G160M, H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q), H177 (S, T, Q), Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R o D269K.

Un dominio selectivo de TRAILR2 preferido comprende las sustituciones de aminoácido Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L y D267Q.

Un dominio selectivo de TRAILR1 preferido comprende las sustituciones de aminoácido Y189A, Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D.

La molécula de fusión de cadena sencilla de la presente invención comprende tres dominios TRAIL solubles, concretamente los componentes (i), (iii) y (v). La estabilidad de un polipéptido de fusión de TRAIL de cadena sencilla contra la agregación está potenciada si el segundo y/o el tercer dominio TRAIL soluble es un dominio acortado en el extremo N que comprende opcionalmente mutaciones de la secuencia de aminoácidos. Por tanto, preferiblemente, tanto el segundo como el tercer dominio TRAIL soluble son dominios acortados en el extremo N que opcionalmente comprenden mutaciones de la secuencia de aminoácidos en las regiones del extremo N, preferiblemente en los cinco primeros aminoácidos del extremo N del dominio TRAIL soluble. Estas mutaciones pueden comprender el remplazo de aminoácidos cargados, por ejemplo, ácidos o básicos, por aminoácidos neutros, particularmente serina o glicina.

En contraste con esto, la selección del primer dominio TRAIL soluble no es crítica. En esta ocasión puede usarse un dominio soluble que tenga una secuencia del extremo N de longitud completa. Debe apreciarse, sin embargo, que también el primer dominio TRAIL soluble puede tener una secuencia acortada en el extremo N y opcionalmente mutada.

En la presente invención, los dominios TRAIL solubles (i), (iii) y (v) son dominios TRAIL humanos solubles. El primer dominio TRAIL soluble (i) puede seleccionarse de secuencias naturales, acortadas y/o mutadas. Por tanto, el primer

dominio TRAIL soluble (i) tiene una secuencia del extremo N que puede empezar entre el aminoácido Glu116 y Val122 de TRAIL humano, y en la que Arg121 puede estar emplazada por un aminoácido neutro, por ejemplo, por Ser o Gly. El segundo y tercer dominios TRAIL solubles (iii) y (v) tienen una secuencia del extremo N acortada que empieza preferiblemente entre el aminoácido Gln120 y Val122 de TRAIL humano y en la que Arg121 puede estar
5 remplazada por otro aminoácido, por ejemplo, Ser o Gly.

Preferiblemente, la secuencia del extremo N de los dominios TRAIL solubles (iii) y (v) se selecciona de:

- 10 (a) Arg121 - Val122 - Ala123 y
(b) (Gly/Ser) 121.

El dominio TRAIL soluble preferiblemente acaba con el aminoácido Gly281 de TRAIL humano. En determinadas realizaciones, el dominio TRAIL puede comprender mutaciones internas como se describe anteriormente.

15 Los componentes (ii) y (vi) de la proteína agonista del receptor de TRAIL son elementos conectores peptídicos localizados entre los componentes (i) (iii) o (iii) y (v), respectivamente. Los elementos conectores flexibles tienen una longitud de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos. Los elementos
20 conectores son preferiblemente conectores de glicina/serina, es decir, conectores peptídicos que consisten sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. En casos en que el dominio de citocina soluble termina con S o G (extremo C), por ejemplo, TRAIL humano, el conector empieza después de S o G. En casos en que el dominio de citocina soluble empieza con S o G (extremo N), el conector acaba antes de esta S o G.

25 Debe apreciarse que el conector (ii) y el conector (iv) no tienen que ser de la misma longitud. Para disminuir la inmunogenicidad potencial, puede preferirse el uso de conectores más cortos. Además, resulta que los conectores más cortos dan lugar a moléculas de cadena sencilla con tendencia reducida a formar agregados. Mientras los conectores que son sustancialmente más largos que los divulgados en esta ocasión pueden mostrar propiedades de agregación desfavorables.

30 Si se desea, el conector puede comprender un resto de asparagina que puede formar un sitio de glucosilato Asn-Xaa-Ser. En determinadas realizaciones, uno de los conectores, por ejemplo, el conector (ii) o el conector (iv) comprende un sitio de glucosilación. En otras realizaciones, ambos conectores (iv) comprenden sitios de glucosilación. Para aumentar la solubilidad de las proteínas TRAIL sc y/o para reducir la inmunogenicidad potencial, puede preferirse que el conector (ii) o el conector (iv) o ambos comprendan un sitio de glucosilación.

35 Las secuencias conectoras preferidas se seleccionan de GSGSGSGS (SEQ ID NO: 3), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 2), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 4), GGSGSG (SEQ ID NO: 5), GGSG (SEQ ID NO: 6), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 7), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 8), GGNGSG (SEQ ID NO: 9) y GSGS (SEQ ID NO: 23).

40 De acuerdo con una realización mucho más preferida, las secuencias conectoras son cada una GSGSGNGS de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. Las secuencias conectoras ejemplares se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Secuencias conectoras ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
2	GSGSGNGS
3	GSGSGSGS
4	GGSGSGSG
5	GGSGSG
6	GGSG
7	GGSGNGSG
8	GGNGSGSG
9	GGNGSG
22	GSGSGS
23	GSGS
24	GSG

45 La proteína agonista del receptor de TRAIL comprende además un dominio del fragmento Fc de anticuerpo que puede estar localizado en el extremo N al primer dominio TRAIL (i) y/o en el extremo C al tercer dominio TRAIL (v). Preferiblemente, el dominio del fragmento Fc de anticuerpo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10. Como alternativa, el dominio del fragmento Fc comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 17. Los dominios del fragmento Fc ejemplares se
50 muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Dominios del fragmento Fc ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
10	PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
17	PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

5 El número total de glucositos y la posición individual de los carbohidratos en tres dimensiones afecta a la estabilidad *in vivo* de las proteínas agonistas del receptor de TRAIL. Además, el reconocimiento de carbohidratos depende de la densidad local de los sacáridos terminales, la ramificación del árbol de carbohidrato e importa la posición relativa de los carbohidratos.

10 La reducción de los carbohidratos en el dominio CH2 es necesaria para evitar el entrecruzamiento basado en Fc-receptor *in vivo* y la potencial toxicidad basada en la superagrupación de TRAIL-receptor potencial. Además, los carbohidratos parcialmente degradados reducen la semivida *in vivo* de las proteínas agonistas del receptor de TRAIL mediante mecanismos dirigidos por lectina. Reduciendo el número total de sitios de glucosilación en la molécula, el compuesto resultante es menos accesible a estos mecanismos, aumentando la semivida. Por consiguiente, el número global de glucositos en las proteínas agonistas del receptor de TRAIL se redujo mediante la reducción de glucositos CH2, produciendo proteínas agonistas del receptor de TRAIL que comprenden mutaciones equivalentes N297S (de acuerdo con el sistema de numeración EU) que crean dominios aglucosil-CH2.

20 Los glucositos CH2 presentes en las áreas superficiales interiores normalmente protegen al subdominio de las proteasas durante "tránsitos de conformación Fc abierta", en la que los enlaces disulfuro de bisagra-intercatenarios se reducen y se altera la unión intercatenaria covalente. Esto posibilita la disociación de CH2 y la exposición del área superficial interior hacia las proteasas. Las proteínas agonistas del receptor de TRAIL que comprenden una mutación equivalente N297S (de acuerdo con el sistema de numeración EU) que crea un aglucosil-CH2 tienen probabilidad, por lo tanto, de ser menos proteolíticamente estables que las estructuras equivalentes con la glucosilación de CH2 de tipo silvestre. Esto impactaría a la estabilidad del compuesto durante USP/DSP/almacenamiento, donde hay proteasas de la célula hospedadora presentes y tienen acceso a largo plazo a la estructura. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el agonista del receptor de TRAIL carece de glucositos CH2, pero comprende glucositos en las secuencias conectoras de cada cadena polipeptídica (por ejemplo, GSGSGNGS de acuerdo con a SEQ ID NO: 2). En determinadas realizaciones ejemplares, el agonista del receptor de TRAIL comprende dos glucositos por cadena polipeptídica, para un total de cuatro glucositos.

30 De acuerdo con la presente invención, el dominio del fragmento Fc de anticuerpo se fusiona mediante un elemento de bisagra-conector. El elemento de bisagra-conector tiene una longitud de 10-30 aminoácidos, particularmente una longitud de 15-25 aminoácidos, por ejemplo, 22 aminoácidos. El elemento de bisagra-conector preferiblemente comprende la secuencia de región bisagra de una inmunoglobulina, en este documento mencionada como "región bisagra de Ig". La expresión "región bisagra de Ig" significa cualquier polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos que comparte la identidad o similitud de secuencia con una parte de una secuencia de región bisagra de Ig de origen natural que incluye los restos de cisteína en que los enlaces disulfuro unen las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

40 Pueden obtenerse derivados y análogos de la región bisagra por mutaciones. Un derivado o análogo como se menciona en este documento es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte identidad o similitud de secuencia con la secuencia de longitud completa del tipo silvestre (o proteína de origen

natural) excepto en que tiene una o más diferencias de secuencia de aminoácidos atribuible a una eliminación, inserción y/o sustitución. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, la expresión "bisagra-conector" no se limita a aquellos conectores que comprendan una región bisagra de Ig o un derivado de la misma, sino cualquier conector suficientemente largo para permitir que los dominios adheridos por el elemento de bisagra-conector obtengan una conformación biológicamente activa.

El número de moléculas con conformación Fc abierta en una proteína agonista del receptor de TRAIL individual depende del número de enlaces disulfuro intercatenarios presentes en la región bisagra. Por consiguiente, en una realización, se introdujo una tercera cisteína en la región bisagra de las proteínas agonistas del receptor de TRAIL de la presente invención para mejorar el efecto de la reducción de los glucositos CH2.

Además, las proteínas agonistas del receptor de TRAIL de la invención comprenden adicionalmente una mutación de la lisina de la bisagra superior en una glicina para reducir el procesamiento proteolítico en este sitio.

Un elemento de bisagra-conector particularmente preferido comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11 (tabla 4).

La proteína agonista del receptor de TRAIL puede comprender además un dominio peptídico señal del extremo N, que permite el procesamiento, por ejemplo, la secreción extracelular, en una célula hospedadora adecuada. Preferiblemente, el dominio peptídico señal del extremo N comprende un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por peptidasa señal y, por tanto, puede eliminarse después o durante la expresión para obtener la proteína madura. Un dominio peptídico señal de extremo N particularmente preferido comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12 (tabla 4).

Además, la proteína agonista del receptor de TRAIL puede comprender adicionalmente un elemento del extremo C, que tiene una longitud de, por ejemplo, 1-50, preferiblemente 10-30 aminoácidos que puede incluir o conectar con un dominio de reconocimiento/purificación, por ejemplo, un dominio FLAG, una marca de Estreptomicina o dominio de marca de Estreptomicina II y/o un dominio de poli-His. De acuerdo con una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende una marca de Estreptomicina fusionada al extremo C mediante un corto conector de serina como se muestra en la SEQ ID NO: 13 (tabla 4).

Un elemento de bisagra-conector ejemplar, el dominio peptídico señal de extremo N, y el corto conector de serina se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Dominios y conectores ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
11	GPGSSSSSSSGCDKTHTCPPC
12	METDTLLVFLVLLVWVPAGNG
13	SSSSSSAWSHPPQFEK
25	GPGSSSSSSSGCDKTHTCPPC

De acuerdo con la presente invención, el polipéptido de fusión comprende tres dominios TRAIL soluble fusionados por elementos conectores peptídicos de la SEQ ID NO: 2. El primer dominio TRAIL soluble (i) consiste en los aminoácidos 120-281 de TRAIL humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y los dominios TRAIL solubles (iii) y (v) consisten en los aminoácidos 121-281 de TRAIL humano de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Además, el polipéptido de fusión comprende un dominio de fragmento Fc de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 que fusionado en el extremo C al dominio TRAIL soluble (v) mediante una bisagra-conector de acuerdo con la SEQ ID NO: 11. Los autores de la invención descubrieron sorprendentemente que este polipéptido de fusión particular proporciona actividad biológica mejorada y es particularmente estable. La secuencia de aminoácidos de la proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención se expone en la SEQ ID NO: 19.

Además, el polipéptido de fusión puede comprender un dominio peptídico señal del extremo N, por ejemplo, de acuerdo con la SEQ ID NO: 12. Un ejemplo específico de una proteína agonista del receptor de TRAIL descrita en este documento se muestra en la SEQ ID NO: 14.

El polipéptido de fusión puede comprender además una marca de Estreptomicina en el extremo C que se fusiona al polipéptido de la invención mediante un corto conector de serina como se muestra en la SEQ ID NO: 13. En esta disposición, el fragmento Fc preferiblemente consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10 o 17. Además el fragmento Fc puede consistir en un fragmento Fc más corto, por ejemplo, que incluye os aminoácidos 1-217 de la SEQ ID NO: 10. Los ejemplos particularmente preferidos de polipéptidos de fusión que comprenden una marca de Estreptomicina del extremo C se muestran en las SEQ ID NO: 15 y 18.

Las proteínas agonistas del receptor de TRAIL ejemplares que se muestran en las SEQ ID NO: 14, 15 y 18 comprenden cada una un dominio peptídico señal del extremo N. El dominio peptídico señal incluye los aminoácidos 1-20. En cada caso, la proteína madura empieza con el aminoácido 21. Las proteínas agonistas del receptor de

TRAIL ejemplares maduras descritas en este documento se exponen en la SEQ ID NO: 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29 y 30. Las proteínas agonistas del receptor de TRAIL ejemplares descritas anteriormente se muestran en la tabla 5.

5 El agonista del receptor de TRAIL que se expone en la SEQ ID NO: 19 tiene un número total reducido de sitios de glucosilación (la mutación N297S en la región CH2 que proporciona un dominio CH2 aglucosilado), un número aumentado de enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra y la mutación de una lisina de la bisagra superior en una glicina. Estas alteraciones proporcionan una disminución en la degradación potencial y el superagrupamiento del receptor de TRAIL (junto con toxicidad concomitante) aumentando al mismo tiempo la semivida de la molécula. En algunas realizaciones, la glutamina del extremo N está modificada en piroglutamato (Liu
10 *et al.* 2011, J. Biol. Chem. 286:11211-11217).

Tabla 5: Proteínas agonistas del receptor de TRAIL ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
14	METDTLLVFVLLWVWPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK ALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRF QEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYG LYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGS GNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH SFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRI
15	FVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRS NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEK GFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKS ARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK METDTLLVFVLLWVWPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK ALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRF QEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYG LYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGS GNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH SFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRI FVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRS NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEK GFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKS ARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWHPQFEK

ES 2 672 368 T3

SEQ ID NO	Secuencia
18	<p>METDTLLVFLVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK ALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRF QEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGS GNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH SFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRI FVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRS</p>
19	<p>NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEK GFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSAR NSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEAS FFGAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLS NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTL SSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFG AFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS WESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENT KNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGG IFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K</p>

ES 2 672 368 T3

SEQ ID NO	Secuencia
20	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSL NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTL SSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFG AFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS WESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENT KNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGG
21	IFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG SSSSSSAWSHPQFEK QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSL NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTL SSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFG AFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS WESSRSGHSFSLNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENT KNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGG IFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGS CDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	WLNKEYKCKVSNKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSS SSSSAWSHPQFEK

ES 2 672 368 T3

SEQ ID NO	Secuencia
	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLS NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTL SSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFG AFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDK QMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELK ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSS SAWSHPQFEK
28	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLS NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSS PNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIY SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCW SKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL VGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDK QMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELK ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL
29	YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSS SAWSHPQFEK

SEQ ID NO	Secuencia
	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLS NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTL SSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNS CWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFG AFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDK QMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELK ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKT HTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLS NLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVS VTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSS PNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIY SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCW SKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL VGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESS RSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDK QMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELK ENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKT HTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN, por ejemplo, una molécula de ADN bicatenaria o monocatenaria o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína agonista del receptor de TRAIL o un precursor de la misma, por ejemplo, una pro- o preproforma de la proteína agonista del receptor de TRAIL que puede comprender una secuencia señal u otras partes de aminoácidos heterólogas para la secreción o purificación que están preferiblemente ubicadas en el extremo N y/o C de la proteína agonista del receptor de TRAIL. Las partes de aminoácidos heterólogas pueden unirse al primer y/o segundo dominio mediante un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por Factor X3, trombina o proteasa de IgA. Un ejemplo específico de una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento se muestra en la tabla 6 como la SEQ ID NO: 16. Esta molécula de ácido nucleico codifica el polipéptido de fusión de la SEQ ID NO: 14.

Tabla 6: Secuencia de ácido nucleico de proteína agonista del receptor de TRAIL ejemplar

SEQ ID NO	Secuencia
16	gatacgggtaccgccaccatgaaaccgacaccctgctggtgtcgtgctgctgctggtgggtgcc agccggcaatggacagagagtgccgctcatatcaccggcaccggggcagatctaacacc ctgtccagccccaaactccaagaacgagaaggccctgggcccgaagatcaactcctgggagt cctccagatccggccactctttctgtccaacctgcacctgagaaacggcgagctggtcatcca cgagaagggttactactacatctactcccagacctactcaggttcaggaagagatcaaagag aacacaaagaacgacaagcagatggtgagatatactacaagtaacctcctaccccgacc catcctgctgatgaagtccgccggaactcctgctggtccaaggatgctgagtagcgcctgtac agcatctaccagggcgcatctcagctgaaagagaacgaccggatctcgtgtccgtgacc aacgagcacctgatcgacatggaccacgaggccagcttttcggcgctttctcgtggcggtat ccggaagcggaaacggcagtagagtggtgcccacattaccggaaccagggccggtcca acaccctgagcagccctaacagcaaaaatgagaaagctctcgggccaagatcaacagct gggaaatctagcagaagcggccacagctttctgagcaatctgcatctcgggaacggcgaactc gtgattcatgagaaggggtttattatctatagccagacatactttcattccaggaggaaatca aggaaaacacaaaaatgataaacagatggtccagtagattataagataaccagctaccctg atcctatcctcctcatgaagtctgccagaaactctgttgagcaaggacgcccagatgtagctg tactctatctatcaggggggatcttgaactcaaagaaaacgtagcgcctttgtcagcgtcacc aatgagcatctcattgatagatgagatgaagctagtttctcggggcattcctcgtggaggctccg gctctggaacggatctagagtcgcccacacatcacaggaccagaggcagaagcaata ccctgtcctcccaaatagtaaaaacgaaaaggcactcggccgcaaaattaattcctgggag agcagcagatccgggacagtttctgtctaactcctcctgaggaatggggagctggtgattca cgaaaaaggatttactacatttacagctcagacttctgtttcaggaagagattaaggaaaaat accaaaaacgacaagcagatggtccagtagatctataaatacacctcttatctgaccaattct gctcatgaagagtgcccgaacagctgctggtctaaagacgcccgaatacgggctgtattccatt taccaggggggaattttgagctgaaggaaaatgatcggattttgtctctgtcaaaacgaaca cctcatgatagatgacacgaagcctctttcttggcctcctcgtcggaggccctgctcagctg tccagctcctcttctggtcctcgcgacaagaccacacctgtccccctgtcctgcccctgaactg ctgggaggacctcctggttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcccgga cccccgaagtgaactcgtggtggtggtggtggtgctcagaggacctgaagtagaattcaattg gtacgtggacggcgtggaagtgcacaacccaagaccaagcccagagaggaacagtagtct ctccacctaccgggtggtgtgtgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaaaga gtacaagtcaaggttccaacaaggccctgctgccccatcgaaaagaccatctccaagg ccaagggccagccccgggaaccccaggtgtacacactgccccctagccgggaagagatga ccaagaaccaggtgtccctgacctgctggtcaagggctttaccctcagacattgccgtgga atgggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtgctggactcc gacggctcattctcctgtactccaagctgacagtggaacaagtccgggtggcagcagggcaac gtgttctcctgctcctgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagctccctgctcct gagccccggcaaatgatagaagctgatac

La molécula de ácido nucleico puede estar unida de forma funcional a una secuencia de control de la expresión, por ejemplo, una secuencia de control de la expresión que permita la expresión de la molécula de ácido nucleico en una

célula hospedadora deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar ubicada en un vector, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago, un vector vírico, un vector de integración cromosómica, etc. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión y vectores adecuados se describen, por ejemplo, por Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, y Ausubel *et al.* (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons o ediciones más recientes de los mismos. Pueden usarse diversos sistemas de vector de expresión/célula hospedadora para expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas agonistas del receptor de TRAIL de la presente invención. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, aunque sin limitación, células procariotas tales como bacterias, por ejemplo, *E. coli*, células hospedadoras eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células vegetales o células animales, preferiblemente células de mamífero y, más preferiblemente células humanas. Se describe además un organismo no humano transformado o transfectado por una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente. Dichos organismos transgénicos pueden generarse por métodos conocidos de transferencia genética incluyendo recombinación homóloga.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende, como agente activo, al menos una proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención, un ácido nucleico respectivo que codifica la misma, o una célula transformada o transfectada de la presente invención.

La expresión "enfermedad o trastorno asociado a TRAIL" como se usa en este documento es cualquier enfermedad o trastorno que pueda mejorarse por la adición de un agonista del receptor de TRAIL. Al menos una proteína agonista del receptor de TRAIL, el ácido nucleico respectivo que codifica la misma o la célula transformada o transfectada, todos como se describen en este documento, pueden usarse en tratamiento, por ejemplo, en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de TRAIL, particularmente trastornos proliferativos, tales como tumores, por ejemplo, tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades metabólicas; trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, enfermedades reumatoides y/o artríticas; enfermedades degenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a apoptosis o rechazos de trasplantes.

La expresión "disfunción de TRAIL" como se usa en este documento tiene que entenderse como cualquier función o expresión de TRAIL que se desvíe de la función o expresión normal de TRAIL, por ejemplo, sobreexpresión del gen o la proteína TRAIL, expresión reducida o anulada del gen o proteína TRAIL en comparación con el nivel de expresión fisiológica normal de TRAIL, actividad aumentada de TRAIL, actividad reducida o anulada de TRAIL, unión aumentada de TRAIL a cualquier compañero de unión, por ejemplo, a un receptor, particularmente un receptor de TRAIL u otra molécula de citocina, unión reducida o anulada a cualquier compañero de unión, por ejemplo, a un receptor, particularmente un receptor de TRAIL u otra molécula de citocina, en comparación con la actividad fisiológica o unión normal de TRAIL.

En este documento se describe un método que se proporciona para diagnosticar y/o tratar a un sujeto humano que padece un trastorno que puede diagnosticarse y/o tratarse abordando receptores de TRAIL, que comprende administrar al sujeto humano una proteína agonista del receptor de TRAIL divulgada en este documento, de modo que el efecto sobre la actividad de la diana, o las dianas, en el sujeto humano sea agonista, se alivie uno o más síntomas y/o se consiga tratamiento. Las proteínas agonistas del receptor de TRAIL proporcionadas en este documento pueden usarse para diagnosticar y/o tratar seres humanos que padecen cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, (por ejemplo, cáncer broncopulmonar microcítico "SCLC" y cáncer broncopulmonar no microcítico "NSCLC"), orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, vías urinarias (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), aparato genital femenino (incluyendo cuello cervicouterino, útero y ovarios, así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), aparato genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo la glándula tiroides, suprarrenal y pituitaria) y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo aquellos que surgen del hueso y los tejidos blandos, así como sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, los nervios, los ojos y las meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas, y meningiomas), tumores que surgen de neoplasias hematopoyéticas, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielocítica aguda (AML), linfoma de linfocitos B, linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), tricoleucemia, linfoma de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos, DLBCL, linfomas foliculares, neoplasias hematopoyéticas, sarcoma de Kaposi, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, mieloma múltiple, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de neoplasia o tumores sólidos.

Una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista del receptor de TRAIL de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable se proporciona por la presente invención. La composición farmacéutica puede comprender al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico, un agente quimioterapéutico; un agente de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de cinasa (incluyendo, aunque sin limitación, un inhibidor de KDR y un inhibidor de TIE-2), un modulador de molécula de coestimulación o un inhibidor de comprobación inmunitaria (incluyendo, aunque sin limitación, anti-B7.1, anti-B7.2, anti-B7.3, anti-B7.4, anti-CD28, anti-B7RP1, CTLA4-Ig, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-ICOS, anti-LAG-3, anti-Tim3, anti-VISTA, anti-HVEM, anti-BTLA, proteína de fusión de LIGHT, anti-CD137, anti-CD137L, anti-OX40, anti-OX40L, anti-CD70, anti-CD27,

anti-GAL9, anti-A2AR, anti-KIR, anti-IDO-1, anti-CD20), un modulador de célula dendrítica/célula presentadora de antígeno (incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpo anti-CD40, anti-CD40 L, anti-DC-SIGN, anti-Dectin-1, anti-CD301, anti-CD303, anti-CD123, anti-CD207, anti-DNGR1, anti-CD205, anti-DCIR, anti-CD206, anti-ILT7), un modulador de receptores de tipo Toll (incluyendo, aunque sin limitación, anti-TLR-1, anti-TLR-2, anti-TLR-3, anti-TLR-4, anti-TLR-4, anti-TLR-5, anti-TLR-6, anti-TLR-7, anti-TLR-8, anti-TLR-9), un bloqueador de moléculas de adhesión (incluyendo, aunque sin limitación, un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo antiselectina E/L, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anticitocinas o fragmento funcional del mismo (incluyendo, aunque sin limitación, un anticuerpo anti-IL-18, anti-TNF o anti-IL-6/receptor de citocinas), una citotoxicidad de linfocitos T o linfocitos NK redirigida biespecífica (incluyendo, aunque sin limitación un BiTE®), un tratamiento basado en receptor de células T quimérico (CAR-T), un tratamiento basado en receptor de linfocitos T (TCR), una vacuna terapéutica contra el cáncer, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, un marcador o indicador detectable, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINED), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona del crecimiento, un fármaco de remplazo hormonal, un agente radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación contra el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citocina o un antagonista de citocina.

En un método de tratamiento de un cáncer o en la prevención o inhibición de metástasis desde los tumores descritos en este documento, la proteína o proteínas agonistas del receptor de TRAIL pueden usarse en solitario o en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, radioterapéutico o biológico. En algunas realizaciones, el agente puede incluir los siguientes: Ácido 13-cis-Retinoico; 2-CdA; 2-Clorodesoxiadenosina; 5-Azacidina; 5-Fluorouracilo; 5-FU; 6-Mercaptopurina; 6-MP; 6-TG; 6-Tioguanina; Abraxano; Accutane®; Actinomicina-D; Adriamycin®; Adrucil®; Afinitor®; Agrylin®; Ala-Cort®; Aldesleucina; Alemtuzumab; ALIMTA; Alitretinoína; Alkaban-AQ®; Alkeran®; Ácido todo-transretinoico; Interferón alfa; Altretamina; Ametopterina; Amifostina; Aminoglutetimida; Anagrelida; Anandron®; Anastrozol; Arabinosilcitosina; Ara-C Aranesp®; Aredia®; Arimidex®; Aromasin®; Arranon®; Trióxido arsénico; Arzerra™; Asparaginasa; ATRA; Avastin®; Azacitidina; BCG; BCNU; Bendamustina; Bevacizumab; Bexaroteno; BEXXAR®; Bicalutamida; BiCNU; Blenoxane®; Bleomicina; Bortezomib; Busulfano; Busulfex®; C225; Leucovorina de Calcio; Campath®; Camptosar®; Camptotecina-11; Capecitabina Carac™; Carboplatino; Carmustina; Carmustina Obleas; Casodex®; CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine®; Cetuximab; Clorambucilo; Cisplatino; Ácido Fólnico; Cladribina; Cortisona; Cosmegen®; CPT-11; Ciclofosfamida; Cytadren®; Citarabina; Citarabina Liposómica; Cytosar-U®; Cytoxan®; Dacarbacina; Dacogen; Dactinomicina; Darbepoetina Alfa; Dasatinib; Daunomicina; Daunorrubicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Daunorrubicina Liposómica; DaunoXome®; Decadron; Decitabina; Delta-Cortef®; Deltasone®; Denileucina; Diffitox; DepoCyt™; Dexametasona; Acetato de Dexametasona; Fosfato de Sodio de Dexametasona; Dexasona; Dexrazoxano; DHAD; DIC; Diodes; Docetaxel; Doxil®; Doxorubicina; Doxorubicina Liposómica; Droxia™; DTIC; DTIC-Dome®; Duralone®; Duvelisib; Efudex®; Eligard™; Ellence™; Eloxatin™; Elspar®; Emcyt®; Epirubicina; Epoetina Alfa; Erbitux; Erlotinib; L-asparaginasa de Erwinia; Estramustina; Ethyl Etopophos®; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Eulexin®; Everólimus; Evista®; Exemestano; Fareston®; Faslodex®; Femara®; Filgrastim; Floxuridina; Fludara®; Fludarabina; Fluoroplex®; Fluorouracilo; Fluorouracilo (crema); Fluoximesterona; Flutamida; Ácido Fólnico; FUDR®; Fulvestrant; Gefitinib; Gemcitabina; Gemtuzumab ozogamicina; Gemzar; Gleevec™; Gliadel® Obleas; GM-CSF; Goserelina; Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF); Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos Granulocitos (G-MCSF); Halotestin®; Herceptin®; Hexadrol; Hexalen®; Hexametilmelamina; HMM; Hycamtin®; Hydrea®; Hidrocort Acetate®; Hidrocortisona; Fosfato de Sodio de Hidrocortisona; Succinato de Sodio de Hidrocortisona; Fosfato de Hidrocortona; Hidroxiurea; Ibrutinib; Ibritumomab; Ibritumomab Tiuxetano; Idamycin®; Idarrubicina Ifex®; Interferón-alfa; Interferón-alfa-2b (conjugado con PEG); Ifosfamida; Interleucina-11 (IL-11); Interleucina-2 (IL-2); Mesilato de Imatinib; Carboxamida de Imidazol; Intron A®; Ipilimumab; Iressa®; Irinotecán; Isotretinoína; Ixabepilona; Ixempra™; KADCYCLA®; Kidrolase (t) Lanacort®; Lapatinib; L-asparaginasa; LCR; Lenalidomida; Letrozol; Leucovorina; Leucerano; Leukine™; Leuprolida; Leurocristina; Leustatin™; Lirilumab; Ara-C-Liposómico; Líquido Pred®; Lomustina; L-PAM; L-Sarcolisina; Lupron®; Lupron Depot®; Matulane®; Maxidex; Mecloretamina; Clorhidrato de Mecloretamina; Medralone®; Medrol®; Megace®; Megestrol; Acetato de Megestrol; inhibidores de MEK; Melfalán; Mercaptopurina; Mesna; Mesnex™; Metotrexato; Metotrexato de Sodio; Metilprednisolona; Meticorten®; Mitomicina; Mitomicina-C; Mitoxantrona M-Prednisol®; MTC; MTX; Mustargen®; Mustina; Mutamycin®; Myleran®; Mylocel™; Mylotarg®; Navitoclax; Navelbine®; Nelarabina; Neosar®; Neulasta™; Neumega®; Neupogen®; Nexavar®; Nilandron®; Nilotinib; Nilutamida; Nipent®; Mostaza de Nitrógeno Novaldex®; Nivolumab; Novantrone®; Nplate; Octreotida; Acetato de Octreotida; Ofatumumab; Oncospar®; Oncovin®; Ontak®; Onxal™; Oprelvecina; Orapred®; Orasone®; Oxaliplatino; Paclitaxel; Paclitaxel unido a Proteína; Pamidronato; Panitumumab; Panretin®; Paraplatin®; Pazopanib; PEDIAPRED®; PEG Interferón; Pegaspargasa; Pegfilgrastim; PEG-INTRON™; PEG-L-asparaginasa; PEMETREXED; Pembrolizumab; Pentostatina; Pertuzumab; Mostaza de Fenilalanina; Pidilizumab; Platino®; Platino-AQ®; Prednisolona; Prednisona; Prelone®; Procarbina; PROCIT®; Proleukin®; Prolifeprospán 20 con implante de Carmustina; Purinethol®; inhibidores de BRAF; Raloxifeno; Revlimid®; Rheumatex®; Rituxan®; Rituximab; Roferon-A®; Romiplostim; Rubex®; Clorhidrato de Rubidomicina; Sandostatin®; Sandostatina LAR®; Sargramostim; Solu-Cortef®; Solu-Medrol®; Sorafenib; SPRYCEL™; STI-571; STIVAGRA™; Streptozocina; SU11248; Sunitinib; Sutent®; Tamoxifeno Tarceva®; Targretin®; Tassigna®; Taxol®; Taxotere®; Temodar®; Temozolomida Temozolomida; Temsirlimuz; Tenipósido; TESPAs; Talidomida; Thalomid®; TheraCys®; Tioguanina; Tioguanina Tabloid®;

Tiofosfamida; Thioplex®; Tiotepa; TICE®; Toposar®; Topotecán; Toremifeno; Torisel®; Tositumomab; Trastuzumab; Treanda®; Tremelimumab; Tretinoína; Trexall™; Trisenox®; TSPA; TYKERB®; Urelumab; VCR; Vectibix™; Velban®; Velcade®; Venetoclax; VePesid®; Vesanoïd®; Viadur™; Vidaza®; Vinblastina; Sulfato de Vinblastina; Vincasar Pfs®; Vincristina; Vinorelbina; Tartrato de Vinorelbina; VLB; VM-26; Vorinostat; Votrient; VP-16; Vumon®; 5
 Xeloda®; Zanosar®; Zevalin™; Zinecard®; Zoladex®; Ácido Zoledrónico; Zolinza; o Zometa®, y/o cualquier otro agente no enumerado específicamente en esta ocasión que aborde rutas similares.

10 Cuando tienen que usarse dos o más sustancias o principios como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse mediante la misma vía de administración o mediante diferentes vías de administración, esencialmente al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo, de forma esencialmente simultánea, consecutiva o de acuerdo con un régimen alterno). Cuando las sustancias o principios tienen que administrarse simultáneamente mediante la misma vía de administración, pueden administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, como quedará claro para los expertos en la materia.

15 Además, cuando tienen que usarse dos o más sustancias o principios activos como parte de un régimen de tratamiento combinado cada una de las sustancias o principios puede administrarse en la misma cantidad y de acuerdo con el mismo régimen que el usado cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y dicho uso combinado puede dar lugar o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de las dos o más 20
 sustancias o principios activos da lugar a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más de una o todas las sustancias o principios a administrar, consiguiendo aún al mismo tiempo la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario indeseado que esté asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, obteniendo aún al mismo tiempo el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

25 La eficacia del régimen de tratamiento usado como se describe en este documento puede determinarse y/o hacerse su seguimiento de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad o trastorno implicado, como quedará claro para el médico. El médico también será capaz, cuando sea apropiado y en una base de caso por caso, de cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para conseguir el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o 30
 reducir los efectos secundarios indeseados, y/o para conseguir un equilibrio apropiado entre conseguir el efecto terapéutico deseado por un lado y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios indeseados por el otro lado.

35 En general, se hará un seguimiento del régimen de tratamiento hasta que se consiga el efecto terapéutico deseado y/o durante todo el tiempo que tenga que mantenerse el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarse por el médico.

40 En diversas realizaciones, se proporcionan en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden una o más proteínas agonistas del receptor de TRAIL, en solitario o en combinación con agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. En diversas realizaciones, los ejemplos no limitantes de los usos de las composiciones farmacéuticas divulgadas en este documento incluyen diagnosticar, detectar y/o 45
 controlar un trastorno, prevenir, tratar, mantener y/o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. La formulación de composiciones farmacéuticas, en solitario o en combinación con agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, es conocida para los expertos en la materia (publicación de patente de Estados Unidos n.º 20090311253 A1).

50 En diversas realizaciones, una formulación farmacéutica puede comprender uno o más aminoácidos, uno o más polisacáridos y/o polisorbato y una proteína agonista del receptor de TRAIL presente a una concentración entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/ml, incluyendo los valores límite (por ejemplo, 0,1-10, 1-10, 0,1-50, 1-50, 1-100, 10-100, 25-100, 25-50 o 50-100 mg/ml), donde la formulación está a un pH entre aproximadamente 5,0 y 7,0, 55
 incluyendo los valores límite (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5,0-6,0, 5,5-6,0, 5,0-6,5, 5,5-6,5 o 6,0-7,0). En una realización, al menos un aminoácido en la formulación es histidina y está presente a una concentración de aproximadamente 10-20 mM, 10-15 mM, 15-20 mM o aproximadamente 15 mM. En una realización, al menos un polisacárido en la formulación es sacarosa y está presente a una concentración de aproximadamente un 0-8,0 % en peso/volumen (p/v). En una realización el polisorbato en la formulación es polisorbato 80 y está a una concentración 60
 de aproximadamente un 0-0,06 % p/v. En una realización, al menos un aminoácido en la formulación es arginina y está presente a una concentración de aproximadamente un 0-1,5 % p/v (por ejemplo, 0,5-1,5, 1,0-1,5 o 0,5-1,0 p/v). En una realización, la proteína agonista del receptor de TRAIL está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 0,1-100 mg/ml, (por ejemplo, aproximadamente 1-100 mg/ml, o aproximadamente 1-15 mg/ml, o aproximadamente 1-7,5 mg/ml, o aproximadamente 2,5-7,5 mg/ml, o aproximadamente 5-7,5 mg/ml, o 65
 aproximadamente 25-100 mg/ml, o aproximadamente 20-60 mg/ml, o aproximadamente 25-50 mg/ml, o aproximadamente 25 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 0,1-60 mg/ml, o aproximadamente 0,1-25 mg/ml, o aproximadamente 1,0-60 mg/ml, o aproximadamente 0,5-60 mg/ml, o aproximadamente 0,1-2,0 mg/ml, o aproximadamente 0,5-2,0 mg/ml, o aproximadamente 1-5 mg/ml, o aproximadamente 1-7,5 mg/ml, o aproximadamente 1-15 mg/ml, o aproximadamente 0,5 mg/ml, o aproximadamente 1,0 mg/ml).

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de proteína agonista de

TRAIL que provoca una mejora detectable (por ejemplo, al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % o más desde la medida inicial) en uno o más parámetros asociados con una disfunción de TRAIL o con una enfermedad o trastorno asociado a TRAIL.

5 En diversas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, una formulación liofilizada o una formulación liofilizada y rehidratada. En una realización, la solución de hidratación es dextrosa y/o solución salina (por ejemplo, dextrosa a una concentración de aproximadamente un 5 % p/v y/o la solución salina a una concentración de aproximadamente un 0,9 % p/v). En una realización, la formulación farmacéutica comprende histidina aproximadamente 15 mM, polisorbato 80 aproximadamente un 0,03 % (p/v), sacarosa a aproximadamente 10 un 4 % (p/v) y aproximadamente 0,1-25 mg/ml de la proteína agonista del receptor de TRAIL, o aproximadamente 1-15 mg/ml de proteína agonista del receptor de TRAIL y está a un pH de aproximadamente 6. En una realización, la formulación comprende además al menos un agente adicional.

15 En diversas realizaciones, se usa una formulación que contiene aproximadamente 25 mg/ml de proteína agonista de TRAIL, histidina aproximadamente 15 mM, polisorbato 80 a un 0,03 % (peso/volumen, p/v), sacarosa a un 4 % (p/v) y un pH de aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones, la formulación no comprende arginina. En algunas realizaciones, la formulación muestra estabilidad de congelación-descongelación inesperadamente mejorada, estabilidad de la formulación líquida y/o estabilidad de la formulación liofilizada, en comparación con otras formulaciones que comprenden otros componentes o concentraciones.

20 Los métodos de administración de un agente terapéutico proporcionado en este documento incluyen, aunque sin limitación, administración oral, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, administración a la mucosa (por ejemplo, intranasal y vías orales) y administración pulmonar (por ejemplo, compuestos en aerosol administrados con un inhalador o nebulizador). La formulación de composiciones farmacéuticas para vías específicas de 25 administración, y los materiales y técnicas necesarios para los diversos métodos de administración están disponibles y son conocidos para los expertos en la materia (publicación de Estados Unidos n.º 20090311253 A1).

30 En diversas realizaciones, los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En algunas realizaciones, las composiciones parenterales se formulan en forma monodosis para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma monodosis" se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos 35 mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

40 Un intervalo no limitante ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una proteína agonista del receptor de TRAIL proporcionada en este documento es aproximadamente 0,1-100 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 1,25-7,5, 2,5-7,5, 2,5-15, 5-15, 5-7,5, 1-20, 1-50, 7-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 o 10-100 mg/kg, o cualquier concentración entremedias). En algunas realizaciones, la proteína agonista del receptor de TRAIL está presente en una composición farmacéutica a una concentración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una concentración de aproximadamente 0,1-100 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 45 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-20, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 o 10-100 mg/ml, o cualquier concentración entremedias). Obsérvese que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y/o gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse en el tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y/o los criterios profesionales de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos 50 de dosificación expuestos en este documento son únicamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Ejemplos

55 1. Fabricación de una proteína agonista del receptor de TRAIL (sc TRAIL wt)

1.1 Estructura polipeptídica

A) Aminoácidos Met1 - Gly20

60 Péptido señal de Ig-Kappa, sitio de escisión por peptidasa señal supuesta después del aminoácido Gly20.

B) Aminoácidos Gln21 - Gly182

65 Primer dominio de citocina soluble del ligando TRAIL humano (TRAIL, aminoácidos 120-281 de la SEQ ID NO: 1).

C) Aminoácidos Gly 183 - Ser 190

Primer elemento conector peptídico de la SEQ ID NO: 2.

5 D) Aminoácidos Arg191 - Gly351

Segundo dominio de citocina soluble del ligando TRAIL humano (TRAIL, aminoácidos 121-281 de la SEQ ID NO: 1).

E) Aminoácidos Gly352 - Ser359

10 Segundo elemento conector peptídico de la SEQ ID NO: 2.

F) Aminoácidos Arg360 - Gly520

15 Tercer dominio de citocina soluble del ligando TRAIL humano (TRAIL, aminoácidos 121-281 de la SEQ ID NO: 1).

G) Aminoácidos Gly521 - Cys542

Elemento de bisagra-conector de la SEQ ID NO: 11.

20 H) Aminoácidos Pro543 - Lys760

Dominio de fragmento Fc de anticuerpo de la SEQ ID NO: 10.

25 La proteína agonista del receptor de TRAIL anterior se muestra en la SEQ ID NO: 14.

Los conectores indicados pueden remplazarse por otros conectores preferidos, por ejemplo, como se muestra en las SEQ ID NO: 3-9.

30 Debe apreciarse que el primer y segundo conectores peptídicos no tienen que ser idénticos.

La secuencia peptídica señal (A) pueden remplazarse por cualquier otra secuencia peptídica señal adecuada, por ejemplo, de mamífero.

35 **1.2 Casete génico que codifica al polipéptido**

El gen sintético puede optimizarse en vista de su uso de codones para la expresión en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, células de insecto o células de mamífero. Una secuencia de ácido nucleico preferida se muestra en la SEQ ID NO: 16.

40

2. Expresión y purificación

Clonación, expresión y purificación de polipéptidos de fusión

45 Las proteínas de fusión mencionadas anteriormente se expresaron de forma recombinante en dos células hospedadoras eucariotas diferentes:

Para el análisis inicial de las proteínas de fusión agonistas del receptor de TRAIL mencionadas anteriormente, células Hek293T cultivadas en DMEM + GlutaMAX (GibCo) complementado con FBS al 10 %, 100 unidades/ml de Penicilina y 100 [mu]g/ml de Estreptomicina se transfectaron de forma transitoria con un plásmido que contenía un casete de expresión para un polipéptido de fusión y un marcador de selección apropiado, por ejemplo, un casete de expresión funcional que comprende un gen de resistencia a blasticidina, puromicina o higromicina. En esos casos, cuando se necesita una pluralidad de cadenas polipeptídicas para conseguir un producto final, los casetes de expresión se combinaron en un plásmido o se ubicaron en plásmidos diferentes durante la transfección. Se recogió el sobrenadante de cultivo celular que contenía el polipéptido de fusión recombinante tres días después de la transfección y se aclaró por centrifugación a 300 x g seguido de filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

50

55

Para una expresión a mayor escala de proteína de fusión agonistas del receptor de TRAIL a usar *in vivo*, se insertaron casetes de ADN sintético que codifican las proteínas mencionadas anteriormente en vectores de expresión eucariotas que comprenden marcadores de selección apropiados (por ejemplo, un casete de expresión funcional que comprende un gen de resistencia a blasticidina, puromicina o higromicina) y elementos genéticos adecuados para potenciar el número de sitios de inserción transcripcionalmente activos dentro el genoma de las células hospedadoras. Los vectores de expresión de secuencia verificada se introdujeron por electroporación en células de ovario de hámster chino adaptadas en suspensión (CHO-S, Invitrogen). Se aplicó presión de selección apropiada tres días después de la transfección a las células transfectadas. Las células supervivientes que portan el

60

65

gen o gene de resistencia derivados del vector se recuperaron por cultivo posterior en presión selectiva. Tras el crecimiento estable de las combinaciones de células seleccionadas en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 7% en una estufa de agitación orbital (100 r.p.m., alcance de agitación de 50 mm), los sobrenadantes individuales se analizaron por ensayos ELISA que detectan las proteínas mencionadas anteriormente y las combinaciones de células con la máxima productividad específica se expandieron en matraces de agitación antes de la producción de proteína (agitador orbital, 100 r.p.m., alcance de agitación de 50 mm).

Para la producción de proteína a escala de laboratorio, se cultivaron combinaciones de células individuales durante 7-12 días en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 7% en un biorreactor Wave 20/50 EHT (GE-Healthcare). El medio basal fue PowerCHO2-CD complementado con Glutamax 4 mM. El cultivo Wave se inició con una concentración de células viables de 0,3 a 0,4 x 10⁶ células/ml y los siguientes ajustes (para una bolsa de cinco o diez litros): frecuencia de agitación 18 r.p.m., ángulo de agitación 7°, corriente de gas 0,2-0,3 l/min, CO₂ al 7 %, 36,5 °C. durante la ejecución de Wave, el cultivo celular se alimentó dos veces con PowerFeed A (Lonza), habitualmente en el día 2 (20 % de alimentación) y el día 5 (30 % de alimentación). Después de la segunda alimentación, se aumentó la frecuencia de agitación hasta 22 r.p.m., así como el ángulo de agitación a 8°.

El biorreactor habitualmente se recogió entre el día 7 y el día 12 cuando la viabilidad celular descendió por debajo del 80 %. En primer lugar, el sobrenadante de cultivo se aclaró usando un sistema manual de filtración en profundidad (Millipore Millistak Pod, MC0HC 0,054 m²). Para las proteínas marcadas en Estreptomina, se añadió Avidina a una concentración final de 0,5 mg/l. Finalmente, el sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de fusión agonista del receptor de TRAIL se filtró a esterilidad usando un filtro superior de frasco (0,22 µm, PES, Corning) y se almacenó a 2-8 °C hasta el procesamiento adicional.

Para la purificación por afinidad se compactó Estreptactina Sepharose en una columna (lecho de gel de 1 ml), se equilibró con 15 ml de tampón W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) o PBS pH 7,4 y el sobrenadante de cultivo celular se aplicó a la columna con un caudal de 4 ml/min. Posteriormente, la columna se lavó con 15 ml de tampón W y el polipéptido unido se eluyó por etapas mediante la adición de 7 x 1 ml de tampón E (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Destiobiotina 2,5 mM, pH 8,0). Como alternativa, puede usarse PBS pH 7,4 que contenía Destiobiotina 2,5 mM para esta etapa.

Como alternativa el método basado en Estreptactina Sepharose, la purificación por afinidad se realizó empleando una columna con proteína A inmovilizada como ligando de afinidad y un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare). Se eligió un material en fase sólida con alta afinidad por el dominio FC de la proteína de fusión: MABSelect Sure™ (GE Healthcare). En resumen, el sobrenadante de cultivo celular aclarado se cargó en una columna HiTrap MabSelectSure column (CV=5 ml) equilibrada en tampón de lavado 1 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 7,2) que no excede una carga de 10 mg de proteína de fusión por ml de lecho de columna. La columna se lavó con diez volúmenes de columna (10 CV) del tampón de equilibrado mencionado anteriormente seguido por cuatro volúmenes de columna (4 CV) de tampón de lavado 2 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 8,0) para reducir la proteína de la célula hospedadora y el ADN de la célula hospedadora. La columna entonces se eluyó con tampón de elución (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 3,5) y se recogió el producto eluido en hasta diez fracciones teniendo cada fracción un volumen igual al volumen del lecho de columna (5 ml). Cada fracción se neutralizó con un volumen igual de tampón de lavado 2 mencionado anteriormente. La velocidad lineal se estableció a 150 cm/h y se mantuvo constante durante el método de cromatografía por afinidad mencionado anteriormente.

La cantidad de proteína de las fracciones eluidas se cuantificó y se concentraron las fracciones de los picos por ultrafiltración y se purificaron adicionalmente por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

Se realizó SEC en columna Superdex 200 10/300 GL o HiLoad 26/60 usando un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare). Las columnas se equilibraron con solución salina tamponada con fosfato y el polipéptido purificado por afinidad concentrado se cargó en la columna de SEC sin que el volumen de muestra excediera el 2 % (v/v) del volumen de columna. En el caso de columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), se aplicó un caudal de 0,5 ml por minuto. En el caso de columnas HiLoad 26/60 Superdex 200, se aplicó un caudal de 2,5 ml por minuto. El perfil de elución del polipéptido se controló por absorbancia a 280 nm.

Para la determinación del peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado en condiciones nativas, se cargó una columna Superdex 200 con proteínas patrón de peso molecular conocido. Basándose en el volumen de elución de las proteínas patrón, se representó una curva de calibración y se determinó el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado. Las proteínas de fusión agonistas del receptor de TRAIL que comprenden el dominio FC típicamente eluye de las columnas Superdex 200 con un peso molecular aparente para el homodímero de aproximadamente 160-180 kDa.

3. Ensayo de apoptosis

Se usó un ensayo celular con una línea de linfocitos T permanente Jurkat A3 para determinar la actividad inductora de apoptosis de las proteínas de fusión agonistas del receptor de TRAIL. Las células Jurkat se cultivaron en matraces con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) complementado con FBS al 10 %, 100 unidades/ml de

Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomina. Antes del ensayo, se sembraron 100 000 células por pocilla en una placa de microvaloración de 96 pocillos. La adición de diferentes concentraciones de péptidos de fusión a los pocillos estuvo seguida por una incubación de 3 horas a 37 °C. Las células se lisaron añadiendo tampón de lisis (HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 al 5 %, DTT 100 mM, AEBSF 10 mM, pH 7,5) y las placas se pusieron en hielo durante 30 minutos a 2 horas. La apoptosis se equiparó por una actividad aumentada de caspasas, por ejemplo, Caspasa-3. Por tanto, se usó la escisión del sustrato de caspasa Ac-DEVD-AFC (Biomol) para determinar el grado de apoptosis. De hecho, la actividad Caspasa se correlaciona con el porcentaje de células apoptóticas determinadas morfológicamente después de teñir las células con yoduro de propidio y Hoechst-33342. Para el ensayo de actividad caspasa, se transfirieron 20 µl de lisado celular a una placa de microvaloración de 96 pocillos negra. Después de la adición de 80 µl de tampón que contenía HEPES 50 mM, sacarosa al 1 %, CHAPS al 0,1 %, Ac-DEVD-AFC 50 µM y DTT 25 mM, pH 7,5, la placa se transfirió a un lector de placas de microvaloración Tecan Infinite 500 y se controló el aumento en la intensidad de la fluorescencia (longitud de onda de excitación 400 nm, longitud de onda de emisión 505 nm).

15 3.1 Ensayo de muerte celular

Para la determinación de la muerte celular en células de fibrosarcoma HT1080, se sembraron 15 000 células en placas de 96 pocillos durante una noche en medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) complementado con FBS al 10 % (Biochrom). Las células se coincubaron con cicloheximida (Sigma) a una concentración final de 2,5 g/ml. La muerte celular se cuantificó tiñendo con tampón KV (violeta de genciana al 0,5 %, metanol al 20 %). Después de la tinción, los pocillos se lavaron con agua y se secaron al aire. El tinte se eluyó con metanol y se midió la densidad óptica a 595 nm con un lector de ELISA.

25 4. Ensayo de estabilidad/agregación

25 4.1 Principio del análisis de agregación (Definición para proteína solubles)

El contenido de monómeros (ensamblaje trimérico definido de módulos de unión al receptor de TRAIL) y agregados se determina por SEC analítica como se describe en el ejemplo 2. Para este fin particular, el análisis se realiza en tampones que contienen concentraciones salinas fisiológicas a pH fisiológico (por ejemplo, NaCl al 0,9 %, pH 7,4; PBS pH 7,4). Se hace un análisis de agregación típico en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Esta columna separa las proteínas en el intervalo entre 10 a 800 kDa.

Para la determinación del peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado en condiciones nativas, se carga una columna Superdex 200 con proteínas patrón de peso molecular conocido. Basándose en el volumen de elución de las proteínas patrón, se representa una curva de calibración y se calcula el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado basándose en el volumen de elución.

El análisis de SEC de proteínas solubles no agregadas, por ejemplo, TRAIL trimérico, típicamente muestra un pico de proteína individual distintivo a un volumen de elución definido. Este volumen de elución corresponde al peso molecular nativo aparente de la proteína particular y cumple aproximadamente el peso molecular teórico calculado basándose en la secuencia de aminoácidos primaria.

Si se produce agregación de proteína, el análisis de SEC muestra picos adicionales de proteína con volúmenes de retención inferiores. Para TRAIL, la agregación de la proteína soluble se produce de una manera característica. Las proteínas tienden a formar oligómeros de los "trímeros", que forman nonámeros (3 x 3) y oligómeros de 27 unidades (3 x 9). Estos oligómeros sirven como semillas de agregación y un alto contenido de oligómeros da lugar potencialmente a agregación de la proteína.

Los oligómeros de peso molecular grande y los agregados eluyen en el volumen vacío de la columna Superdex 200 y no pueden analizarse por SEC con respecto a su peso molecular nativo.

Debido a la inducción de agregación (completa), las preparaciones purificadas de proteínas de fusión TRAIL-SF preferiblemente deben contener únicamente proteína triméricas definidas y únicamente una cantidad muy baja de proteína oligomerizada. El grado de agregación/oligomerización de una preparación de proteína TRAIL-SF particular se determina basándose en el análisis de SEC calculando las áreas de pico del diagrama de DO 280 para la fracción trimérica definida y la fracción de oligómero/agregado, respectivamente. Basándose en el área de pico total, se calcula el porcentaje de proteína trimérica definida de la siguiente manera:

$$60 \quad (\% \text{ de contenido de trímero} = [\text{trímero del área de pico}] / \{\text{área de pico total}\} \times 100)$$

La definición para proteína soluble como se usa en este texto describe una preparación de proteína de proteína TRAIL purificada en un tampón de concentraciones salinas fisiológicas a pH fisiológico que contiene un contenido de proteína soluble definido (ensamblaje trimérico de dominios de TRAIL) de > 90 % dentro de un intervalo de concentración de proteína típico de 0,2 a 10,0 mg/ml.

5. Determinación de la semivida

Las moléculas A-D están cada una compuesta de dos polipéptidos unidos covalentemente por enlaces disulfuro intercatenarios. El número de glucositos y cisteínas de bisagra (que producen enlaces disulfuro intercatenarios entre las proteínas) se ensayaron para determinar el efecto que tiene alterar estas características sobre la semivida de estos compuestos.

Se trataron ratones NMRI hembra con 1,2 mg/kg bw y/o con 4 mg/kg bw de los compuestos especificados como una única inyección de bolo intravenoso. Se recogió sangre completa antes de la aplicación (predosis) y hasta 168 horas después de la administración del artículo de ensayo. El suero se preparó y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta la determinación de las concentraciones en suero. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando las concentraciones medias en suero y el programa de evaluación farmacocinética PK Solutions Versión 2.0 para el análisis de datos farmacocinéticos no compartimentados (Summit Research Services, Montrose, CO). PK Solutions es una aplicación basada en Excel automatizada, que calcula los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración-tiempo obtenidos del análisis de, por ejemplo, muestras biológicas después de vía intravenosa o extravascular de administración. PK Solutions calcula los resultados sin suponer ningún modelo compartimentado específico.

La cuantificación de los artículos de ensayo en suero se realizó con un ensayo ELISA que detecta los agonistas del receptor de TRAIL individuales mostrados en la tabla 7 independientemente de que una marca de Estreptomina sea parte de las moléculas. La imagen general se muestra en la figura 18. Los resultados se resumen en la tabla 7.

La molécula A (compuesta de dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 26) tiene dos cisteínas de bisagra (que forman dos enlaces disulfuro intercatenarios) y un resto de N en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice EU), que produce la glucosilación CH2 de tipo silvestre. La molécula A también tiene glucositos en las posiciones 168 y 337. La molécula B (compuesta de dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 19) tiene tres cisteínas de bisagra (que forman tres enlaces disulfuro intercatenarios) (en las posiciones 513, 519 y 522) y una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice EU), que produce una aglucosilación del dominio CH2. La molécula B también tiene glucositos en las posiciones 168 y 337. La molécula C (compuesta de dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 27) tiene tres cisteínas de bisagra (que forman tres enlaces disulfuro intercatenarios) y una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice EU), que produce aglucosilación del dominio CH2. Además, hay un glucosito en la posición 168 (conector 1), pero no en la posición 337 (conector 2). La molécula D (compuesta de 2 polipéptidos de la SEQ ID NO: 28) tiene tres cisteínas de bisagra (que forman tres enlaces disulfuro intercatenarios) y una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice EU), que produce aglucosilación del dominio CH2. Además, los glucositos tanto en el conector 1 como en el conector 2 (posiciones 168 y 337, respectivamente) se han reducido en la molécula D.

La estabilidad *in vivo* (considerada por la semivida del compuesto) de la molécula B (ambos conectores glucosilados, glucositos CH2 reducidos y la adición de una tercera cisteína de bisagra) se potenció en comparación con la molécula A. Además, la reducción de todos los glucositos del compuesto (molécula D) produjo estabilidad *in vivo* reducida y baja productividad durante la expresión transitoria. La molécula C (primer conector glucosilado, segundo conector aglucosilado, glucositos CH2 reducidos) demostró una estabilidad *in vivo* intermedia en comparación con las moléculas B y D (véase los resultados en la tabla 7).

Tabla 7: Resultados de ensayo de semivida del compuesto en ratones NMRI

Molécula	Número de sitios de glucosilación	Número de cisteínas de bisagra	Semivida terminal 4 mg/kg i.v.(hora)	Semivida terminal 1,2 mg/kg i.v.(hora)
A	6	2	23,1	17,7
B	4	3	33,94	28,28
C	2	3	21,03	-
D	0	3	8,81	-

Estos resultados experimentales demuestran que combinar la glucosilación del conector (en ambos conectores 1 y 2) con un tercer enlace disulfuro intercatenario (mediante la adición de una cisteína de bisagra) y la desglucosilación del dominio CH2 en la región Fc produce mayor estabilidad *in vivo* en las moléculas de presente invención.

6. Demostración *in vivo* de la eficacia

6.1 La proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 inhibe la supervivencia de células de tumor hemático y sólido humano *in vitro*

Se sembraron células tumorales a 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en el medio recomendado que contenía FBS al 10 % y se trataron con una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. La viabilidad celular se evaluó posteriormente usando el reactivo CellTiter-Glo® como

se describe por las instrucciones del fabricante (Promega; Madison, WI). Los valores de CI_{50} se determinaron por análisis de regresión no lineal de los datos de respuesta a la concentración normalizados a células de control no tratadas. Los ejemplos de las curvas de respuesta a concentración resultantes para células Colo205, Jurkat y SKM-1 que demuestran una pérdida en la viabilidad celular en respuesta al tratamiento con la proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 se muestran en la figura 19. La tabla 8 muestra los resultados de líneas celulares de tumor hemático (A; (n = 40; linfoma no hodgkiniano, NHL; linfoma mielóide agudo, AML; leucemia linfoblástica aguda, ALL) y sólido (B; (n = 44; carcinoma broncopulmonar no microcítico, NSCLC; cáncer pancreático; colorrectal, CRC; cáncer de mama, BrCa; cáncer de ovario, fibrosarcoma; cáncer de cabeza y cuello, H&N; carcinoma broncopulmonar microcítico, SCLC) tratadas con una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 durante 24 horas y se evaluó la viabilidad por CellTiter-Glo®. Se presentan los CI_{50} resultantes para los efectos mediados por la proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre la viabilidad de células tumorales.

Tabla 8: Potencia de la proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 en líneas celulares cancerosas de tumor humano *in vitro*

Línea celular de tumor	Tipo de tumor	CI_{50} de la SEQ ID NO: 19 (ng/ml)
A		
SU-DHL-8	NHL	1,36
NUDHL-1	NHL	6,50
OCI-Ly8	NHL	7,49
ULA	NHL	8,44
OCI-Ly2	NHL	18,98
OCI-LY19	NHL	26,34
WSU-NHL	NHL	31,60
OCI-Ly7	NHL	63,76
SU-DHL-5	NHL	82,07
OCI-Ly18	NHL	196,20
OCI-Ly1	NHL	416,95
SU-DHL-16	NHL	545,55
SU-DHL-2	NHL	1000,00
WSU-DLCL2	NHL	1000,00
Toledo	NHL	1000,00
OCI-LY3	NHL	1000,00
RL	NHL	1000,00
SU-DHL-4	NHL	1000,00
U2932	NHL	1000,00
HT	NHL	1000,00
RC-K8	NHL	1000,00
SKM-1	AML	0,95
PL-21	AML	10,67
EOL-1	AML	18,31
HL-60	AML	76,62
OCI-AML2	AML	124,32
UKE-1	AML	205,35
MV4-11	AML	312,55
SET-2	AML	384,80
MOLM-13	AML	722,10
OCI-AML5	AML	1032,60
Kasumi-1	AML	1000,00
KG-1	AML	1000,00
OCI-AML3	AML	1000,00
SHI-1	AML	1000,00
SKNO-1	AML	1000,00
TF-1	AML	1000,00
THP-1	AML	1000,00
HEL	AML	1000,00
Jurkat	ALL	3,08
B		
NCI-H847	NSCLC	14,53
NCI-H647	NSCLC	24,75
NCI-H2444	NSCLC	27,75
NCI-H2170	NSCLC	30,16
NCI-H460	NSCLC	36,85
NCI-H838	NSCLC	44,48

Línea celular de tumor	Tipo de tumor	Cl ₅₀ de la SEQ ID NO: 19 (ng/ml)
B		
NCI-H1792	NSCLC	61,09
NCI-H2347	NSCLC	81,06
NCI-H1373	NSCLC	125,15
NCI-H522	NSCLC	259,87
NCI-H2110	NSCLC	314,20
NCI-H596	NSCLC	397,80
HCC4006	NSCLC	407,24
NCI-H2122	NSCLC	480,55
NCI-H1299	NSCLC	716,00
NCI-H1975	NSCLC	741,50
HCC827	NSCLC	2824,50
NCI-H727	NSCLC	3178,00
NCI-H1944	NSCLC	4068,75
NCI-H1299	NSCLC	4214,87
Calu-6	NSCLC	4757,00
NCI-H1693	NSCLC	5000,00
HCC2935	NSCLC	5000,00
A549	NSCLC	5000,00
NCI-H1395	NSCLC	5000,00
NCI-H2172	NSCLC	5000,00
Calu-1	NSCLC	5000,00
NCI-H441	NSCLC	5000,00
NCI-H23	NSCLC	5000,00
NCI-H661	NSCLC	5000,00
NCI-H1650-GFP	NSCLC	>3
BxPC3	Pancreático	16,00
Capan-1	Pancreático	393,00
MIA PaCa-2	Pancreático	158,00
PANC-1	Pancreático	>1000
SW48	CRC	6,10
Colo205	CRC	1,30
SW480	CRC	132,00
HCT 116-GFP	CRC	337,00
HCC38	BrCa	3,00
HCC1569	BrCa	219,00
MCF7	BrCa	>3000
MDA-MB-231	BRCa	235,00
HeyA8-GFP	Ovario	141,00
Fadu-GFP	H&N	>3
HT-1080	Fibrosarcoma	377,00
NCI-H211	SCLC	72,58

6.2 La proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 sinergiza con agentes antioncogénos para inducir muerte de células tumorales

- 5 Las células tumorales se sembraron a 10 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en el medio recomendado que contenía FBS al 10 % y se cotrató con una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 y venetoclax (ABT-199), navitoclax (ABT-263) o docetaxel (DTX) durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. La viabilidad celular se evaluó posteriormente usando el reactivo CellTiter-Glo® como se describe por las instrucciones del fabricante. Se empleó el modelo de independencia de Bliss (Wong *et al.*, 2012; Mol. Cancer Ther. 11:1026-1035; Bernebaum, 1981 Adv. Cancer Res. 35:269-335; Borisy *et al.*, 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7977-7982) para evaluar la actividad de combinación, indicando los enteros negativos antagonismo, indicando un valor cero, actividad aditiva e indicando los enteros positivos sinergia. Los valores de Bliss se calcularon para cada combinación en la matriz de dosis y se totalizaron para dar un valor de "suma de Bliss". Un ejemplo de muerte de célula tumoral sinérgica inducida por cotratamiento de células de tumor humano con una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 y venetoclax, navitoclax o DTX, con la suma de Bliss asociada se muestra en las figuras 20(A-C). Las sumas de Bliss determinadas por estas combinaciones en varias líneas celulares de tumor se representan en la tabla 9.

- 20 Tabla 9
Evaluación de la sinergia de Bliss de muerte celular por la proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 en combinación con DTX en líneas celulares de NSCLC (A) y venetoclax o navitoclax en líneas celulares de NHL y AML (B) *in vitro*

Línea celular de tumor	Suma de Bliss (SEQ ID NO: 19 + DTX)	Línea celular de tumor	Suma de Bliss (SEQ ID NO: 19+ venitoclax)	Suma de Bliss (SEQ ID NO: 19 + navitoclax)
LG0552	748,2	WSU-DLCL2	1292	560
NCI-H522	549,1	SU-DHL-4	898	617
NCI-H647	452	OCI-AML3	831,9	456,4
NCI-H727	429,4	OCI-AML5	777,8	174,5
NCI-H1373	387,1	U2932	736,2	636,1
NCI-H596	261	PL-21	600,8	244,9
HCC2935	224,2	ULA	343,8	79,4
NCI-H2347	154	OCI-Ly18	309,8	8,3
NCI-H2444	135	MV4;11	301,1	351
A549	118,1	RL	286,1	446,7
NCI-H23	70,6	MOLM-13	270,6	264,8
NCI-H847	64,2	SKM-1	222,9	88,1
HCC4006	15,75	OCI-Ly1	218,8	69,1
NCI-H2170	-97,1	SU-DHL-16	217,5	142,5
LG0567	-105,2	OCI-AMI2	160,2	145,5
HCC2935	-183	OCI-Ly8	154,9	177
HCC827	-292,8	THP-1	152,7	43,1
NCI-H661	-344,5	OCI-Ly3	146,5	-242,2
NCI-H441	-362	OCI-Ly2	145	127,2
NCI-H1395	-512	OCI-Ly19	114,9	37,3
NCI-H1944	-565	SKNO-1	104,7	-138,9
NCI-H1693	-584	UKE-1	80,5	28,9
Calu-6	-628,7	WSU-NHK	79,8	84
LG0481	-803	EOL-1	69,7	-6,3
NCI-H2172	-1404	SU-DHL-2	53,5	-31,8
		Toledo	51,4	-68,2
		HEL	21,5	-92,4
		NuDHL-1	-28,4	18,7
		TF-1	-100,6	-50,2
		RC-K8	-131	-68
		HT	-173	12,1
		HL-60	-176	-112,7
		SHI-1	-208,4	-122,6
		SU-DHL-8	-210,6	-37
		SU-DHL-5	-233,8	-280,6
		SET-2	-248,4	71,2
		KG-1	-260	-20,3
		Kasumi-1	-356,4	-241,2

7. El tratamiento con proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

- 5 Se evaluó el efecto de una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en tumores de xenoinjerto subcutáneo Colo205 (colorrectal), SKM-1 (leucemia mieloide aguda) y H460LM (broncopulmonar no microcítico) implantados en ratones hembra SCID (Charles Rivers Laboratories; Wilmington, MA). En resumen, se inocularon células cancerosas humanas por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones SCID hembra en el día 0 del estudio. La administración de la proteína agonista del receptor de TRAIL de la SEQ ID NO: 19 (0,3, 1 o 3 mkd dosificado IV, QDx5 o IP, Q2Dx5 como se indica) se inició en el momento de coincidencia de tamaño. El volumen del tumor se midió mientras duró el experimento hasta que el volumen medio del tumor en cada grupo alcanzó un criterio de valoración de >2000 mm³ para Colo205 y SKM-1 o >2500 mm³ para H460LM. Los resultados se muestran en las figuras 21-23. La administración de una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 indujo inhibición significativa del crecimiento tumoral en los modelos de tumor de xenoinjerto de Colo205, SKM-1 y H460LM.

También se evaluó el efecto de una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto obtenidos de paciente de CTG-0069 (colorrectal), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (pancreático), CTG-0714 (sarcoma), CTG-0136 (esofágico), CTG-485 (gástrico), y CTG-0785 (sarcoma de Ewing) implantado en ratones hembra NSG (Champions Oncology; Hackensack, NJ). En resumen, se propagaron fragmentos de tumor por vía subcutánea en el flanco posterior derecho de ratones NSG hembra en el día 0 del estudio. La administración de una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesto en la SEQ ID NO: 19 (3 mkd dosificado IP, Q2Dx5) se inició en el momento de coincidencia de tamaño. El

5 volumen del tumor se midió mientras duró el experimento hasta que el volumen medio del tumor en cada grupo alcanzó un criterio de valoración de $>2000 \text{ mm}^3$ o 60 días. Los resultados se muestran en las figuras 24(A-G). La administración de una proteína agonista del receptor de TRAIL compuesta de dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19 indujo inhibición significativa del crecimiento tumoral en los modelos PDX de CTG-0069 (colorrectal), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (pancreático), CTG-0714 (sarcoma), CTG-0136 (esofágico), CTG-485 (gástrico) y CTG-0785 (sarcoma de Ewing).

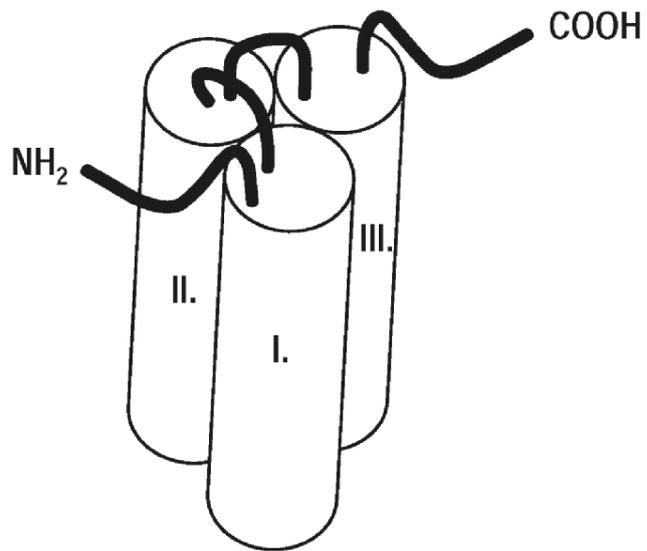
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19.
2. Una proteína agonista del receptor de TRAIL que comprende dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 19.
- 10 3. La proteína agonista del receptor de TRAIL de la reivindicación 2, en la que los dos polipéptidos están unidos covalentemente mediante tres enlaces disulfuro intercatenarios formados entre los restos de cisteína 513, 519 y 522 de cada polipéptido.
- 15 4. La proteína agonista del receptor de TRAIL de la reivindicación 1, 2 o 3, en la que uno o más de los restos de asparagina en las posiciones 168 y 337 del polipéptido o polipéptidos están N-glucosilados.
5. La proteína agonista del receptor de TRAIL de la reivindicación 1, 2 o 3, en la que los restos de asparagina en las posiciones 168 y 337 del polipéptido o polipéptidos están ambos N-glucosilados.
- 20 6. La proteína agonista del receptor de TRAIL de las reivindicaciones 1-5, en la que el polipéptido o polipéptidos están además modificados postraduccionalmente.
7. La proteína agonista del receptor de TRAIL de la reivindicación 6, en la que la modificación postraduccional comprende la modificación de la glutamina del extremo N en piroglutamato.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende la proteína agonista del receptor de TRAIL de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y uno o más vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 30 9. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína agonista del receptor de TRAIL de la reivindicación 1, o un vector de expresión o célula que comprende dicha molécula de ácido nucleico.
10. La célula de la reivindicación 9, que es una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero.
- 35 11. La célula de la reivindicación 9, en la que la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
12. Una proteína agonista del receptor de TRAIL de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a TRAIL.
- 40 13. Una proteína agonista del receptor de TRAIL para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que enfermedad o trastorno se selecciona de tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazos de trasplantes.
- 45 14. Una proteína agonista del receptor de TRAIL para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los tumores son tumores sólidos o tumores linfáticos; los trastornos autoinmunitarios son enfermedades reumatoides, enfermedades artríticas o enfermedades reumatoides y artríticas; o en la que la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa.
- 50 15. Una proteína agonista del receptor de TRAIL para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la enfermedad o trastorno es artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

Fig. 1



A.



B.

Fig. 2

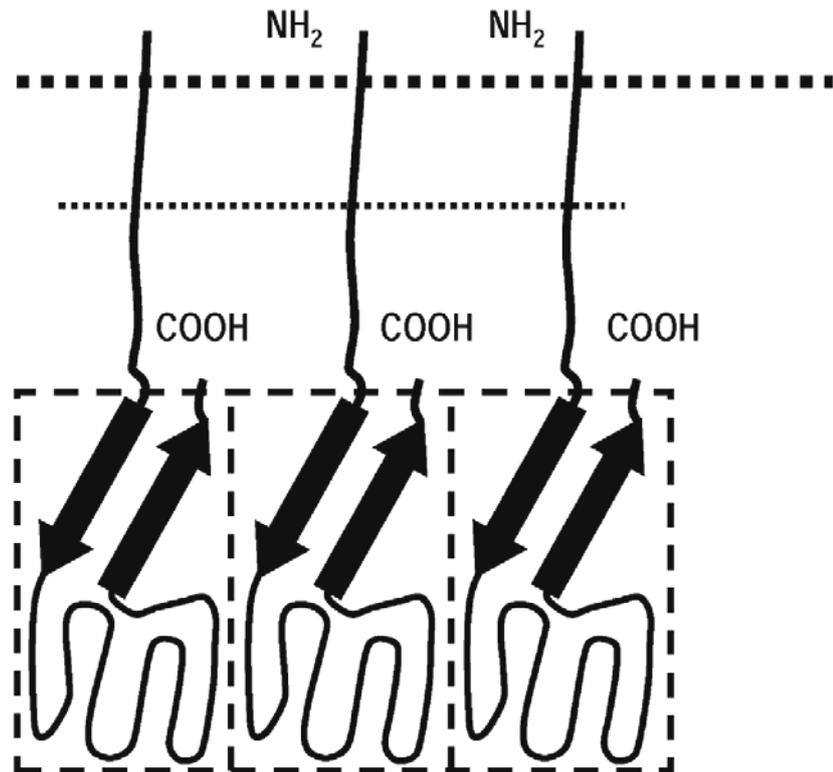


Fig. 3

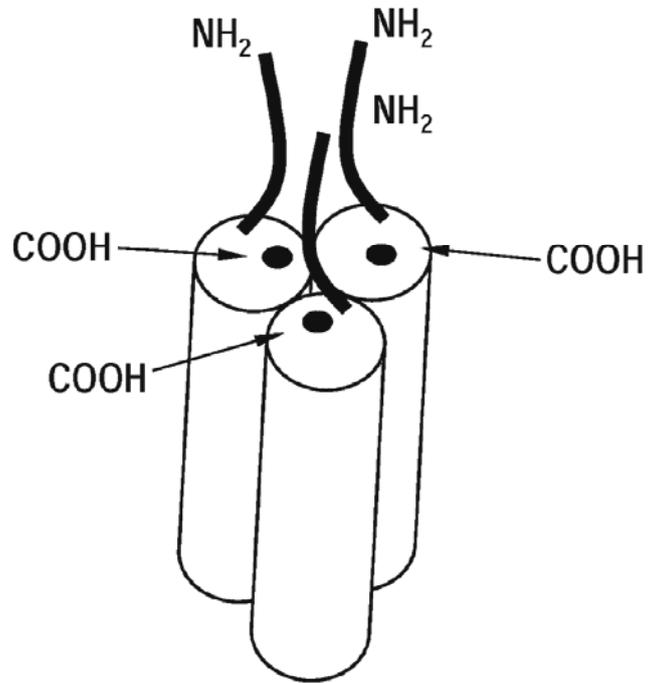


Fig. 4

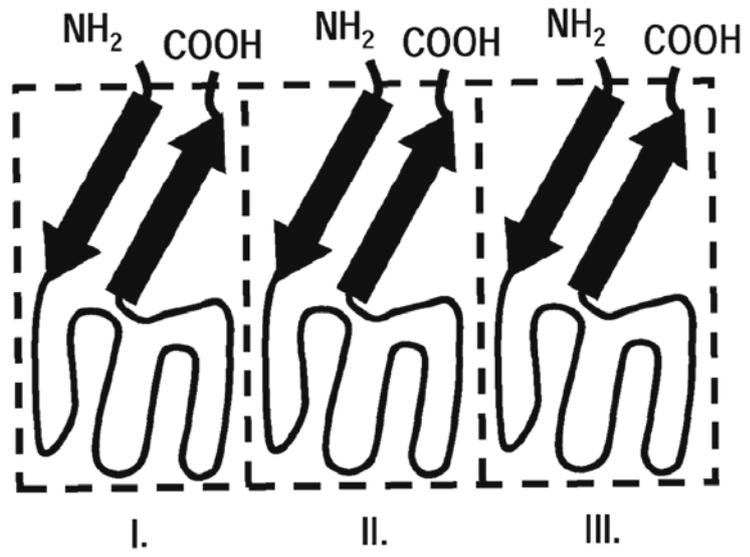


Fig. 5

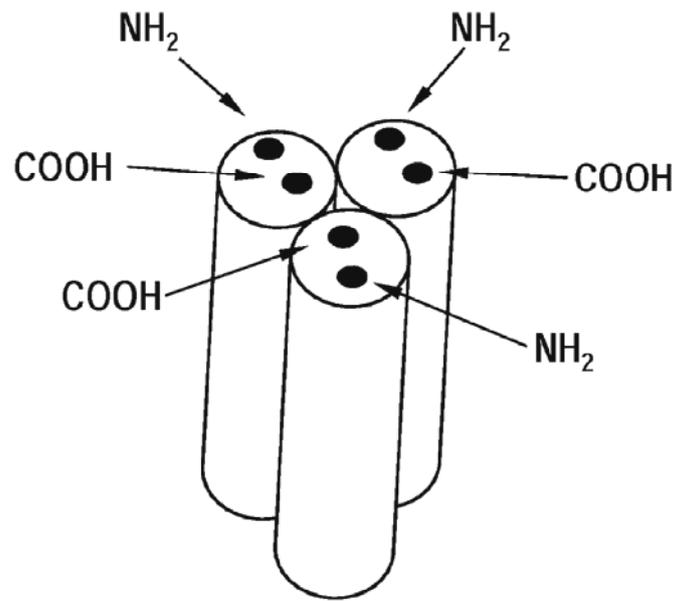


Fig. 6

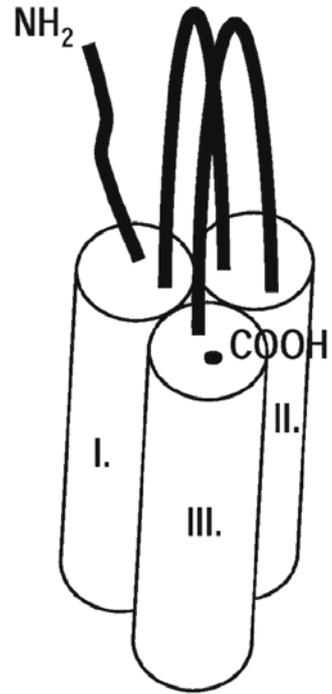


Fig. 7

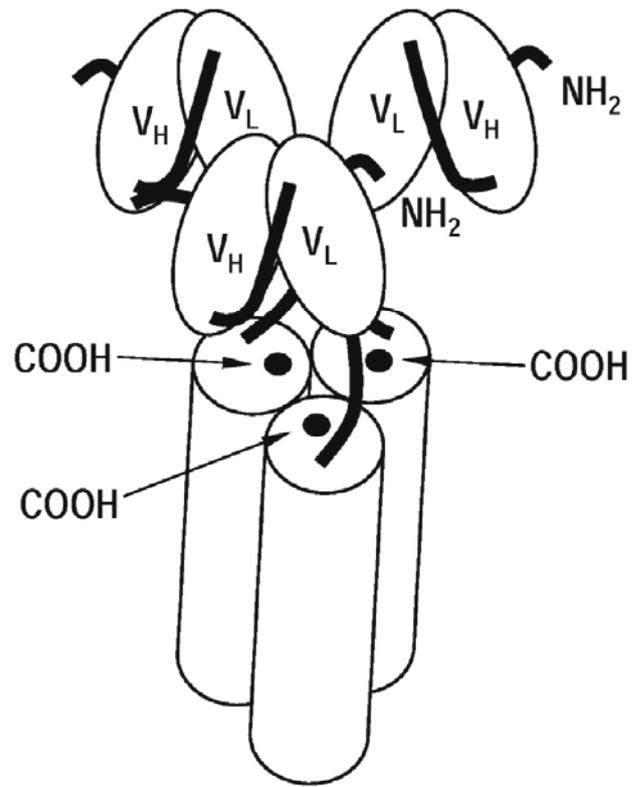


Fig. 8

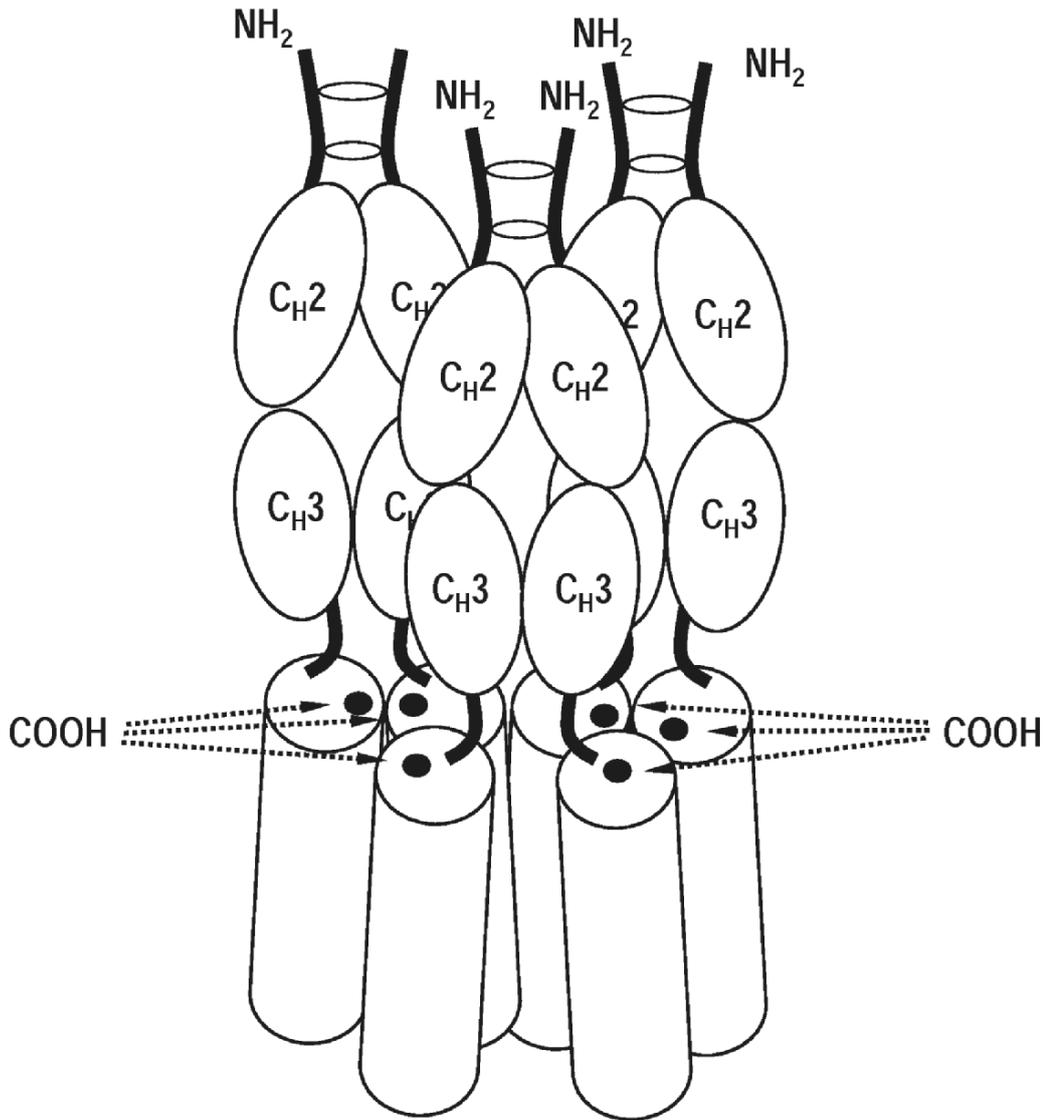


Fig. 9

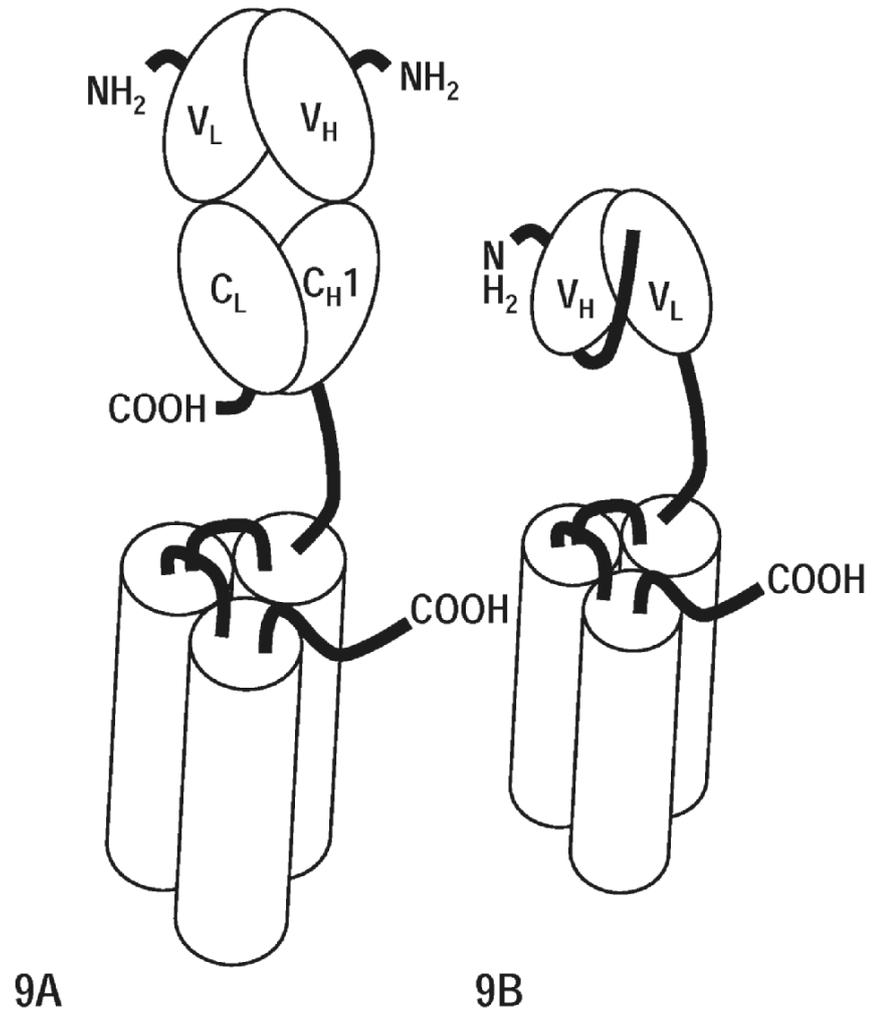


Fig. 10

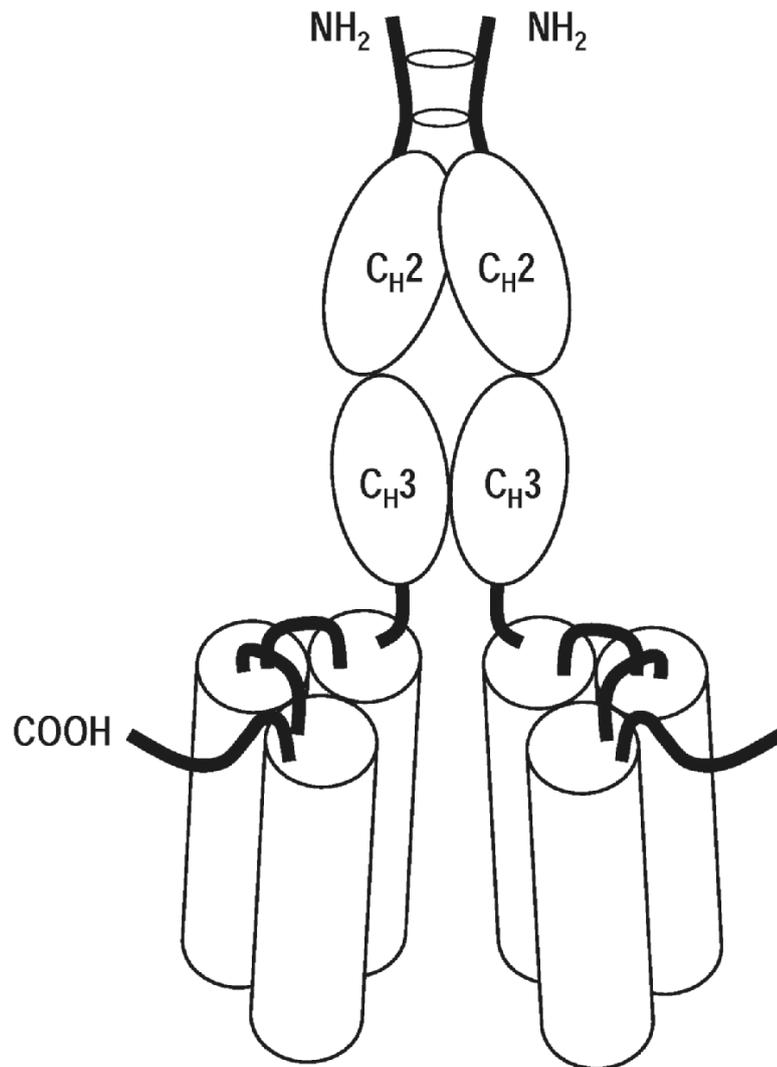


Fig. 11

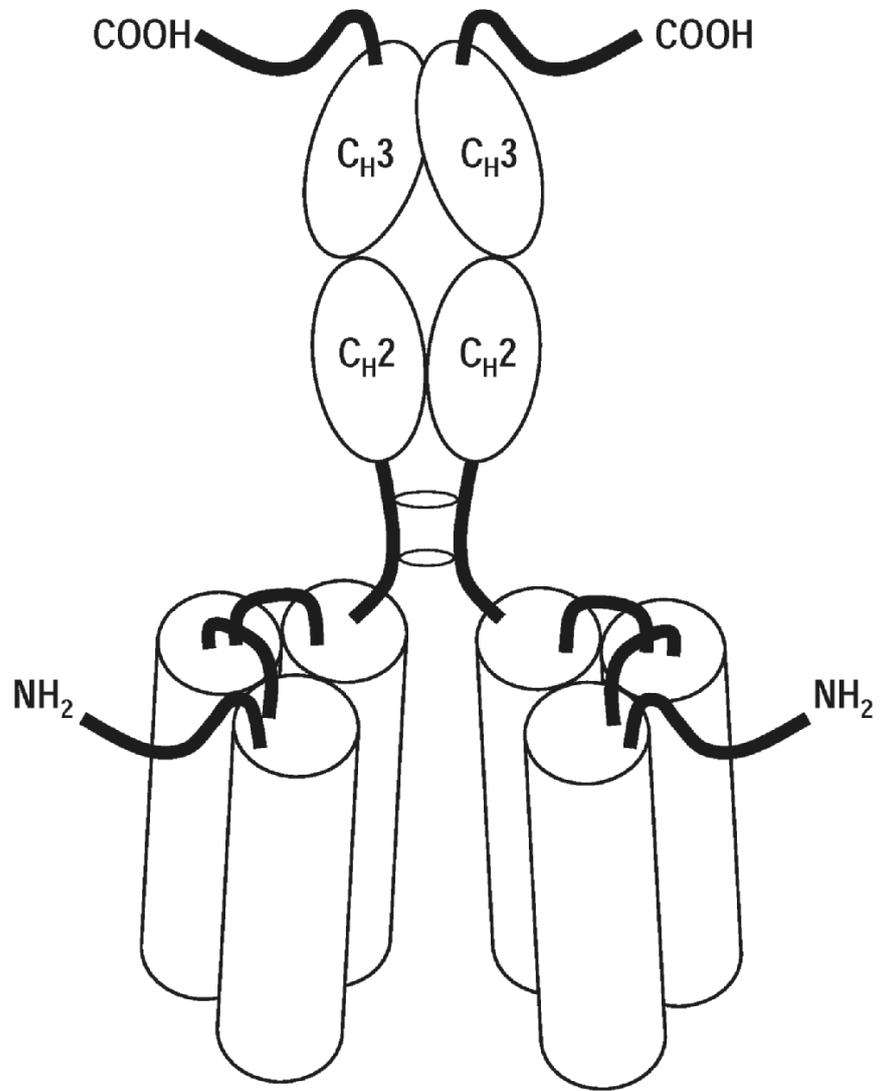


Fig. 12

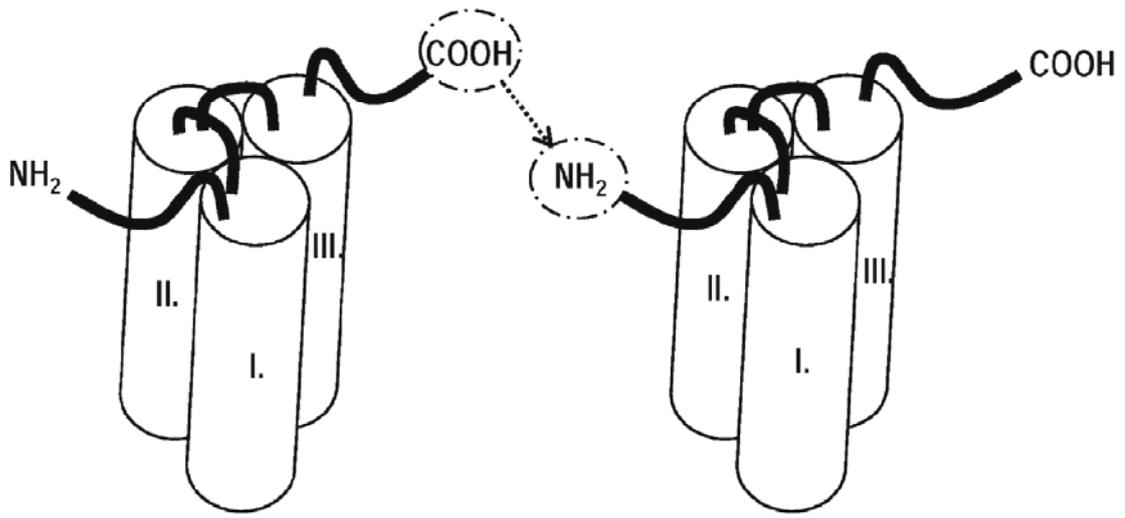


Fig. 13

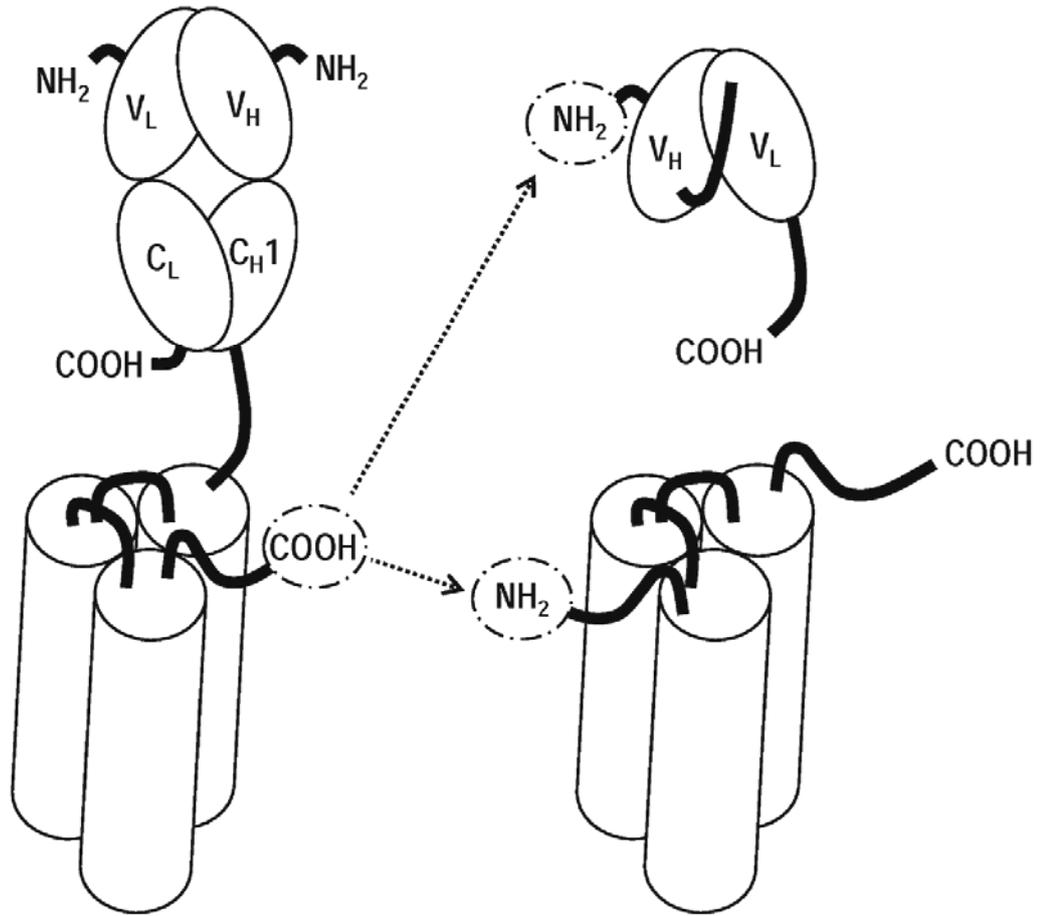


Fig. 14

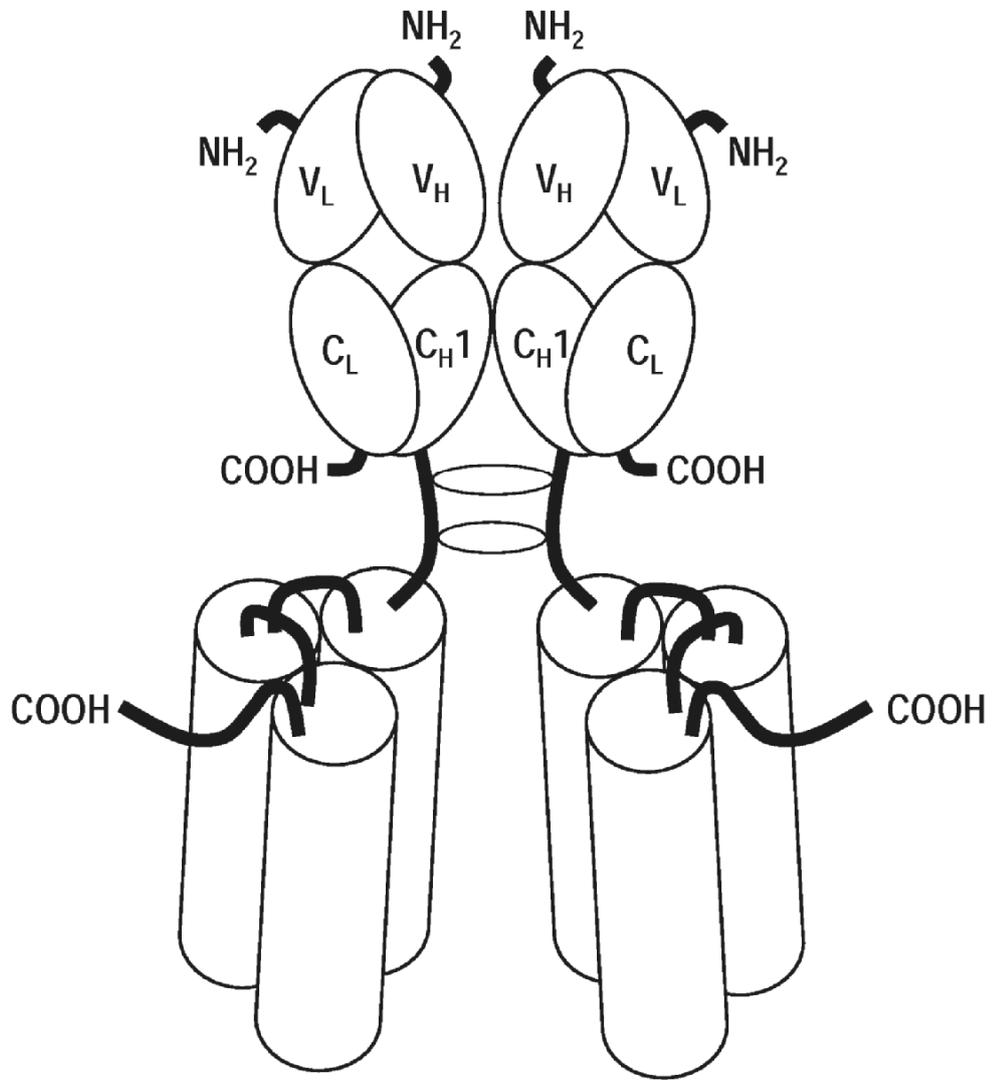
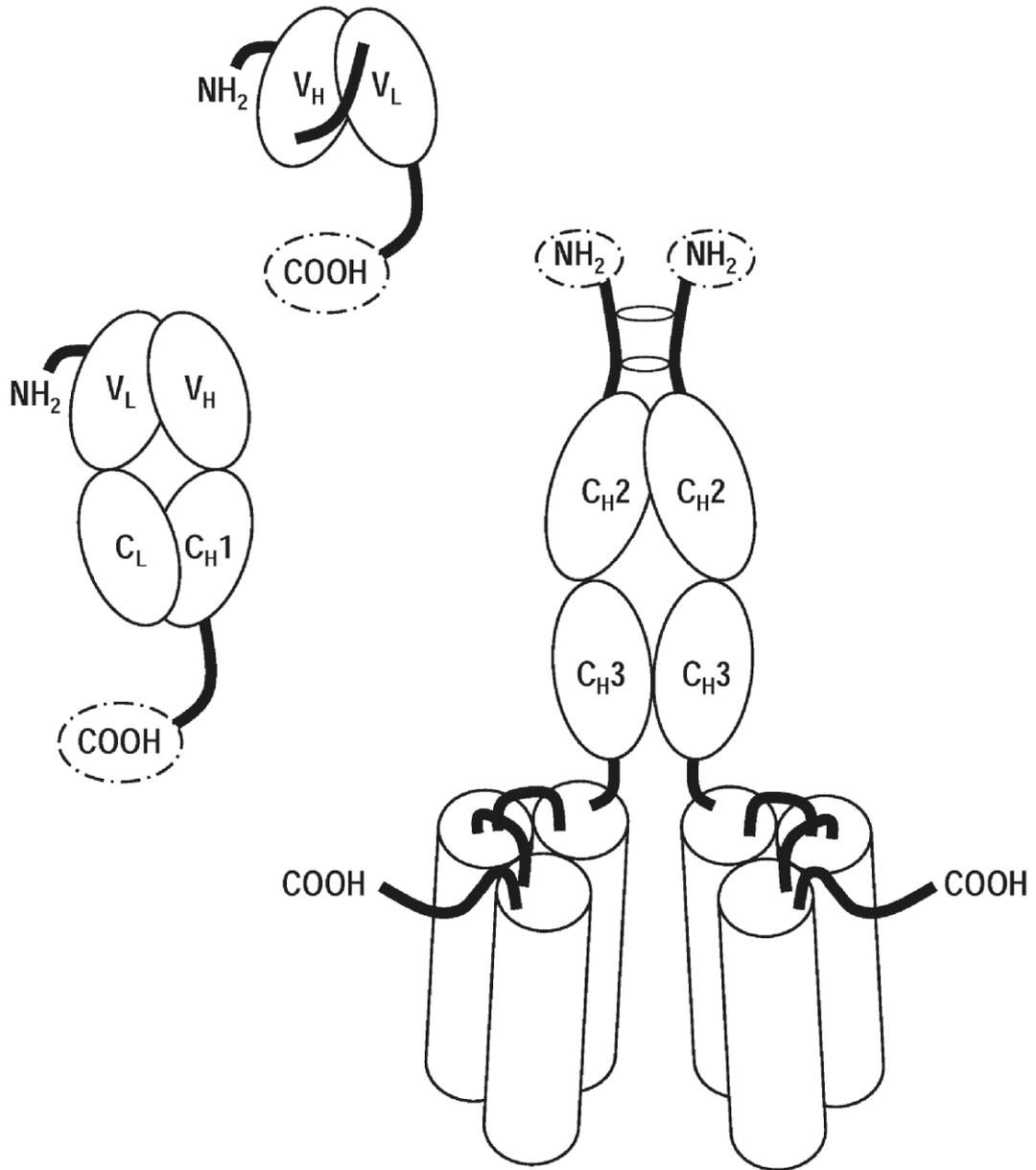


Fig. 15



El péptido señal se representa en texto en negrita y subrayado (no presente en la proteína madura):
SEQ ID NO: 12

Los módulos monoméricos del dominio de unión al receptor de TRAIL en texto normal: 120-281 y 121-281 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente

Lo conectores entre los monómeros de TRAIL en texto en negrita: **SEQ ID NO: 2**

Dominio Fc de IgG1 humana en *texto en cursiva y subrayado*: *SEQ ID NO: 10*

La bisagra-conector entre el scTRAIL-RBD y Fc se representa en texto en *negrita y cursiva*: *SEQ ID NO: 11*

METDILLVFLVWPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH
SFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSTYFPDPIILLM
 KSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGG**SGGS**
GNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHE
 KGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSTYFPDPIILLMKSARNSCWSKDAEYGLY
 SIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGG**SGSGNGSRVAAHITGTRGRS**
 NTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEE
 IKENTKNDKQMVQYIYKYTSTYFPDPIILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIF
 VSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGG**PGSSSSSSSGCDKTHTCP**PPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK*

Fig. 17A

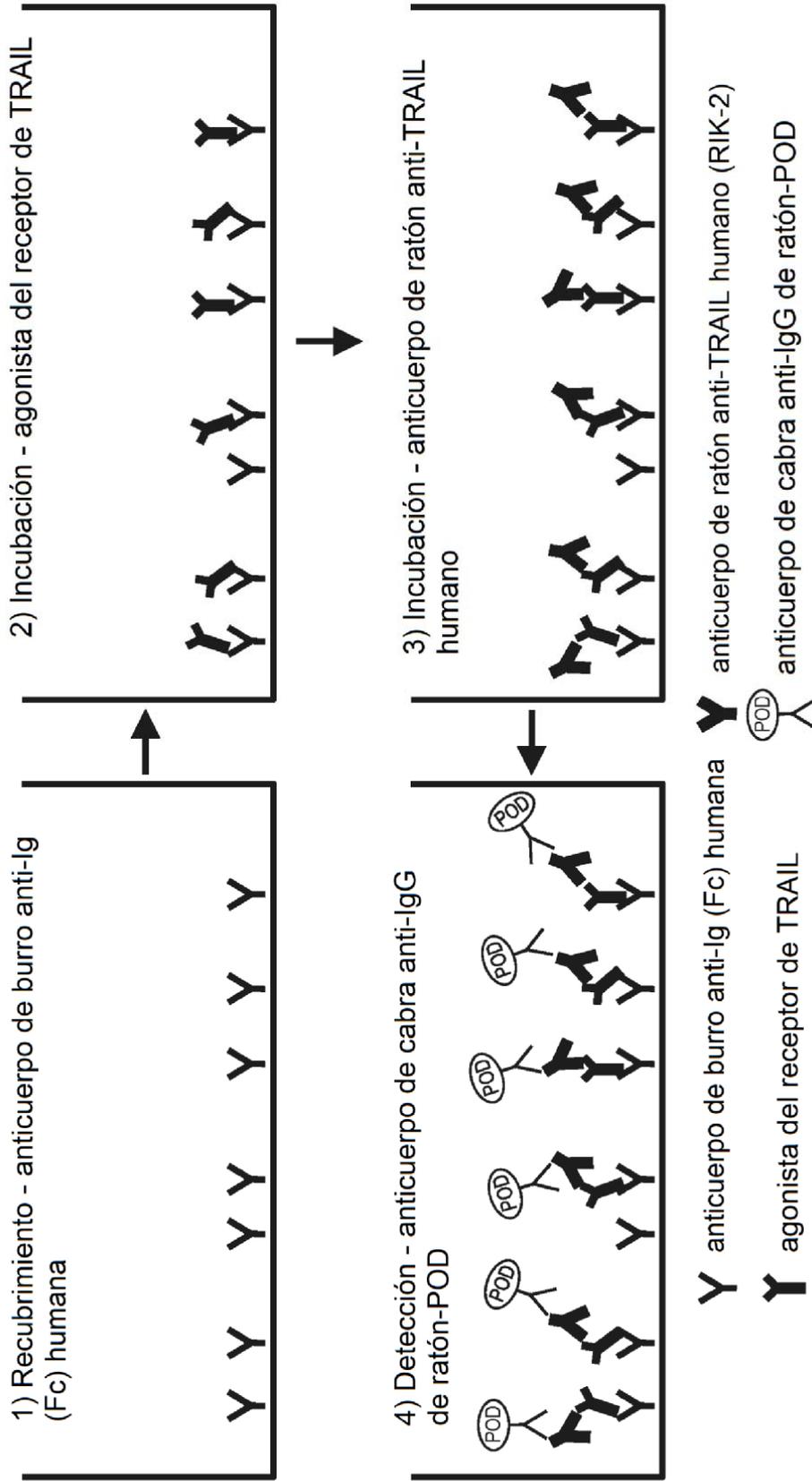
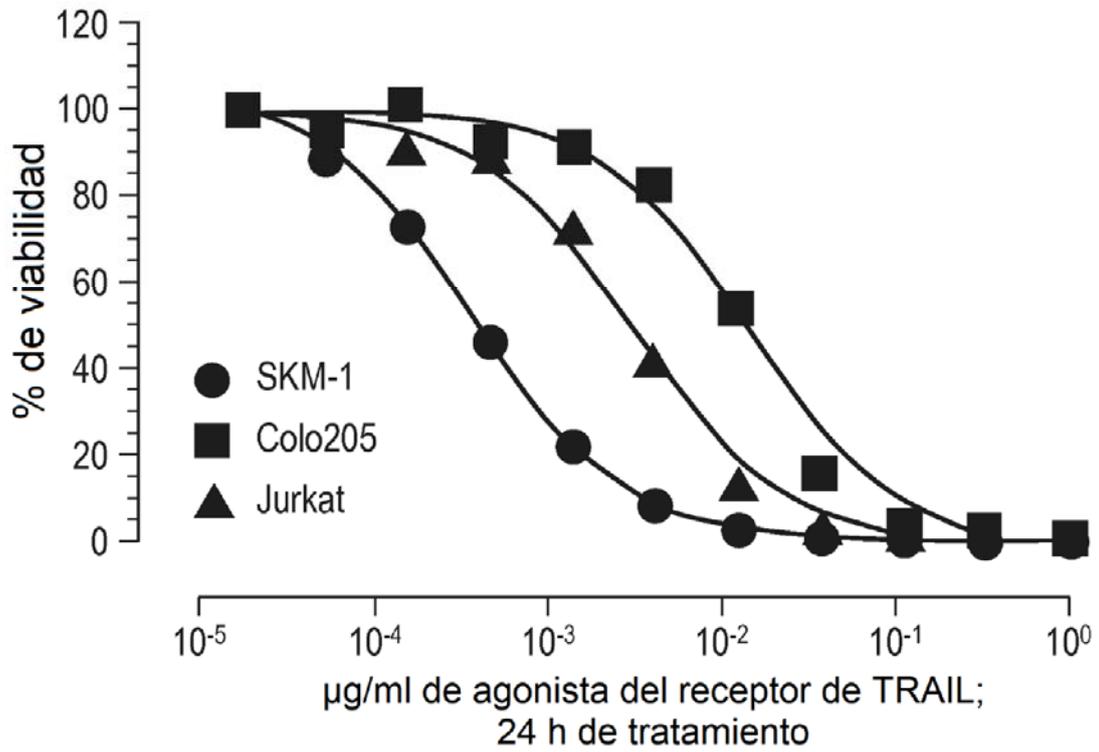


Fig. 18

Fig. 19



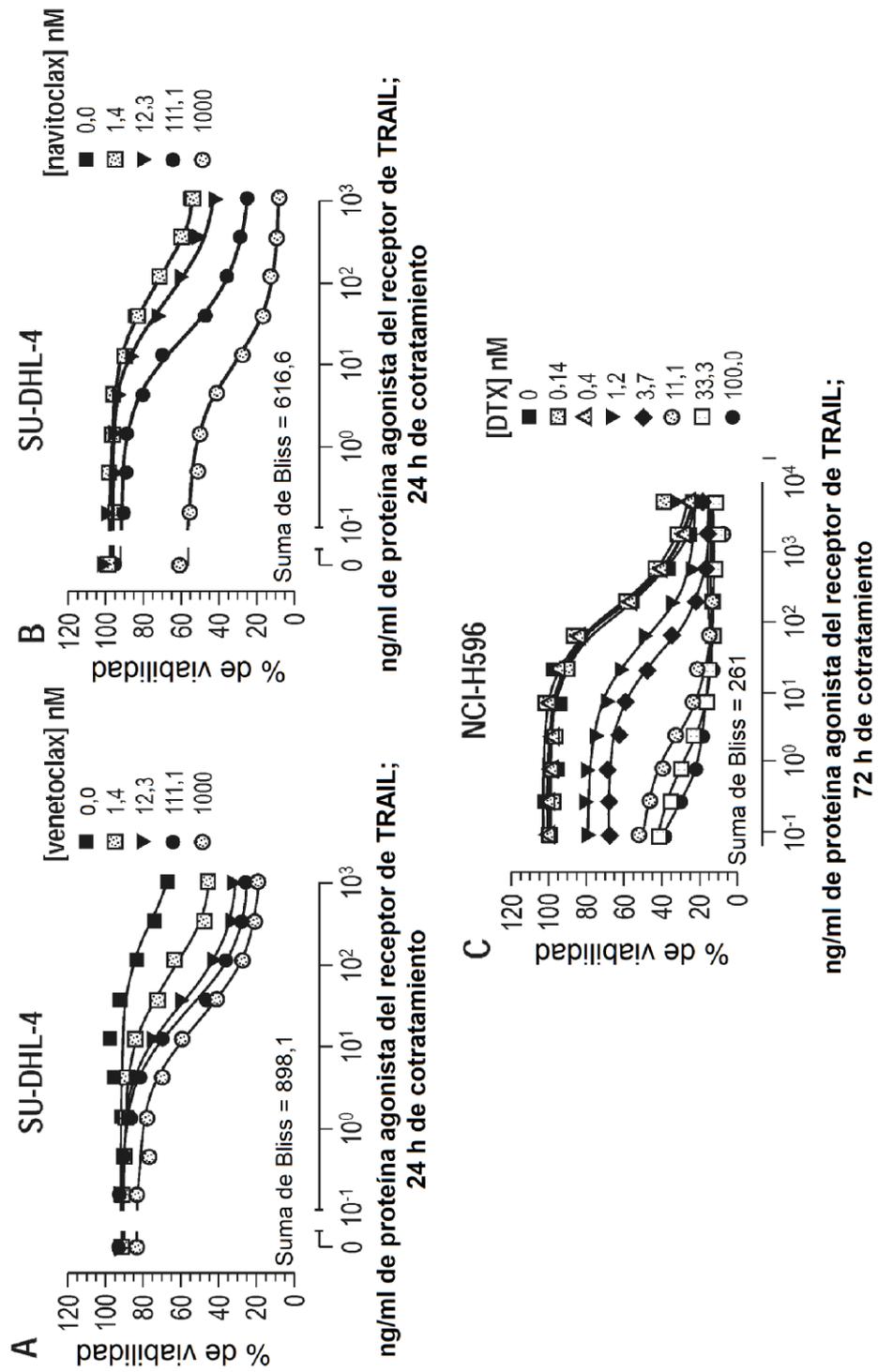


Fig. 20

Fig. 21

Los regímenes de tratamiento mostrados se refieren a cantidades de proteína agonista del receptor de TRAIL

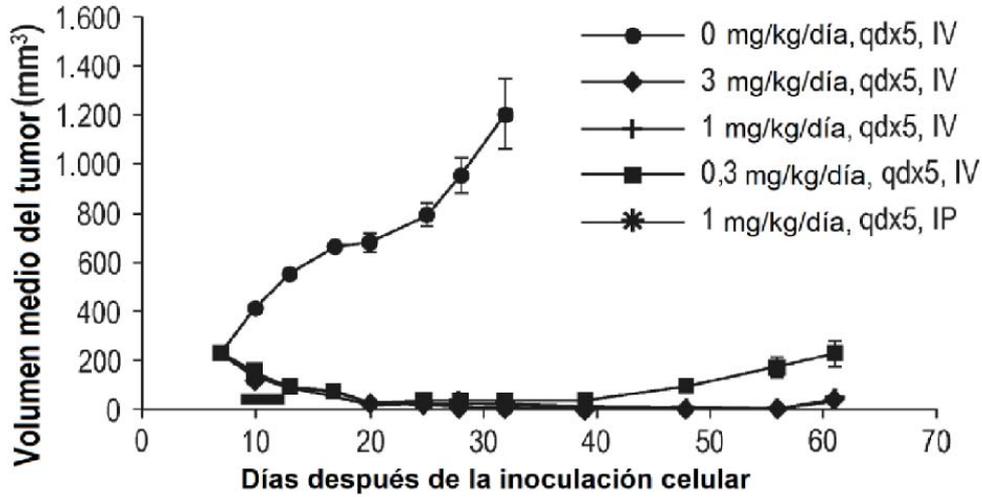


Fig. 22

Los regímenes de tratamiento mostrados se refieren a cantidades de proteína agonista del receptor de TRAIL

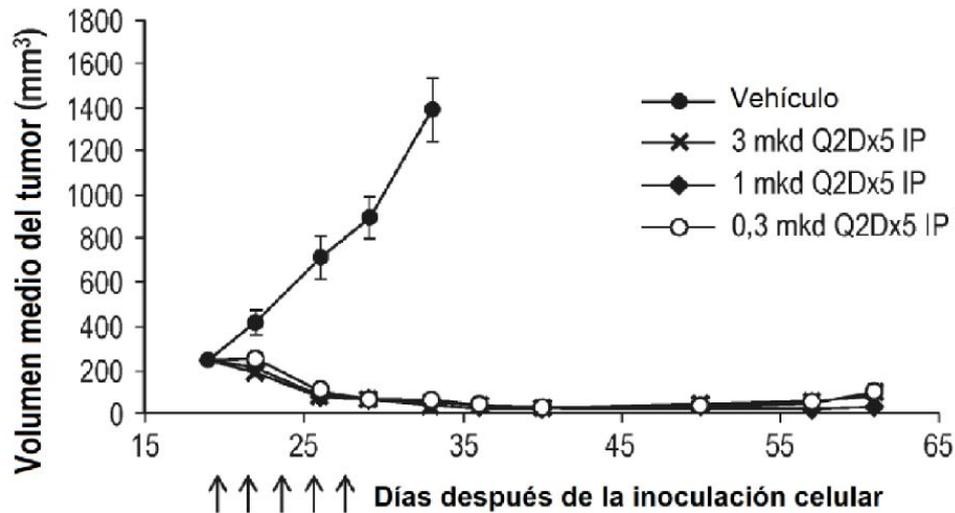
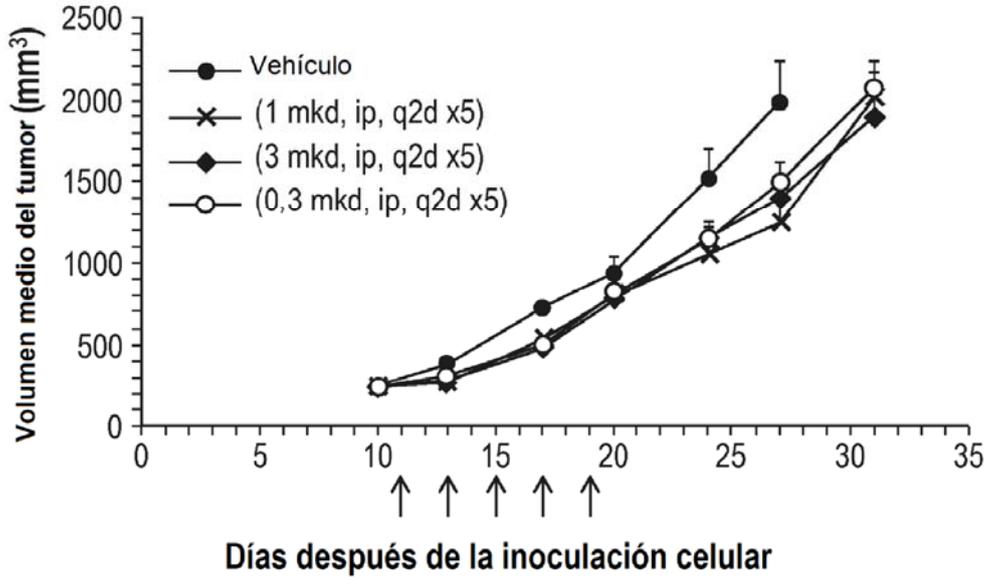


Fig. 23

Los regímenes de tratamiento mostrados se refieren a cantidades de proteína agonista del receptor de TRAIL



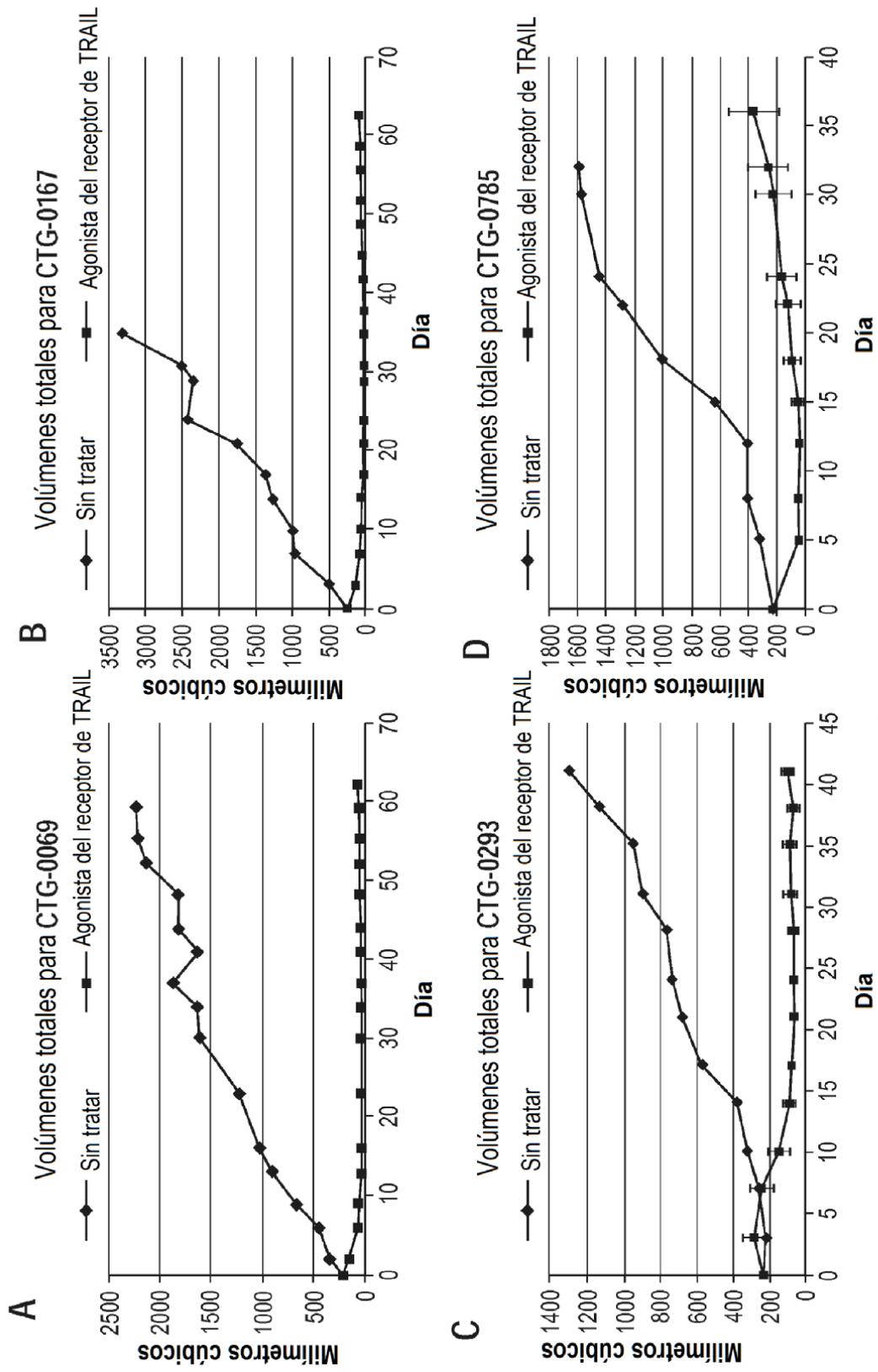


Fig. 24

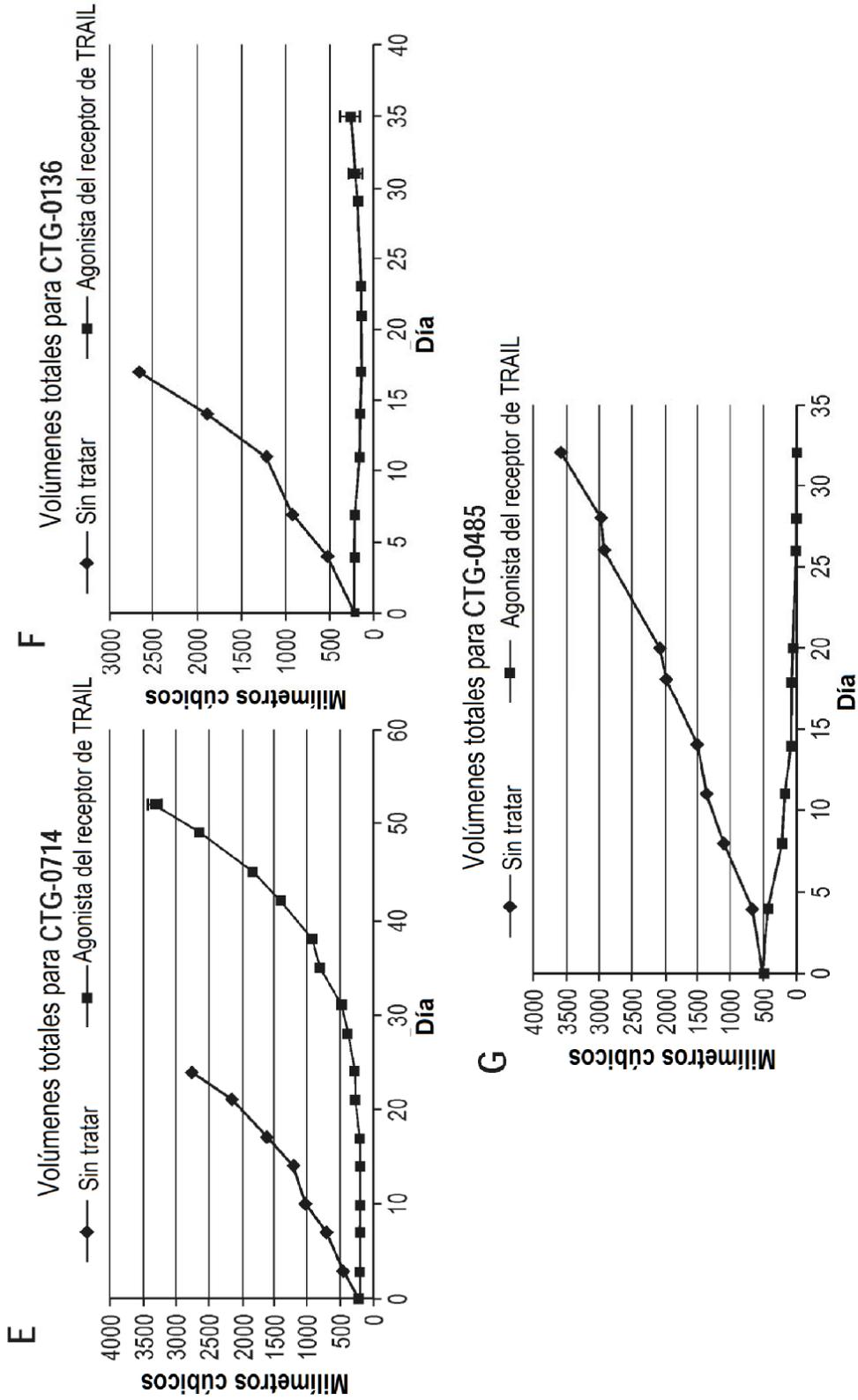


Fig. 24