

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 432**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2016 PCT/EP2016/059983**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2016 E 16725774 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3292143**

54 Título: **Proteínas agonistas de receptor CD40 de cadena sencilla**

30 Prioridad:

**04.05.2015 US 201562156813 P**

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

**17.04.2020**

73 Titular/es:

**APOGENIX AG (100.0%)  
Im Neuenheimer Feld 584  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**HILL, OLIVER;  
GIEFFERS, CHRISTIAN;  
THIEMANN, MEINOLF y  
SCHNYDER, TIM**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 754 432 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 de receptor CD40 de cadena sencilla

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona proteínas agonistas de receptor CD40 específicas que comprenden tres dominios de CD40L solubles y un fragmento Fc, moléculas de ácido nucleico que codifican para las proteínas agonistas de receptor CD40 y usos de las mismas. Las proteínas agonistas de receptor CD40 no se agregan sustancialmente y son adecuadas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o de investigación.

**Antecedentes de la invención**

Se sabe que la trimerización de citocinas de la superfamilia de TNF (TNFSF) se requiere para lograr una activación y unión al receptor eficaces. Sin embargo, los complejos triméricos de citocinas de la superfamilia de TNF son difíciles de preparar a partir de unidades monoméricas recombinantes.

Los documentos WO 01/49866 y WO 02/09055 dan a conocer proteínas de fusión recombinantes que comprenden una citocina de TNF y un componente de multimerización, particularmente una proteína de la familia de proteínas C1q o una colectina. Una desventaja de estas proteínas de fusión es, sin embargo, que el dominio de trimerización tiene habitualmente un gran peso molecular y/o que la trimerización es bastante ineficaz.

Schneider *et al.* (J Exp Med 187 (1989), 1205-1213) describen que trímeros de citocinas de TNF se estabilizan mediante motivos de estabilización situados de manera N-terminal. En CD95L, la estabilización del trímero de dominio de unión al receptor está provocada presumiblemente por dominios de aminoácidos N-terminales que están ubicados cerca de la membrana citoplasmática.

Shiraishi *et al.* (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) describen que el dominio de unión al receptor de CD95L puede estabilizarse mediante motivos de  $\alpha$ -hélice superenrollada (cremallera de leucinas) artificiales situados de manera N-terminal. Sin embargo, se encontró que la orientación de las cadenas de polipéptido entre sí, por ejemplo orientación paralela o antiparalela, apenas puede predecirse. Además, el número óptimo de repeticiones de héptada en el motivo de cremallera superenrollada es difícil de determinar. Además, las estructuras superenrolladas tienen la tendencia a formar agregados macromoleculares tras la alteración del pH y/o la fuerza iónica.

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 el que el polipéptido comprende al menos tres sitios de unión a receptor de los cuales 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 eficazmente a un dominio de unión a ligando del receptor celular, mediante lo cual los polipéptidos oligoméricos de cadena sencilla son capaces de unirse al receptor, pero incapaces de activar el receptor. Por ejemplo, los monómeros se derivan de ligandos de citocina de la familia de TNF, particularmente de TNF- $\alpha$ .

El documento WO 2005/103077 da a conocer polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden al menos tres monómeros de un miembro de ligando de la familia de TNF y al menos dos ligadores peptídicos que unen los monómeros de miembros de la familia de ligandos de TNF entre sí. Sin embargo, experimentos recientes han mostrado que estos polipéptidos de fusión de cadena sencilla muestran agregación no deseada.

El documento WO 2010/010051 da a conocer polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden tres dominios de citocina de la familia de TNF soluble y al menos dos ligadores peptídicos. Los polipéptidos de fusión descritos no se agregan sustancialmente.

Estudios recientes han mostrado que los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM anti-CD40 explorados actualmente en la práctica clínica no son agonistas sin reticulación adicional (véase Vonderheide, R. H. y M. J. Glennie (2013). "Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy". Clin Cancer Res 19(5): 1035-1043.

Existe la necesidad en la técnica de agonistas de receptor CD40 novedosos que presenten alta actividad biológica independiente de reticulación basada en Fc-gamma-R *in vivo*, alta estabilidad y permitan una fabricación recombinante eficaz.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona proteínas agonistas de receptor CD40 específicas que imitan la interacción CD40:CD40L *in vivo*, presentan baja degradación proteolítica y prolongan la semivida *in vivo*.

Las proteínas agonistas de receptor CD40 de la presente invención generalmente comprenden: (i) un primer dominio

de citocina CD40L soluble; (ii) un primer ligador peptídico; (iii) un segundo dominio de CD40L soluble; (iv) un segundo ligador peptídico; (v) un tercer dominio de CD40L soluble; (vi) un tercer ligador peptídico (por ejemplo, una bisagra-ligador) y (vii) un fragmento Fc de anticuerpo, que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 o 14 o los aminoácidos 1-217 de SEQ ID NO: 13 o 14, en el que el fragmento Fc de anticuerpo (vi) se ubica de manera C-terminal con respecto al tercer dominio de CD40L (v), y se fusiona al dominio de CD40L soluble (v) por medio de una bisagra-ligador de una cualquiera de SEQ ID NO: 16 y 19-24.

En una realización, al menos uno de los dominios de CD40L solubles, particularmente al menos uno de los dominios de CD40L solubles (iii) y (v), es un dominio de CD40L soluble con una secuencia N-terminal que comienza en el aminoácido Gln121 o Ile122 de CD40L humano y en el que Gln121 puede reemplazarse por un aminoácido neutro, por ejemplo, Ser o Gly. En otra realización, al menos uno de los dominios de CD40L solubles, particularmente al menos uno de los dominios de CD40L solubles (iii) y (v), es un dominio de CD40L soluble con unas secuencias N-terminales seleccionadas de (a) Gln121 - Ile122 y (b) (Gly/Ser)121 - Ile122. En una realización, el dominio de CD40L soluble termina con el aminoácido Leu261 de CD40L humano y/u opcionalmente comprende una o más mutaciones en las posiciones E129, A130, S132, K133, T134, E142, Y145, Y146, C178, C194, R200, F201, C218, Q220, N240. En una realización, los dominios de CD40L solubles (i), (iii) y (v) comprenden los aminoácidos Gln121 - Leu261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1.

En una realización, los ligadores peptídicos primero y segundo (ii) y (iv) tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, y preferiblemente son ligadores de glicina/serina, que comprenden opcionalmente un residuo de asparagina que puede estar glicosilado. En una realización, los ligadores peptídicos primero y segundo (ii) y (iv) consisten en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 2. En otra realización, el polipéptido comprende adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, por ejemplo, de SEQ ID NO: 17, que puede comprender un sitio de escisión de proteasa, y/o que comprende adicionalmente un elemento C-terminal que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación, por ejemplo, una etiqueta de estrep. unida a un ligador de serina según SEQ ID NO: 18.

En una realización, el polipéptido de fusión de cadena sencilla de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15 y 25-35.

En una realización, la presente invención proporciona una proteína agonista de receptor CD40 que comprende dos polipéptidos de fusión de cadena sencilla teniendo cada uno la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 27. En una realización, los dos polipéptidos están covalentemente unidos a través de tres enlaces disulfuro intercatenarios formados entre los residuos de cisteína 453, 459 y 462 de cada polipéptido.

En una realización, uno o más de los residuos de asparagina en las posiciones 147 y 296 del/de los polipéptido(s) maduro(s) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 32 o 34 están N-glicosilados. En otra realización, los residuos de asparagina en las posiciones 147 y 296 del/de los polipéptido(s) están ambos N-glicosilados.

En otra realización, el/los polipéptido(s) está(n) además modificado(s) postraduccionalmente. En otra realización, la modificación postraduccional comprende la glutamina N-terminal modificada a piroglutamato.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista de receptor CD40 dada a conocer en el presente documento y uno o más portadores, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína agonista de receptor CD40. En otra realización, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico. En una realización adicional, la célula es una célula eucariota. En otra realización, la célula es una célula de mamífero. En otra realización, la célula 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 células. En otras realizaciones, la célula se selecciona 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-Ag14 y de hibridoma.

En otro aspecto, el presente documento describe un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a CD40L, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la proteína agonista de receptor CD40. La proteína agonista de receptor CD40 puede administrarse sola. Alternativamente, la proteína agonista de receptor CD40 puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de un segundo agente. La enfermedad o trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en: tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazos de trasplantes. En un aspecto, los tumores son tumores sólidos. En un aspecto, los tumores surgen del grupo de cánceres que consisten en sarcoma, cáncer esofágico y cáncer gástrico. En otro aspecto, los tumores surgen de sarcoma de Ewing o fibrosarcoma. En otro aspecto, los tumores surgen del grupo de cánceres que consisten en carcinoma de pulmón de células no

pequeñas (NSCLC), cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cánceres de cabeza y cuello y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). En otro aspecto, los tumores son tumores linfáticos. En un aspecto, los tumores son tumores hematológicos. En otro aspecto, los tumores surgen de linfoma no Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma de células B, linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC) o tricoleucemia. En otro aspecto, los trastornos autoinmunitarios son enfermedades reumatoides, enfermedades artríticas o enfermedades reumatoides y artríticas. En un aspecto adicional, la enfermedad o trastorno es artritis reumatoide. En otro aspecto, la enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa. En un aspecto adicional, la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis múltiple.

En un aspecto, el segundo agente es un agente quimioterápico, radioterápico o biológico. En un aspecto, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en duvelisib, ibrutinib, navitoclax y venetoclax. En otro aspecto, el segundo agente es un agente apoptótico. En un aspecto, el segundo agente apoptótico se selecciona del grupo que consiste en bortezomib, azacitidina, dasatinib y gefitinib. En un aspecto particular, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento se administran a un paciente mediante administración intravenosa o subcutánea. En otros aspectos, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer se administran a un paciente mediante administración oral, parenteral, intramuscular, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, en bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

En un aspecto, la proteína agonista de receptor CD40 se administra como un único bolo. En otro aspecto, la proteína agonista de receptor CD40 puede administrarse a lo largo de varias dosis divididas. La proteína agonista de receptor CD40 puede administrarse a aproximadamente 0,1-100 mg/kg. En un aspecto, la proteína agonista de receptor CD40 puede administrarse a una dosificación 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 otros aspectos, la proteína agonista de receptor CD40 está presente en composiciones farmacéuticas a aproximadamente 0,1-100 mg/ml. En un aspecto, la proteína agonista de receptor CD40 está presente en composiciones farmacéuticas en 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. En otros aspectos, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína agonista de receptor CD40 a un sujeto. En otro aspecto, se administra una cantidad profilácticamente eficaz de proteína agonista de receptor CD40 a un sujeto.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Estructura de dominios de un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende tres dominios de CD40L. I., II., III. Dominios de CD40L solubles.

Figura 2. Dibujo esquemático que representa la estructura general de CD40L.

■■■ Membrana celular, extremo N-terminal ubicado dentro de la célula,

1. Pliegue  $\beta$  antiparalelo de dominio de unión a receptor (RBD),
2. Superficie de contacto de RBD y la membrana celular,
3. Sitio de escisión de proteasa.

Figura 3. Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo Fab adicional.

Figura 4. Dimerización de dos polipéptidos de fusión de scFc fusionados de manera C-terminal por medio de tres puentes disulfuro.

Figura 5. Los cromatogramas de SEC analítica de las proteínas de fusión scCD 40L-RBD-FC hexavalentes PROTEÍNA A, PROTEÍNA B y PROTEÍNA C.

Figura 6. Electroforesis en gel de SDS-Page de las proteínas expresadas PROTEÍNA A, PROTEÍNA B y PROTEÍNA C en condiciones no reducidas y reducidas, carril 1: PROTEÍNA A, no reducida; carril 2: PROTEÍNA A, reducida; carril 3: marcador de peso molecular; carril 4: PROTEÍNA B, no reducida; carril 5: PROTEÍNA B, reducida; carril 6: blanco, carril 7, PROTEÍNA C, no reducida; carril 8: PROTEÍNA C, reducida;

Figura 7. Se incubaron células Ramos B que expresan CD40 con PROTEÍNA X (c), PROTEÍNA A (d), PROTEÍNA B (e) o PROTEÍNA C (f), y se mostró la actividad de unión en unidades de fluorescencia. (a) son células solo. (b) son células incubadas solo con un anticuerpo marcado con fluorescencia.

Figura 8. Se incubaron células Ramos B que expresan CD40 con PROTEÍNA X 1  $\mu\text{g/ml}$  (b), PROTEÍNA X 10  $\mu\text{g/ml}$  (c), PROTEÍNA A 1  $\mu\text{g/ml}$  (d) o PROTEÍNA A 10  $\mu\text{g/ml}$  (e) y se mostró la actividad de unión en la expresión de CD86 normalizada (a), que no se incubó con ningún agonista de receptor CD40.

Figura 9. Se incubaron 2 ml de sangre con PROTEÍNA X 1  $\mu\text{g/ml}$  (b), PROTEÍNA X 50  $\mu\text{g/ml}$  (c), PROTEÍNA A 1  $\mu\text{g/ml}$  (d) o PROTEÍNA A 50  $\mu\text{g/ml}$  (e). Se determinó el porcentaje de células positivas para CD83 y se normalizó a la muestra de control (a), que no se incubó con un agonista de receptor CD40.

Figura 10. Representación esquemática de la proteína de fusión de agonista de receptor CD40 de cadena sencilla hexavalente de la invención. Los hidratos de carbono CH2 (5) presentes en las áreas de superficie interna protegen normalmente el subdominio de CH2 estéricamente (2) de las proteasas durante los "tránsitos de conformación de Fc abierta" en los que enlaces disulfuro intercatenarios de la bisagra (4) se reducen y la unión intercatenaria covalente se rompe. Esto permite la disociación de CH2 y la exposición de las áreas de superficie interna y la lisina de la bisagra superior K223 (6) hacia proteasas. La asociación de dímeros en la "fase abierta" permanece intacta debido a la alta afinidad de los dominios CH3 (3) entre sí. (1) scCD40L-RBD; (2) dominio CH2; (3) dominio CH3; (4) cisteínas de la bisagra (lado izquierdo: oxidadas a puentes disulfuro; lado derecho, fase reducida con tioles libres); (5) hidratos de carbono CH2 unidos a la posición N297 (numeración de EU); (6) lisina de la bisagra superior (K223).

## Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto que la fusión de un dominio de unión a receptor de CD40L de cadena sencilla a un dominio de dimerización derivado de anticuerpo da como resultado un agonista de receptor CD40 hexavalente que proporciona una alta actividad biológica combinada con buena estabilidad. Por consiguiente, se proporciona un polipéptido de fusión de cadena sencilla tal como se define en la reivindicación 1 que comprende al menos tres dominios de CD40L solubles conectados por dos ligadores peptídicos.

Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena sencilla no se agrega. El término "no se agrega" se refiere a un contenido en monómero de la preparación de  $\geq 50\%$ , preferiblemente  $\geq 70\%$  y más preferiblemente  $\geq 90\%$ . La razón de contenido en monómero con respecto a contenido en agregado puede determinarse examinando la cantidad de formación de agregado usando cromatografía de exclusión molecular (SEC). La estabilidad referente a la agregación puede determinarse mediante SEC tras periodos de tiempo definidos, por ejemplo desde unos cuantos a varios días, hasta semanas y meses en diferentes condiciones de almacenamiento, por ejemplo a  $4^{\circ}\text{C}$  o  $25^{\circ}\text{C}$ . Para la proteína de fusión, con el fin de clasificarse como sustancialmente que no se agrega, se prefiere que el contenido en "monómero" sea tal como se definió anteriormente tras un periodo de tiempo de varios días, por ejemplo 10 días, más preferiblemente tras varias semanas, por ejemplo 2, 3 o 4 semanas, y lo más preferiblemente tras varios meses, por ejemplo 2 o 3 meses de almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$  o  $25^{\circ}\text{C}$ . Con respecto a la definición de "monómero" en el caso de proteínas de fusión de Fc, el ensamblaje de dos cadenas polipeptídicas está dirigido por la parte de Fc y la unidad funcional de la proteína ensamblada resultante consiste en dos cadenas. Esta unidad se define como "monómero" en el caso de proteínas de fusión de Fc independientemente de ser un polipéptido de fusión de cadena sencilla dimerizado.

El polipéptido de fusión de cadena sencilla puede comprender dominios adicionales que pueden ubicarse en los extremos N- y/o C-terminales del mismo. Ejemplos de dominios de fusión adicionales son por ejemplo un dominio de péptido señal N-terminal que puede comprender un sitio de escisión de proteasa o un elemento C-terminal que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación. Según una realización preferida, el polipéptido de fusión comprende una etiqueta de estrep. en su extremo C-terminal que se fusiona por medio de un ligador. Una etiqueta de estrep. a modo de ejemplo que incluye un ligador de serina corto se muestra en SEQ ID NO: 18.

La proteína agonista de receptor CD40 de la presente invención comprende tres dominios solubles derivados de CD40L. Preferiblemente, esos dominios solubles se derivan de un CD40L de mamífero, particularmente humano incluyendo variantes alélicas y/o derivados del mismo. Los dominios solubles comprenden la porción extracelular de CD40L incluyendo el dominio de unión al receptor sin dominios ubicados en la membrana. Como otras proteínas de la superfamilia de TNF, CD40L se ancla a la membrana por medio de una porción N-terminal de 15-30 aminoácidos, la denominada región de tallo. La región de tallo contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular. Sin embargo, la región de tallo no es parte del dominio de unión al receptor (RBD).

De manera importante, el RBD se caracteriza por una localización particular de sus aminoácidos N- y C-terminales. Dichos aminoácidos son inmediatamente adyacentes y están ubicados de manera central con respecto al eje del trímero. Los primeros aminoácidos N-terminales del RBD forman una hebra beta antiparalela con los aminoácidos C-terminales del RBD (figura 2).

Por tanto, la hebra beta antiparalela del RBD forma una superficie de contacto con la membrana celular, que está conectada a y anclada dentro de la membrana celular por medio de los aminoácidos de la región de tallo. Se prefiere sumamente que los dominios de CD40L solubles de la proteína agonista de receptor CD40 comprendan un dominio

de unión al receptor del CD40L que carece de cualquier aminoácido de la región de tallo. De lo contrario, se requeriría un ligador largo que conecte el extremo C-terminal de uno de los dominios solubles con el extremo N-terminal del siguiente dominio soluble para compensar la región de tallo N-terminal del siguiente dominio soluble, lo que daría como resultado inestabilidad y/o formación de agregados.

Una ventaja adicional de tales dominios solubles es que los aminoácidos N- y C-terminales del RBD no son accesibles para ningún anticuerpo antifármaco. Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena sencilla es capaz de formar una estructura trimérica ordenada que comprende al menos un sitio de unión funcional para el respectivo receptor de CD40L.

La proteína agonista de receptor CD40 comprende tres sitios de unión a receptor CD40 funcionales, es decir, secuencias de aminoácidos capaces de formar un complejo con un receptor CD40. Por tanto, los dominios solubles son capaces de unirse al correspondiente receptor CD40. En una realización, al menos uno de los dominios solubles es capaz de producir activación del receptor, mediante lo cual puede verse afectada la actividad apoptótica y/o proliferativa. En una realización adicional, uno o más de los dominios solubles se seleccionan como que no pueden producir activación del receptor.

El dominio de CD40L soluble puede derivarse de CD40L humano tal como se muestra en SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, los dominios de CD40L solubles se derivan de CD40L humano, particularmente partiendo de los aminoácidos 121 o 122 y comprenden particularmente los aminoácidos 121-261 o 122-261 de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el aminoácido Gln121 de SEQ ID NO: 1 puede reemplazarse por un aminoácido no cargado, por ejemplo Ser o Gly.

**Tabla 1: Secuencia de proteína CD40L humana silvestre**

| SEQ ID NO | Secuencia  |
|-----------|--|
| 1         | MIETYNQTSRPSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVY<br>LHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIK<br>SQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEA<br>SSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY<br>AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSA<br>KPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSF<br>GLLKL |

Tal como se indicó anteriormente, los dominios de CD40L solubles pueden comprender las secuencias silvestres indicadas en SEQ ID NO: 1. Sin embargo, debe indicarse 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 unión de los dominios solubles. En una realización, pueden seleccionarse dominios solubles que no pueden unirse al correspondiente receptor de citocina.

En una realización adicional de la invención, el dominio de CD40L soluble (i) comprende un mutante de CD40L o un dominio de unión al receptor del mismo que da como resultado una afinidad reducida y/o activación reducida del receptor CD40.

La unión y/o actividad del mutante puede determinarse, por ejemplo, mediante los ensayos descritos en An *et al.* (2011, J Biol Chem 286(13): 11226-11235); Singh *et al.* (1998, Protein Sci 7(5): 1124-1135); Kim *et al.*, J Biol Chem 286(13): 11226-11235; o Singh *et al.* (1998). Protein Sci 7(5): 1124-1135.

El mutante puede generarse mediante cualquier técnica y el experto en la técnica las conoce. La sustitución puede afectar al menos a un aminoácido de CD40L, por ejemplo, CD40L humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o un dominio de unión al receptor del mismo tal como se describe en el presente documento. Las sustituciones preferidas en este sentido afectan a al menos uno de los siguientes aminoácidos de CD40L humano de SEQ ID NO: 1: E129, S132, T134, E142, Y145, Y146, R200, F201, Q220, tal como E129G, S132E, S132N, T134E, T134N, E142G, E142S, Y145S, Y146S, R200S, Q220E, y Q220S; en particular E129G y E142G.

La(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos puede(n) afectar a la unión y/o actividad de CD40L, por ejemplo, CD40L humano, a o bien la unión a CD40 o la señalización inducida por CD40. La unión y/o actividad del CD40 puede verse afectada positivamente, es decir, unión más fuerte, más selectiva o más específica y/o más activación del receptor. Alternativamente, la unión y/o actividad del CD40 puede verse afectada negativamente, es decir, unión

más débil, menos selectiva o menos específica y/o menor activación o ausente del receptor.

Pueden encontrarse ejemplos de mutantes de CD40L con sustitución/sustituciones de aminoácidos de la invención que afectan a la unión y/o activación de CD40, por ejemplo, en la figura 1 de An *et al.* (véase anteriormente).

5 Por tanto, una realización es una proteína agonista de receptor CD40 tal como se describe en el presente documento en el que al menos uno de los dominios solubles comprende un mutante de CD40L o un dominio de unión al receptor del mismo que se une a y/o activa CD40 en un menor grado que el CD40L silvestre.

10 Ejemplos adicionales de mutantes de CD40L, que muestran señalización reducida y/o agregación del receptor inducida por CD40L reducida con S132E y T134E.

15 Una realización es una proteína agonista de receptor CD40 tal como se describe en el presente documento, en la que se introduce al menos un sitio consenso de N-glicosilación artificial en el área de secuencia definida por E129-S136 dando como resultado agregación del receptor reducida y/o señalización reducida. Ejemplos de mutantes de CD40L que dan como resultado un sitio consenso de N-glicosilación artificial en esta región son E129N, A130N, S132N, K133N y T134N.

20 En una realización adicional de la invención, uno o más de los dominios de CD40L solubles (i), (iii) y (v) pueden comprender un mutante de CD40L o un dominio de unión al receptor del mismo que da como resultado autoagregación reducida y/o estabilidad *in vivo* prolongada. Sustituciones preferidas en este sentido afectan a al menos uno de los siguientes aminoácidos de CD40L humano de SEQ ID NO: 1: C178, C194, C218, N240; tal como C178(A,S,G); C194(A,S,G), F201 (G,S,T, D), C218(A,S,G) y N240(E,S,D,T). La(s) mutación/mutaciones de cada dominio de CD40L puede(n) ser igual(es) o diferente(s).

25 La molécula de fusión de cadena sencilla de la presente invención comprende tres dominios de CD40L solubles, concretamente los componentes (i), (iii) y (v). La estabilidad de un polipéptido de fusión de CD40L de cadena sencilla frente a la agregación se potencia si el segundo y/o tercer dominio de CD40L soluble es un dominio acortado de manera N-terminal que comprende opcionalmente mutaciones de la secuencia de aminoácidos. Por tanto, preferiblemente, tanto el segundo como el tercer dominio de CD40L soluble son dominios acortados de manera N-terminal que comprenden opcionalmente mutaciones de la secuencia de aminoácidos en las regiones N-terminales, preferiblemente dentro de los primeros cinco aminoácidos del extremo N-terminal del dominio de CD40L soluble. Estas mutaciones pueden comprender el reemplazo de aminoácidos básicos por aminoácidos neutros, particularmente serina o glicina. En contraposición a ello, la selección del primer dominio de CD40L soluble no es crítica. En este caso, puede usarse un dominio soluble que tiene una secuencia N-terminal de longitud completa. Sin embargo, debe indicarse que el primer dominio de CD40L soluble también puede tener una secuencia acortada de manera N-terminal y opcionalmente mutada.

40 En una realización adicional preferida de la presente invención, los dominios de CD40L solubles (i), (iii) y (v) son dominios de CD40L humano solubles. El primer dominio de CD40L soluble (i) puede seleccionarse de secuencias nativas, acortadas y/o mutadas. Por tanto, el primer dominio de CD40L soluble (i) tiene una secuencia N-terminal que puede comenzar en el aminoácido Gln121 o Ile122 de CD40L humano, y en la que Gln121 puede reemplazarse por un aminoácido neutro, por ejemplo por Ser o Gly. Los dominios segundo y tercero de CD40L solubles (iii) y (v) tienen una secuencia N-terminal acortada que comienza preferiblemente con el aminoácido Gln120 o Ile122 de CD40L humano y en la que Gln121 puede reemplazarse por otro aminoácido, por ejemplo Ser o Gly.

Preferiblemente, la secuencia N-terminal de los dominios de CD40L solubles (iii) y (v) se selecciona de:

50 (a) Gln121 o Ile122

(b) (Gly/Ser) 121.

El dominio de CD40L soluble termina preferiblemente con el aminoácido Leu261 de CD40L humano. En determinadas realizaciones, el dominio de CD40L puede comprender mutaciones internas tal como se describió anteriormente.

60 Los componentes (ii) y (iv) de la proteína agonista de receptor CD40 son elementos de ligador peptídico ubicados entre los componentes (i) y (iii) o (iii) y (v), respectivamente. Los elementos de ligador flexible tienen una longitud de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos. Los elementos de ligador son preferiblemente ligadores de glicina/serina, es decir, ligadores peptídicos que consisten sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. En casos en los que el dominio de citocina soluble comienza con S o G (extremo N-terminal), el ligador termina antes de esta S o G. Debe indicarse que no es necesario que el ligador (ii) y ligador (iv) tengan la misma longitud. Con el fin de disminuir la posible inmunogenicidad, puede preferirse usar ligadores más cortos. Además, resultó que ligadores más cortos conducen a moléculas de cadena sencilla con tendencia reducida a formar agregados. Mientras que ligadores que son sustancialmente más largos que los dados a conocer en el presente documento pueden presentar propiedades de agregación desfavorables.

Si se desea, el ligador puede comprender un residuo de asparagina que puede formar un sitio de glicosilación Asn-Xaa-Ser. En determinadas realizaciones, uno de los ligadores, por ejemplo el ligador (ii) o ligador (iv) comprende un sitio de glicosilación. En otras realizaciones, ambos ligadores (iv) comprenden sitios de glicosilación. Con el fin de aumentar la solubilidad de las proteínas agonistas de CD40L y/o con el fin de reducir la posible inmunogenicidad, puede preferirse que el ligador (ii) o ligador (iv) o comprendan ambos un sitio de glicosilación.

En la tabla 2 se muestran secuencias de ligador preferidas. Un ligador preferido es GSGSGNGS (SEQ ID NO: 2).

**Tabla 2: Secuencias de ligador de ejemplo**

| SEQ ID NO | Secuencia |
|-----------|-----------|
| 2         | GSGSGNGS  |
| 3         | GSGSGSGS  |
| 4         | GSGSGSGG  |
| 5         | GGSGSG    |
| 6         | GGSG      |
| 7         | GGSGNGSG  |
| 8         | GGNGSGSG  |
| 9         | GGNGSG    |
| 10        | GSGSGS    |
| 11        | GSGS      |
| 12        | GSG       |

La proteína agonista de receptor CD40 comprende adicionalmente un fragmento Fc de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 13 o 14 o los aminoácidos 1-217 de SEQ ID NO: 13 o 14 que se ubica C-terminal con respecto al tercer dominio de CD40L (v). Preferiblemente, el dominio de fragmento Fc de anticuerpo comprende una capacidad reducida para interaccionar con receptores Fc-gamma-R *in vivo*. En la tabla 3 se muestran dominios de fragmento Fc de ejemplo.

**Tabla 3: Ejemplos de dominios de fragmento Fc**

| SEQ ID NO | Secuencia  |
|-----------|--|
| 13        | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL<br>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 14        | PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK<br>CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT<br>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT<br>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |

El número total de sitios de glicosilación y la posición individual de los hidratos de carbono en tres dimensiones tiene un impacto sobre la estabilidad *in vivo* de proteínas agonistas de receptor CD40. Además, el reconocimiento de hidratos de carbono depende de la densidad local de los sacáridos terminales, la ramificación del árbol de hidratos de carbono y la posición relativa de la materia de hidratos de carbono.

Es necesario el agotamiento de los hidratos de carbono de dominios CH2 con el fin de evitar la reticulación basada en receptor de Fc *in vivo* y la posible toxicidad basada en la superagrupación de receptor de CD40L. Además, los hidratos de carbono parcialmente degradados reducen la semivida *in vivo* de proteínas agonistas de receptor CD40 a través de mecanismos dirigidos por lectinas. Al reducir el número total de sitios de glicosilación en la molécula, el compuesto resultante es menos accesible a estos mecanismos, aumentando la semivida. Por consiguiente, en una realización, el número global de sitios de glicosilación en las proteínas agonistas de receptor CD40 de la presente invención se redujo a través del agotamiento de sitios de glicosilación de CH2, dando como resultado proteínas

agonistas de receptor CD40 que comprenden mutaciones equivalentes a N297S de SEQ ID NO: 15 (PROTEÍNA A) (según el sistema de numeración de EU) creando dominios de aglicosil-CH2.

5 Los sitios de glicosilación de CH2 presentes en las áreas de superficie interna protegen normalmente el subdominio de proteasas durante los "tránsitos de conformación de Fc abierta" en los que se reducen enlaces disulfuro intercatenarios de la bisagra y la unión intercatenaria covalente se rompe (figura 10). Esto permite la disociación de CH2 y la exposición del área de superficie interna hacia proteasas.

10 Las proteínas agonistas de receptor CD40 que comprenden una mutación equivalente a N297S de SEQ ID NO: 15 (PROTEÍNA A) (según el sistema de numeración EU) creando un aglicosil-CH2 es por tanto probable que sean menos proteolíticamente estables que estructuras equivalentes con glicosilación de CH2 silvestre. Esto tendría un impacto sobre la estabilidad del compuesto durante USP/DSP/almacenamiento, donde están presentes proteasas de la célula huésped y tienen acceso a largo plazo a la estructura. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el agonista de receptor CD40 carece de sitios de glicosilación de CH2, pero comprende sitios de glicosilación en las secuencias de ligador de cada cadena polipeptídica (por ejemplo, GSGSGNGS, SEQ ID NO: 2). En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, el agonista de receptor CD40 comprende cinco sitios de glicosilación por cadena polipeptídica, para un total de diez sitios de glicosilación en un dímero.

20 Según la invención, el dominio de fragmento Fc de anticuerpo se fusiona por medio de una bisagra-ligador de una cualquiera de SEQ ID NO 16 y 19-24. El elemento de bisagra-ligador comprende la secuencia de región bisagra de una inmunoglobulina, en el presente documento denominada "región bisagra de Ig". El término "región bisagra de Ig" significa cualquier polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte identidad o similitud de secuencia con una porción de una secuencia de región bisagra de Ig que se produce de manera natural que incluye los residuos de cisteína a los que los enlaces disulfuro unen las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

25 Pueden obtenerse derivados y análogos de la región bisagra mediante mutaciones. Un derivado o análogo tal como se le hace referencia en el presente documento es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte identidad o similitud de secuencia con la secuencia de longitud completa de la proteína silvestre (o que se produce de manera natural) excepto porque tiene una o más diferencias de secuencia de aminoácidos atribuibles a una deleción, inserción y/o sustitución. El número de moléculas con conformación de Fc abierta en una proteína agonista de receptor CD40 individual depende del número de enlaces disulfuro intercatenarios presentes en la región de bisagra. Por consiguiente, en una realización, se introdujo una tercera cisteína en la región bisagra de las proteínas agonistas de receptor CD40 de la presente invención con el fin de mejorar el efecto del agotamiento de los sitios de glicosilación de CH2.

35 La conectividad de disulfuros intercatenarios de la región bisagra que estabilizan el homodímero de la proteína agonista de receptor CD40 hexavalente también se verá afectada por los grupos tioles libres de las subsecuencias de CD40L (seis en total por dímero). Esto también conduce a la conformación de FC abierta anteriormente mencionada debido a la autorreducción de los puentes disulfuro de la bisagra de la estructura por los tioles libres endógenos de la preparación. En consecuencia, se espera que proteínas de fusión de CD40L-FC de cadena sencilla que comprenden seis tioles libres sean menos estables durante la fabricación y el almacenamiento, cuando se produce exposición a largo plazo a oxígeno y proteasas.

45 Por tanto, para permitir fabricar un agonista de receptor CD40 hexavalente, el residuo C194 se muta preferiblemente a un aminoácido diferente sin afectar a la unión al receptor.

50 Además, las proteínas agonistas de receptor CD40 de la invención comprenden adicionalmente una mutación de la lisina de la bisagra superior a una glicina para reducir el procesamiento proteolítico en este sitio. Por consiguiente, en una realización, las proteínas agonistas de receptor CD40 de la invención comprenden adicionalmente una mutación de la lisina de la bisagra superior (K223, según el sistema de numeración EU) a una glicina para reducir el procesamiento proteolítico en este sitio, potenciando de ese modo la estabilidad global de la proteína de fusión. La combinación de la introducción anteriormente mencionada de una tercera cisteína (C225, según el sistema de numeración EU) con la mutación de la lisina anteriormente mencionada a glicina (K223G, según el sistema de numeración EU) dentro de la región bisagra da como resultado una proteína agonista de receptor CD40 estabilizada globalmente de la presente invención.

60 Un elemento de bisagra-ligador particularmente preferido consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 (tabla 4), que incluye la cisteína C225 anteriormente mencionada y la mutación de lisina a glicina K223G.

65 La proteína agonista de receptor CD40 puede comprender adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, que permite el procesamiento, por ejemplo secreción extracelular, en una célula huésped adecuada. Preferiblemente, el dominio de péptido señal N-terminal comprende un sitio de escisión de proteasa, por ejemplo un sitio de escisión de peptidasa señal y por tanto puede eliminarse después de o durante la expresión para obtener la proteína madura. Un dominio de péptido señal N-terminal particularmente preferido comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 17 (tabla 4).

Además, la proteína agonista de receptor CD40 puede comprender adicionalmente un elemento C-terminal, que tiene una longitud de, por ejemplo, 1-50, preferiblemente 10-30 aminoácidos que puede incluir o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación, por ejemplo un dominio FLAG, una etiqueta de estrep. o dominio de etiqueta de estrep. II y/o un dominio de poli-His. Según una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende una etiqueta de estrep. fusionada al extremo C-terminal por medio de un ligador de serina corto tal como se muestra en SEQ ID NO: 18 (tabla 4).

El elemento de bisagra-ligador según la invención (SEQ ID NO: 16, 19-24), un dominio de péptido señal N-terminal a modo de ejemplo (SEQ ID NO: 17) y un ligador de serina-etiqueta de estrep. a modo de ejemplo (SEQ ID NO: 18) se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4: Dominios y ligadores a modo de ejemplo**

| SEQ ID NO | Secuencia              |
|-----------|------------------------|
| 16        | GSGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC |
| 17        | METDTLLVFLLVWVPAGNG    |
| 18        | SSSSSSAWSHQPFEK        |
| 19        | GSGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC |
| 20        | GSGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC |
| 21        | GSGSSSSSGSCDKTHTCPPC   |
| 22        | GSGSSSGSCDKTHTCPPC     |
| 23        | GSGSSSGSCDKTHTCPPCGS   |
| 24        | GSGSSSGSCDKTHTCPPCGSGS |

En una realización de la invención, el polipéptido de fusión comprende tres dominios de CD40L solubles fusionados mediante elementos de ligador peptídico de SEQ ID NO: 2. El primer dominio de CD40L soluble (i) consiste en los aminoácidos 121-261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1 y los dominios de CD40L solubles (iii) y (v) consisten en los aminoácidos 121-261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1.

Adicionalmente, el polipéptido de fusión comprende un dominio de fragmento Fc de anticuerpo según SEQ ID NO: 13 que se fusiona de manera C-terminal al dominio de CD40L soluble (v) por medio de una bisagra-ligador según SEQ ID NO: 16. Los inventores encontraron sorprendentemente que este polipéptido de fusión particular proporciona actividad biológica mejorada y es particularmente estable. La secuencia de aminoácidos de una realización a modo de ejemplo de una proteína agonista de receptor CD40 de la invención se expone en SEQ ID NO: 27.

Además, el polipéptido de fusión puede comprender un dominio de péptido señal N-terminal, por ejemplo, según SEQ ID NO: 17. Un ejemplo específico de una proteína agonista de receptor CD40 de la invención se muestra en SEQ ID NO: 25.

Según otra realización preferida, el polipéptido de fusión puede comprender adicionalmente una etiqueta de estrep. C-terminal que se fusiona al polipéptido de la invención por medio de un ligador de serina corto tal como se muestra en SEQ ID NO: 18. Según este aspecto de la invención, el fragmento Fc consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 13 o 14. Además, el fragmento Fc puede consistir en un fragmento Fc más corto, que incluye por ejemplo los aminoácidos 1-217 de SEQ ID NO: 13. Se muestran ejemplos particularmente preferidos de polipéptidos de fusión que comprenden una etiqueta de estrep. C-terminal en SEQ ID NO: 15 (PROTEÍNA A).

Las proteínas agonistas de receptor CD40 a modo de ejemplo tal como se muestran en SEQ ID NO: 15, 25 y 26 comprenden cada una un dominio de péptido señal N-terminal. El dominio de péptido señal incluye los aminoácidos 1-20. En cada caso, la proteína madura comienza con el aminoácido 21. Se exponen proteínas agonistas de receptor CD40 a modo de ejemplo maduras (sin un péptido señal) de la presente invención en SEQ ID NO: 27-30, 32 y 34. Se muestran proteínas agonistas de receptor CD40 a modo de ejemplo descritas anteriormente en la tabla 5.

Según una realización de la invención, el dominio de polipéptido de fusión de CD40L de cadena sencilla comprende tres dominios de CD40L solubles fusionados mediante elementos de ligador peptídico de SEQ ID NO: 2. Los dominios de CD40L solubles (i), (iii) y (v) consisten cada uno en los aminoácidos 121-261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1 con la mutación C194S. Este polipéptido de CD40L de cadena sencilla que comprende las muteínas C194S de CD40L 121-261 mencionadas anteriormente se muestra en SEQ ID: 36, que es muy adecuado para generar proteínas de fusión en el extremo o bien N- o bien C-terminal con estabilidad potenciada en comparación con las silvestres. En una realización preferida, un dominio de fragmento Fc de anticuerpo según SEQ ID NO: 13 se fusiona de manera C-terminal al dominio de CD40L soluble (v) de SEQ ID: 36 por medio de una bisagra-ligador según SEQ ID NO: 16.

El agonista de receptor CD40 tal como se expone en SEQ ID NO: 27 tiene un número total reducido de sitios de glicosilación (la mutación N297S en la región CH2 que proporciona un dominio CH2 aglicosilado), un número aumentado de enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra y la mutación de una lisina de la bisagra superior a una glicina. Estas alteraciones proporcionan una disminución en la posible degradación y superagrupación del receptor de CD40L (junto con toxicidad concomitante). En algunas realizaciones, la glutamina N-terminal se modifica a piroglutamato (Liu *et al.* 2011, J. Biol. Chem. 286:11211-11217).

**Tabla 5: Proteínas agonistas de receptor CD40 a modo de ejemplo**

| SEQ ID NO  | Secuencia   |
|--|---|
| <p>25<br/>PROTEÍNA A sin etiqueta de estrep.</p> | <p>METDTLLVFVLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/>                     YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/>                     ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/>                     SVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEAS<br/>                     SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/>                     TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/>                     QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSG<br/>                     SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/>                     QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL<br/>                     LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSH<br/>                     GTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP<br/>                     SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br/>                     EVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br/>                     KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br/>                     GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br/>                     SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>15<br/>PROTEÍNA A</p>                         | <p>METDTLLVFVLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/>                     YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/>                     ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/>                     SVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEAS<br/>                     SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/>                     TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/>                     QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSG<br/>                     SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/>                     QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL<br/>                     LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSH</p>   |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>GTGFTSFGLLKLGS GSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGP<br/> SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br/> EVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br/> KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br/> GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br/> SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSH<br/> PQFEK</p>   |
| <p>26<br/> CD40L-wt + SEQ14 (FC)</p>                                       | <p>METDTLLV FVLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/> YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/> ASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/> SVFVNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEAS<br/> SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/> TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/> QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKLGS G<br/> SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/> QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERIL<br/> LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSH<br/> GTGFTSFGLLKLGS GSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPS<br/> VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br/> VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br/> GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG<br/> FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br/> RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>27<br/> CD40L-wt+SEQ13(FC)<br/> sin SP sin etiqueta de<br/> estrep.</p> | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/> QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT<br/> HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHGTGFTS<br/> FGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/> NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCL<br/> KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVN<br/> VTDP SQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTTS<br/> VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/> REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL<br/> GGVFELQPGASVFVNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSSSSS<br/> SSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</p>   |

|           |   |
|-----------|---|
|           | <p>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRV<br/> VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br/> VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN<br/> HYTQKSLSLSPGK</p>  |
| <p>28</p> | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/> QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT<br/> HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTS<br/> FGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/> NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCL<br/> KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/> VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/> VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/> REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL<br/> GGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSSSSS<br/> SSSGCDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br/> TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRV<br/> VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br/> VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN<br/> HYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK</p> |
| <p>29</p> | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/> QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT<br/> HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTS<br/> FGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/> NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCL<br/> KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/> VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/> VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/> REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL<br/> GGVFELQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKLGS GSSSSS<br/> SSSGCDKTHTCPPEAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/> CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br/> SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ<br/> VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/> KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN<br/> HYTQKSLSLSPGK</p>             |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <p>30</p>                         | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/>         QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANT<br/>         HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTS<br/>         FGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/>         NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCL<br/>         KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/>         VTDPSQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/>         VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/>         REASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHL<br/>         GGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSS<br/>         SSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/>         CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br/>         SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ<br/>         VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br/>         KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN<br/>         HYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK</p>                                    |
| <p>31<br/>         PROTEÍNA B</p> | <p>METDTLLVFLVLLVWPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/>         YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/>         ASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/>         SVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEAS<br/>         SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/>         TFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/>         QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSG<br/>         SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/>         QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERIL<br/>         LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSH<br/>         GTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGP<br/>         SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br/>         VEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br/>         KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br/>         GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK<br/>         SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSH<br/>         PQFEK</p> |

|  |  |
|--|--|
| <p>32<br/>PROTEÍNA B sin SP</p>                      | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/>         QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANT<br/>         HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTS<br/>         FGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/>         NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSL<br/>         KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/>         VTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/>         VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/>         REASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG<br/>         GVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSS<br/>         SSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/>         CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVV<br/>         SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br/>         YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br/>         TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNNH<br/>         YTQKLSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK</p>         |
| <p>33<br/>PROTEÍNA B sin etiqueta<br/>de estrep.</p> | <p>METDTLLVFLVLLVWPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/>         YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/>         ASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/>         SVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEAS<br/>         SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/>         TFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/>         QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLLKLGSG<br/>         SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/>         QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERIL<br/>         LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSH<br/>         GTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGP<br/>         SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br/>         VEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br/>         KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br/>         GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br/>         SRWQQGNVDFSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK</p> |

|   |  |
|---|--|
| <p>34<br/>PROTEÍNA B sin SP sin<br/>etiqueta de estrep.</p> | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/>         QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANT<br/>         HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSSQVSHGTGFTS<br/>         FGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/>         NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSL<br/>         KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/>         VTDPSSQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/>         VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/>         REASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG<br/>         GVFELQPGASVFNVTDPSSQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSS<br/>         SSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/>         CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVV<br/>         SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br/>         YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br/>         TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNH<br/>         YTQKSLSLSPGK</p>  |
| <p>35<br/>PROTEÍNA C</p>                                    | <p>METDTLLVVFLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br/>         YTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFI<br/>         ASLALKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGA<br/>         SVFNVTDPSSQVSHGTGFTSFGLLLKLGSGSGNGSQIAAHVISEAS<br/>         SKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV<br/>         TFCSNREASSQAPFIASLALKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ<br/>         QSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSSQVSHGTGFTSFGLLLKLGSG<br/>         SGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGK<br/>         QLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLALKSPGRFERIL<br/>         LRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSSQVSH<br/>         GTGFTSFGLLLKLGSGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGP<br/>         SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br/>         VEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br/>         KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK<br/>         GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br/>         SRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSH<br/>         PQFEK</p> |

|    |   |
|----|---|
| 36 | <p>QIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKR<br/>         QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANT<br/>         HSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTS<br/>         FGLLKLGSNGSGNGSQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSN<br/>         NLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLSL<br/>         KSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN<br/>         VTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGSNGSGNGSQIAAHVISEASSKTT<br/>         VLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSN<br/>         REASSQAPFIASLSLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLG<br/>         VVFELQPGASVFNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL</p> |
|----|---|

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína agonista de receptor CD40 tal como se describe en el presente documento. 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 para la proteína agonista de receptor CD40 o un precursor de la misma, por ejemplo una pro- o pre-proforma de la proteína agonista de receptor CD40 que puede comprender una secuencia señal u otras porciones de aminoácidos heterólogos para la secreción o purificación que se ubican preferiblemente en el extremo N- y/o C-terminal de la proteína agonista de receptor CD40. Las porciones de aminoácidos heterólogos pueden unirse al primer y/o segundo dominio por medio de un sitio de escisión de proteasa, por ejemplo un sitio de escisión de proteasa de factor X3, trombina o IgA. Un ejemplo específico de una secuencia de ácido nucleico de la invención se muestra en la tabla 6 como SEQ ID NO: 37. Esta molécula de ácido nucleico codifica para el polipéptido de fusión de SEQ ID NO: 25.

15 **Tabla 6: Secuencia de ácido nucleico de proteína agonista de receptor CD40 a modo de ejemplo**

| SEQ ID NO | Secuencia   |
|-----------|---|
| 37        | <p>AAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATAGCCGCCACCATGGAGACT<br/>           GACACCCTGCTGGTGTTCGTGCTGCTGGTCTGGGTGCCTGCAG</p> |

GAAATGGACAGATCGCAGCTCATGTGATAAGTGAGGCAAGCTC  
 GAAGACGACTAGCGTATTGCAGTGGGCAGAGAAGGGGTTACTAC  
 ACCATGTCCAACAACCTCGTCACGCTGGAGAACGGCAAACAGC  
 TCACCGTCAAGCGACAGGGCCTGTACTACATCTACGCACAAGT  
 CACCTTCTGTTCTAACCGAGAGGCTTCCAGTCAAGCACCCCTTCA  
 TTGCTTCCCTGTGCCTGAAATCCCCTGGTCGATTGAGAGGATA  
 CTGCTCAGGGCAGCTAACACTCACTCCAGTGCTAAGCCTTGCG  
 GTCAGCAGAGTATCCACCTCGGCGGCGTATTGAGCTGCAACC  
 AGGAGCTTCCGTCTTTGTGAACGTGACTGACCCTTCTCAAGTCT  
 CTCACGGAACAGGATTCACCTCTTTCGGGCTCCTAAAGCTGGG  
 TTCCGGAAGCGGTAATGGTAGTCAAATCGCTGCCCATGTAATTT  
 CCGAGGCTTCGTCAAAGACTACGTCTGTTCTACAATGGGCCGA  
 GAAAGGCTACTATACCATGTCAAATAATCTCGTCACTCTTGAGA  
 ACGGGAAGCAGCTTACCGTTAAACGTGAGGGACTTTACTACATT  
 TATGCCCAAGTCACTTTCTGCTCAAATCGAGAGGCAAGCTCCCA  
 AGCACCGTTCATAGCATCACTCTGCCTCAAGTCCCCTGGAAGG  
 TTTGAACGAATACTACTTAGGGCCGCTAATACACATTCGAGTGC  
 AAAGCCTTGCGGACAGCAAAGCATTCAATTTAGGTGGAGTCTTCG  
 AGCTTCAACCAGGAGCCTCTGTATTCGTCAACGTAACGGACCC  
 ATCGCAAGTATCCCACGGCACTGGTTTCACCTCATTGCGTTTGC  
 TGAAGTTAGGAAGCGGCAGTGGAAACGGTTCCTCAAATAGCTGC  
 CCATGTCATCTCGGAAGCCTCAAGCAAGACGACAAGTGTCTTG  
 CAATGGGCCGAAAAGGGTTATTATACTATGTCTAATAACCTAGT  
 GACCCTAGAGAACGGTAAACAACCTTACTGTTAAGCGCCAGGGA  
 CTTTATTATATATATGCTCAGGTAACATTCTGCTCGAATCGGGAA  
 GCATCTTCACAGGCTCCTTTTATCGCTAGTTTATGTCTGAAGAG  
 CCCCAGGACGATTTGAGAGGATATTGCTTAGAGCCGCGAATACA  
 CACAGTTCAGCCAAACCTTGTGGACAACAGAGTATTCACTTAGG  
 TGCGGTGTTTGAATTACAACCAGGGGCATCAGTGTTGTAACG  
 TAACAGATCCCAGTCAGGTCTCGCACGGGACGGGATTTACTTC  
 CTTTGGTTTGTGAAATTAGGCTCGGGATCCTCGAGTTCATCGT  
 CCTCATCCGGCTCATGTGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTG  
 TCCTGCCCTGAGCTGCTGGGCGGACCTTCTGTGTTCCCTGTTT  
 CCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCTG

|  |  |
|--|--|
|  | <p>AGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAAGATCCCGA<br/> GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAAC<br/> GCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAGCTCCACCTACC<br/> GGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAA<br/> CGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCT<br/> GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTC<br/> GGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCTAGCAGGGAGGAGA<br/> TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTT<br/> CTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAG<br/> CCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCTCCTGTGCTGGACTCTG<br/> ACGGCTCCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTC<br/> CAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCAC<br/> GAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAAGTCCCTGTCTCTGA<br/> GTCCGGGCAATAATAGGCGCGCC</p> |
|--|--|

- La molécula de ácido nucleico puede unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión, por ejemplo una secuencia de control de la expresión que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula huésped deseada. La molécula de ácido nucleico puede ubicarse en un vector, por ejemplo un plásmido, un bacteriófago, un vector viral, un vector de integración cromosómica, etc. Se describen ejemplos de secuencias de control de la expresión y vectores adecuados 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.
- 5 Pueden usarse diversos sistemas de vector de expresión/célula huésped para expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas agonistas de receptor CD40 de la presente invención. Las células huésped adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células procariontas tales como bacterias, por ejemplo *E. coli*, células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células vegetales o células animales, preferiblemente células de mamífero y, más preferiblemente, células humanas. Además, la invención se refiere a un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico tal como se describió anteriormente. Tales organismos transgénicos pueden generarse mediante métodos conocidos de transferencia genética incluyendo recombinación homóloga.
- 10 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 de receptor CD40, un ácido nucleico respectivo que codifica para la misma, o una célula transformada o transfectada, todo tal como se describe en el presente documento.
- 15 El término “enfermedad o trastorno asociado a CD40L” tal como se usa en el presente documento es cualquier enfermedad o trastorno que pueda mejorarse mediante la adición de un agonista de receptor CD40. Al menos una proteína agonista de receptor CD40, un ácido nucleico respectivo que codifica para la misma, o una célula transformada o transfectada, todo tal como se describe en el presente documento, puede usarse en terapia, por ejemplo, en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos provocados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de CD40L, particularmente trastornos proliferativos, tales como tumores, por ejemplo tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades metabólicas; trastornos autoinmunitarios, por ejemplo enfermedades reumatóides y/o artríticas; enfermedades degenerativas, por ejemplo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a apoptosis o rechazos de trasplantes.
- 20 El término “disfunción de CD40L” tal como se usa en el presente documento ha de entenderse como cualquier función o expresión de CD40L que se desvía de la función o expresión normal de CD40L, por ejemplo, sobreexpresión de la proteína o el gen de CD40L, expresión reducida o suprimida de la proteína o el gen de CD40L en comparación con el nivel de expresión fisiológica normal de CD40L, actividad aumentada de CD40L, actividad reducida o suprimida de CD40L, unión aumentada de CD40L a cualquier pareja de unión, por ejemplo, a un receptor, particularmente un receptor de CD40L u otra molécula de citocina, unión reducida o suprimida a cualquier
- 25
- 30
- 35
- 40

pareja de unión, por ejemplo a un receptor, particularmente un receptor de CD40L u otra molécula de citocina, en comparación con la unión o actividad fisiológica normal de CD40L. El presente documento también describe un método para diagnosticar y/o tratar a un sujeto humano que padece un trastorno que puede diagnosticarse y/o tratarse seleccionando como diana receptores de CD40L que comprende administrar al sujeto humano una proteína agonista de receptor CD40 dada a conocer en el presente documento de manera que el efecto sobre la actividad de la diana, o dianas, en el sujeto humano es agonista, se alivian uno o más síntomas y/o se logra el tratamiento. Las proteínas agonistas de receptor CD40 proporcionadas en el presente documento pueden usarse para diagnosticar y/o tratar a seres humanos que padecen cánceres primarios y metastásicos, incluyendo carcinomas de mama, colon, recto, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas "SCLC" y cáncer de pulmón de células no pequeñas "NSCLC"), orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario (incluyendo riñón, vejiga y urotelio), tracto genital femenino (incluyendo cuello uterino, útero y ovarios así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluyendo el tiroides, glándulas suprarrenales e hipófisis) y piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluyendo los que surgen de hueso y tejidos blandos así como sarcoma de Kaposi), tumores del cerebro, nervios, ojos y meninges (incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, schwannomas y meningiomas), tumores que surgen de tumores malignos hematopoyéticos, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma de células B, linfoma de Burkitt, leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), tricoleucemia, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, DLBCL, linfomas foliculares, tumores malignos hematopoyéticos, sarcoma de Kaposi, linfoma maligno, histiocitosis maligna, melanoma maligno, mieloma múltiple, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de tumor maligno, o tumores sólidos.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista de receptor CD40 dada a conocer en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico, un agente quimioterápico; un agente de obtención de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de cinasa (incluyendo pero sin limitarse a un inhibidor de KDR y TIE-2), un modulador de molécula de coestimulación o un inhibidor de punto de control inmunitario (incluyendo pero sin limitarse a 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 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, pero sin limitarse a, 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 para receptores de tipo Toll (incluyendo pero sin limitarse a 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 bloqueante de molécula de adhesión (incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo anti-LFA-1, un anticuerpo anti-selectina E/L, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anti-citocina o fragmento funcional del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, un anticuerpo anti-IL-18, uno anti-TNF o uno anti-IL-6/receptor de citocina), una citotoxicidad de célula T o célula NK redirigida biespecífica (incluyendo pero sin limitarse a un BiTE®), una terapia basada en receptores de células T quiméricas (CAR-T), una terapia basada en receptores de células T (TCR), una vacuna terapéutica contra el cáncer, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, un indicador o marcador detectable, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante 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 reemplazo hormonal, un producto radiofarmacéutico, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento 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 de los tumores descritos en el presente documento, la(s) proteína(s) agonista(s) de receptor CD40 puede(n) usarse sola(s) o en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un agente quimioterápico, radioterápico o biológico. El agente puede incluir los siguientes: ácido 13-cis-retinoico; 2-CdA; 2-clorodesoxiadenosina; 5-azacitidina; 5-fluorouracilo; 5-FU; 6-mercaptopurina; 6-MP; 6-TG; 6-tioguanina; Abraxane; Accutane®; actinomicina-D; Adriamycin®; Aducril®; Afinitor®; Agrilin®; Ala-Cort®; aldesleucina; alemtuzumab; ALIMTA; alitretinoína; Alkaban-AQ®; Alqueran®; ácido todo-transretinoico; interferón alfa; altretamina; ametopterina; amifostina; aminoglutetimida; anagrelida; Anadron®; anastrozol; arabinosilicósina; Ara-C Aranesp®; Aredia®; Arimidex®; Aromasin®; Arranon®; trióxido de arsénico; Arzerra™; asparaginasa; ATRA; Avastin®; azacitidina; BCG; BCNU; bendamustina; bevacizumab; bexaroteno; BEXXAR®; bicalutamida; BiCNU; Bleinoxane®; bleomicina; bortezomib; busulfano; Busulfex®; C225; leucovorina cálcica; Campath®; Camptosar®; camptotecina-11; capecitabina Carac™; carboplatino; carmustina; oblea de carmustina; Casodex®; CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine®; cetuximab; clorambucilo; cisplatino; factor citrovorum; cladribina; cortisona; Cosmegen®; CPT-11; ciclofosfamida; Cytadren®; citarabina; citarabina liposomal; Cytosar-U®; Cytoxan®; dacarbazina; dacogen; dactinomicina; darbeopetina alfa; dasatinib; daunomicina; daunorubicina; clorhidrato de daunorubicina; daunorubicina liposomal; DaunoXome®; decadron; decitabina; Delta-Cortef®; Deltasone®; denileucina; diftix; DepoCyt™; dexametasona; acetato de dexametasona;

fosfato sódico de dexametasona; dexasona; dexrazoxano; DHAD; DIC; diodex; docetaxel; Doxil®; doxorubicina; doxorubicina liposomal; Droxia™; DTIC; DTIC-Dome®; Duralone®; duvelisib; Efudex®; Eligard™; Ellence™; Eloxatin™; Elspar®; Emcyt®; epirubicina; epoetina alfa; erbitux; erlotinib; L-asparaginasa de *Erwinia*; estramustina; Etyol Etopophos®; etopósido; fosfato de etopósido; Eulexin®; everolímús; Evista®; exemestano; Fareston®; Faslodex®; Femara®; filgrastim; floxuridina; Fludara®; fludarabina; Fluoroplex®; fluorouracilo; fluorouracilo (crema); fluoximesterona; flutamida; ácido folínico; FUDR®; fulvestrant; gefitinib; gemcitabina; gemtuzumab ozogamicina; Gemzar; Gleevec™; oblea de Gliadel®; GM-CSF; goserelina; factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (G-MCSF); Halotestin®; Herceptin®; hexadrol; Hexalen®; hexametilmelamina; HMM; Hycamtin®; Hydrea®; Hidrocort Acetate®; Hidrocortisona; fosfato sódico de hidrocortisona; succinato sódico de hidrocortisona; fosfato de hidrocortona; hidroxiurea; ibrutinib; ibritumomab; ibritumomab tiuxetano; Idamycin®; idarubicina Ifex®; interferón alfa; interferón alfa-2b (conjugado de PEG); ifosfamida; interleucina-11 (IL-11); interleucina-2 (IL-2); mesilato de imatinib; imidazol carboxamida; Intron A®; ipilimumab, Iressa®; irinotecán; isotretinoína; ixabepilona; Ixempra™; KADCYCLA®; kidrolasa (t) Lanacort®; lapatinib; L-asparaginasa; LCR; lenalidomida; letrozol; leucovorina; Leukeran; Leukine™; leuprolida; leurocortina; Leustatin™; lirilumab; Ara-C liposomal; Pred® líquido; 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 sódico; metilprednisolona; Meticorten®; mitomicina; mitomicina-C; mitoxantrona M-Prednisol®; MTC; MTX; Mustargen®; mustina; Mutamycin®; Mileran®; Milocel™; Milotarg®; 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™; oprelvequina; 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; Platinol®; Platinol-AQ®; prednisolona; prednisona; Prelone®; procarbazona; PROCIT®; Proleukin®; prolifeprosperan 20 con implante de carmustina; Purinetol®; inhibidores de BRAF; raloxifeno; Revlimid®; Rheumatrex®; Rituxan®; rituximab; Roferon-A®; romiplostim; Rubex®; clorhidrato de rubidomicina; Sandostatin®; Sandostatin LAR®; sargramostim; Solu-Cortef®; Solu-Medrol®; sorafenib; SPRYCEL™; STI-571; STIVAGRA™, estrepto-zocina; SU11248; sunitinib; Sutent®; tamoxifeno Tarceva®; Targretin®; Tassigna®; Taxol®; Taxotere®; Temodar®; temozolomida temsirolímús; tenipósido; TESPAs; talidomida; Thalomid®; TheraCys®; tioguanina; tioguanina Tabloid®; tiofosfoamida; Tioplex®; tiotepa; TICE®; Toposar®; topotecan; 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®; Xeloda®; Zanosar®; Zevalin™; Zinecard®; Zoladex®; ácido zoledrónico; Zolinza; o Zometa®, y/o cualquier otro agente no específicamente enumerado en el presente documento que seleccione como diana rutas similares.

Cuando dos o más sustancias o principios van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse por medio de la misma vía de administración o por medio de diferentes vías de administración, en esencialmente el mismo momento o en momentos diferentes (por ejemplo de manera esencialmente simultánea, consecutivamente o según un régimen alternante). Cuando las sustancias o principios van a administrarse simultáneamente por medio de la misma vía de administración, pueden administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, tal como quedará claro para el experto.

Además, cuando dos o más sustancias o principios activos van a usarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios puede administrarse en la misma cantidad y según el mismo régimen tal como se usa cuando el compuesto o principio se usa individualmente, y tal uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de los dos o más principios o sustancias activos conduce a un efecto sinérgico, puede ser posible también reducir la cantidad de uno, más de uno, o de todos de los principios o sustancias que van a administrarse, al tiempo que todavía se logra la acción terapéutica deseada. Esto, por ejemplo, puede ser útil para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado que esté asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, al tiempo que todavía se obtiene el efecto terapéutico o farmacéutico deseado.

La eficacia del régimen de tratamiento puede determinarse y/o seguirse de cualquier manera conocida *per se* para la enfermedad o trastorno implicado, tal como quedará claro para el médico. El médico también será capaz, cuando sea apropiado y en una base caso a caso, de cambiar o modificar un régimen de tratamiento particular, para lograr el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados y/o para lograr un equilibrio apropiado entre el logro del efecto terapéutico deseado por un lado y evitar, limitar o reducir efectos secundarios no deseados por otro lado.

Generalmente, el régimen de tratamiento se seguirá hasta que se logra el efecto terapéutico deseado y/o durante tanto tiempo como tenga que mantenerse el efecto terapéutico deseado. De nuevo, esto puede determinarlo el médico.

En diversas realizaciones, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una o más proteínas agonistas de receptor CD40, o bien solas o bien en combinación con agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos de los usos de las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento incluyen diagnóstico, detección y/o monitorización de un trastorno, prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. La formulación de composiciones farmacéuticas, o bien solas o bien en combinación con agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o portadores farmacéuticamente aceptables la conoce un experto en la técnica (publicación de patente estadounidense n.º 20090311253 A1).

En diversas realizaciones, una formulación farmacéutica puede comprender uno o más aminoácidos, uno o más polisacáridos y/o polisorbato, y una proteína agonista de receptor CD40 presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/ml, incluyendo los puntos finales (por ejemplo, 0,1-10, 1-10, 0,01-50, 1-50, 1-100, 10-100, 25-100, 25-50 o 50-100 mg/ml), en donde la formulación está a un pH de entre aproximadamente 5,0 y 7,0, incluyendo los puntos finales (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 el 0-8,0% peso/volumen (p/v). En una realización, el polisorbato en la formulación es polisorbato 80 y está a una concentración de aproximadamente el 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 el 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 de receptor CD40 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 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).

Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad eficaz" significa una cantidad de proteína agonista de CD40L que da como resultado una mejora detectable (por ejemplo, de al menos aproximadamente el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75% o más con respecto al nivel inicial) en uno o más parámetros asociados con una disfunción de CD40L o con una enfermedad o trastorno asociado a CD40L.

En diversas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, una formulación liofilizada o una formulación liofilizada y rehidratada. En una realización, la disolución hidratante es dextrosa y/o solución salina (por ejemplo, dextrosa a una concentración de aproximadamente el 5% p/v y/o la solución salina a una concentración de aproximadamente el 0,9% p/v). En una realización, la formulación farmacéutica comprende histidina aproximadamente 15 mM, polisorbato 80 aproximadamente al 0,03% (p/v), sacarosa aproximadamente al 4% (p/v) y aproximadamente 0,1-25 mg/ml de la proteína agonista de receptor CD40, o aproximadamente 1-15 mg/ml de proteína agonista de receptor CD40, y está a un pH de aproximadamente 6. En una realización, la formulación comprende además al menos un agente adicional.

En diversas realizaciones, una formulación contiene proteína agonista de receptor CD40 aproximadamente 25 mg/ml, histidina aproximadamente 15 mM, polisorbato 80 al 0,03% (peso/volumen, p/v), sacarosa al 4,0% (p/v) y un pH de aproximadamente 6,0. En algunas realizaciones, la formulación no comprende arginina. En algunas realizaciones, la formulación presenta una estabilidad en congelación-descongelación, estabilidad de formulación líquida y/o estabilidad de formulación liofilizada inesperadamente mejoradas, en comparación con otras formulaciones que comprenden otros componentes o concentraciones.

Los métodos de administración de un agente terapéutico proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, administración oral, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, administración mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral) y administración pulmonar (por ejemplo, compuestos aerosolizados administrados con un inhalador o nebulizador). La formulación de composiciones farmacéuticas para vías específicas de administración, y los materiales y técnicas necesarios para los diversos métodos de administración están disponibles y los conoce un experto en la técnica (publicación de patente estadounidense n.º 20090311253 A1).

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 a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Pueden formularse composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. El término "forma unitaria de dosificación"

se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

5 Un intervalo a modo de ejemplo, no limitativo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una proteína agonista de receptor CD40 proporcionada en el presente documento es de 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 entre medias). En algunas realizaciones, la proteína agonista de receptor CD40 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, 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 entre medias). Obsérvese que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y/o la gravedad del estado que va a aliviarse. Ha de entenderse además que, para cualquier sujeto particular, pueden ajustarse regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo según la necesidad individual y/o el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son a modo de ejemplo solo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1: Fabricación de una proteína agonista de receptor CD40

#### 1.1 Estructura del polipéptido

- 25 A) Aminoácidos Met1 - Gly20  
Péptido señal de Ig-Kappa, sitio de escisión de peptidasa señal supuesto después del aminoácido Gly 20.
- 30 B) Aminoácidos Gln21 - Leu161  
Primer dominio de citocina soluble del ligando CD40L humano (CD40L, aminoácidos 121-261 de SEQ ID NO: 1).
- 35 C) Aminoácidos Gly162 - Ser 169  
Primer elemento de ligador peptídico de SEQ ID NO: 2.
- 40 D) Aminoácidos Gln170 - Leu310  
Segundo dominio de citocina soluble del ligando CD40L humano (CD40L, aminoácidos 121-261 de SEQ ID NO: 1).
- 45 E) Aminoácidos Gly311 - Ser318.  
Segundo elemento de ligador peptídico de SEQ ID NO: 2.
- 50 F) Aminoácidos Gln319 - Leu459  
Tercer dominio de citocina soluble del ligando CD40L humano (CD40L, aminoácidos 121-261 de SEQ ID NO: 1).
- 55 G) Aminoácidos Gly460 - Cys482  
Elemento de bisagra-ligador de SEQ ID NO: 16.
- 60 H) Aminoácidos Pro483 - Lys700  
Dominio de fragmento Fc de anticuerpo de SEQ ID NO: 13.
- 65 La proteína agonista del receptor CD40 anterior se muestra en SEQ ID NO: 25.  
Los ligadores indicados pueden reemplazarse por otros ligadores preferidos, por ejemplo tal como se muestra en SEQ ID NO: 3-12.
- El elemento de bisagra-ligador indicado puede reemplazarse por otras bisagras-ligadores preferidos, por ejemplo tal como se muestra en SEQ ID NO: 19 y 20.
- Debe indicarse que los ligadores peptídicos primero y segundo no es necesario que sean idénticos.
- La secuencia del péptido señal (A) puede reemplazarse por cualquier otra adecuada, por ejemplo secuencia de

péptido señal de mamífero.

## 1.2 Casete génico que codifica para el polipéptido

- 5 El gen sintético puede optimizarse en vista de su uso de codones para la expresión en células huésped adecuadas, por ejemplo células de insectos o células de mamíferos. Una secuencia de ácido nucleico preferida se muestra en SEQ ID NO: 37.

### Ejemplo 2: Expresión y purificación

#### 10 2.1 Clonación, expresión y purificación de polipéptidos de fusión.

Las proteínas de fusión anteriormente mencionadas se expresaron de manera recombinante en dos células huésped eucariotas diferentes:

15 Para el análisis inicial de las proteínas de fusión agonistas de receptor CD40 anteriormente mencionadas, se transfectaron transitoriamente células Hek293T cultivadas en DMEM + GlutaMAX (GibCo) suplementadas con el 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 [mu]g/ml de estreptomina 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 la blasticidina, puromicina o higromicina. En esos casos, cuando es necesaria una pluralidad de cadenas polipeptídicas para lograr el producto final, los casetes de expresión o bien se combinaron en un plásmido o bien se colocaron en diferentes plásmidos durante la transfección. El sobrenadante de cultivo celular que contiene el polipéptido de fusión recombinante se recogió tres días después de la transfección y se clarificó por centrifugación a 300 x g seguido de filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

25 Para la expresión a mayor escala de proteínas de fusión agonistas de receptor CD40 que van a usarse *in vivo*, se insertaron casetes de ADN sintético que codifican para 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 del genoma de las células huésped. Los vectores de expresión verificados de secuencia se introdujeron por electroporación en células de ovario de hámster chino adaptadas a suspensión (CHO-S, Invitrogen). Se aplicó presión de selección apropiada tres días después de la transfección a las células transfectadas. Las células supervivientes que portaban el/los gen(es) de resistencia derivados del vector se recuperaron mediante cultivo posterior bajo presión de selección. Tras el crecimiento estable de las reservas de células seleccionadas en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37°C y atmósfera del 7% de CO<sub>2</sub> en una incubadora con agitador orbital (100 rpm, recorrido de agitación de 50 mm), los sobrenadantes individuales se analizaron mediante ensayos ELISA que detectan las proteínas anteriormente mencionadas y las reservas de células con la productividad específica más alta se expandieron en matraces de agitación antes de la producción de proteínas (agitador orbital, 100 rpm, recorrido de agitación de 50 mm).

45 Para la producción de proteínas a escala de laboratorio, se cultivaron reservas de células individuales durante 7-12 días en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37°C y atmósfera del 7% de CO<sub>2</sub> en un biorreactor Wave 20/50 EHT (GE-Healthcare). El medio basal fue PowerCHO2-CD suplementado con Glutamax 4 mM. El cultivo en Wave comenzó con una concentración celular viable de 0,3 a 0,4 x 10<sup>6</sup> células/ml y los siguientes ajustes (para una bolsa de cinco o diez litros): frecuencia de agitación 18 rpm, ángulo de agitación de 7°, corriente de gas 0,2-0,3 l/min, 7% de CO<sub>2</sub>, 36.5°C. Durante la ejecución de Wave, el cultivo celular se alimentó dos veces con PowerFeed A (Lonza), generalmente el día 2 (20% de alimentación) y el día 5 (30% de alimentación). Después de la segunda alimentación, la frecuencia de agitación se aumentó hasta a 22 rpm, así como el ángulo de agitación a 8°.

50 El biorreactor se cosechó generalmente entre el día 7 y el día 12 cuando la viabilidad celular cayó por debajo del 80%. En primer lugar, se clarificó el sobrenadante de cultivo usando un sistema de filtración de profundidad manual (Millipore Millistak Pod, MC0HC 0,054 m<sup>2</sup>). Para las proteínas marcadas con estrep., se añadió avidina a una concentración final de 0,5 mg/l. Finalmente, el sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de fusión agonista de receptor CD40 se esterilizó por filtración usando un filtro en la parte superior de botella (0,22 µm, PES, Corning) y se almacenó a 2-8°C hasta su procesamiento posterior.

60 Para la purificación por afinidad, se empaquetó Streptactin 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 se aplicó el sobrenadante del cultivo celular a la columna con una velocidad de flujo de 4 ml/min. Posteriormente, la columna se lavó con 15 ml de tampón W y se eluyó el polipéptido unido por etapas mediante la adición de 7 x 1 ml de tampón E (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, destiobiotina 2,5 mM, pH 8,0). Alternativamente, puede utilizarse PBS pH 7,4 que contiene destiobiotina 2,5 mM para esta etapa.

65 Alternativamente al método basado en Streptactin Sepharose, se realizó la purificación por afinidad empleando una columna con proteína A inmovilizada como ligando de afinidad y un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare).

Se eligió un material de fase sólida con alta afinidad por el dominio FC de la proteína de fusión: MABSelect Sure™ (GE Healthcare). Brevemente, se cargó el sobrenadante de cultivo celular clarificado en una columna HiTrap MabSelectSure (CV = 5 ml) equilibrada en tampón de lavado-1 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 7,2) sin exceder 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 equilibrio mencionado anteriormente, seguido de cuatro volúmenes de columna (4 CV) de tampón de lavado-2 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 8,0) para agotar la proteína de la célula huésped y el ADN de la célula huésped. Luego se eluyó la columna con tampón de elución (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 3,5) y se recogió el eluato en hasta diez fracciones, teniendo cada fracción un volumen igual al volumen del lecho de la columna (5 ml). Cada fracción se neutralizó con un volumen igual de tampón de lavado-2 anteriormente mencionado. La velocidad lineal se ajustó a 150 cm/h y se mantuvo constante durante el método de cromatografía de afinidad anteriormente mencionado.

Se cuantificó la cantidad de proteína de las fracciones de eluato y se concentraron las fracciones pico por ultrafiltración y se purificaron adicionalmente por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Se realizó SEC en columnas Superdex 200 10/300 GL o HiLoad 26/60 utilizando un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare). Las columnas se equilibraron con solución salina tamponada con fosfato y el polipéptido concentrado purificado por afinidad se cargó en la columna SEC con un volumen de muestra que no excedía el 2% (v/v) del volumen de la columna. En el caso de las columnas Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), se aplicó una velocidad de flujo de 0,5 ml por minuto. En el caso de las columnas HiLoad 26/60 Superdex200, se aplicó una velocidad de flujo de 2,5 ml por minuto. El perfil de elución del polipéptido se monitorizó por absorbancia a 280 nm.

Los cromatogramas de SEC analítica de las proteínas de fusión scCD 40L-RBD-FC hexavalentes PROTEÍNA A, PROTEÍNA B y PROTEÍNA C se muestran en la figura 5.

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 trazó una curva de calibración y se determinó el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado. Las proteínas de fusión agonistas de receptor CD40 que comprenden dominio FC se eluyeron normalmente de las columnas Superdex200 con un peso molecular aparente de aprox. 160-180 kDa, confirmando la homodimerización del polipéptido de fusión agonista de receptor CD40 maduro mediante el dominio Fc.

Ejemplo 3: Resultados de SDS-PAGE de proteínas de dímero expresadas a partir de proteínas A, B y C

Las proteínas A, B y C se expresaron y purificaron según los ejemplos 1 y 2. Las tres proteínas purificadas o bien no estaban reducidas (carriles 1, 4 y 7) o bien se redujeron con ditioneitol (carriles 2, 5, 8), y se realizó electroforesis en gel de SDS-Page en bis-tris a 4-12%. Los resultados se muestran en la Figura 6. El carril 1 muestra que, en la condición no reducida, la proteína expresada PROTEÍNA A tenía tanto bandas de monómero (85 kDa) como de dímero (170 kDa), indicando la autorreducción de los disulfuros de bisagra intercatenarios por tioles libres endógenos presentes en el propio polipéptido. Por el contrario, los carriles 4 y 7 muestran que, en la condición no reducida, las proteínas expresadas PROTEÍNA B y PROTEÍNA C solo tenían una banda de dímero (170 kDa), indicando la ausencia de propiedades de autorreducción de los propios polipéptidos dejando los puentes disulfuro intercatenarios de la región bisagra intactos.

Ejemplo 4: Proteína de control trivalente

Para comparar la unión relativa entre las proteínas de fusión agonistas de receptor CD40 hexavalentes y el CD40 trivalente estabilizado con el bacteriófago RB69-FOLDON, se expresó PROTEÍNA X (SEQ ID NO: 38) en células CHO-S y se purificó tal como se describió en la sección anterior. La proteína purificada por SEC sirve como control en los siguientes ejemplos. La secuencia de la PROTEÍNA X (SEQ ID NO: 38) se muestra en la tabla 7. Los aminoácidos 1-20 de la PROTEÍNA X representan el péptido señal y las proteínas maduras comienzan con el aminoácido Gln21. Esta proteína consiste en tres polipéptidos idénticos, comprendiendo cada uno un dominio de CD40L soluble (Q121-L261 de SEQ ID NO: 1); este ensamblaje se estabilizó mediante el dominio de trimerización de fibritina del bacteriófago RB69 fusionada con un ligador flexible al extremo C-terminal de CD40L.

**Tabla 7: Proteínas de control trivalentes que incluyen un péptido señal**

| SEQ ID NO | Secuencia |
|-----------|-----------|
|-----------|-----------|

|                     |   |
|---------------------|---|
| 38<br>(PROTEÍNA X)  | METD TLLV FVLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br>TMSNNLV TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIAS<br>LCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF<br>VNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGS SSSSSSSGSSGSSGSSGSGYIEDAPSD<br>GKFYVRKDGAWVELPTASGPSSSSSSSAWSHPQFEK |
| 39<br>(Proteína X2) | METD TLLV FVLLVWVPAGNGQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY<br>TMSNNLV TLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIAS<br>LCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF<br>VNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLGS SSSSSSSSAWSHPQFEK   |

Ejemplo 5: Ensayos celulares

5A. Ensayo de unión celular para demostrar la unión de agonistas de receptor CD40 a su receptor nativo CD40 en la superficie de las células Ramos B

Con el fin de complementar los datos de afinidad para los agonistas de receptor CD40 obtenidos usando la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), se quería investigar si los agonistas de receptor CD40 podían unirse a su receptor nativo en la superficie de las células. Puesto que las células B dependen de la señalización de CD40 para su activación completa, se usó la línea de células B humanas Ramos para este ensayo. Se sabe que las células Ramos expresan CD40 en su superficie y, después de la incubación con agonistas de receptor CD40, uno podría imaginarse que puede detectarse la etiqueta de estrep. II C-terminal acoplada a los agonistas de receptor CD40 con un anticuerpo. Este anticuerpo podría detectarse a su vez con un anticuerpo fluorescente y las células podrían analizarse en un citómetro de flujo.

Se incubaron células Ramos B que expresan CD40 en su superficie con PROTEÍNA X (c), PROTEÍNA A (d), PROTEÍNA B (e) o PROTEÍNA C (f) en hielo durante 30 minutos para permitir la asociación de receptor-ligando. Se lavaron las células con tampón de lavado enfriado con hielo seguido de incubación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-etiqueta de estrep. II en hielo durante 30 minutos para detectar agonistas de receptor CD40 acoplados en la superficie celular. Se bloquearon receptores de Fc mediante la adición de IgG humana al 1% (Gamunex) a los tampones de tinción y lavado. Las células se lavaron nuevamente con tampón de lavado enfriado con hielo seguido de incubación con un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo marcado con Alexa488 sobre hielo y en la oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente, se procesaron las células para citometría de flujo mediante lavado con PBS enfriado con hielo. Se analizaron las células en un citómetro de flujo Guava Easycyte y se adquirió la fluorescencia en el canal verde. Se obtuvieron las unidades de fluorescencia media en última instancia de los datos de citometría de flujo sin procesar usando el software FlowJo mediante la separación de células vivas y el análisis de la fluorescencia Alexa488 dentro de esta separación. Las células solo (a) y las células incubadas solo con el anticuerpo de cabra secundario anti-conejo (b) sirvieron como controles.

Tal como puede observarse en la figura 7, todos los agonistas de receptor CD40 conducen a un aumento significativo en la fluorescencia de las células en comparación con las células solamente o con las células incubadas con el anticuerpo secundario fluorescente solamente. En este ensayo, la PROTEÍNA B produjo la señal de fluorescencia más alta (e) indicando que la PROTEÍNA B se unía mejor a las células Ramos. A la intensidad de la señal de la PROTEÍNA B le seguía la PROTEÍNA A (d) y la PROTEÍNA X (c), proporcionando la PROTEÍNA C (f) la señal más débil. Tomados en conjunto, puede suponerse que todos los agonistas de receptor CD40 se unen a su receptor nativo en un contexto celular *in vitro*, siendo la PROTEÍNA B la que mejor se unía.

5B. Regulación por incremento de CD86 en células B como lectura de la señalización de CD40 desencadenada por agonistas de receptor CD40

CD86 es un marcador de activación en células B humanas y es el ligando de CD28 y CTLA-4 en células T. La expresión en superficie de CD86 se usa a menudo como medio para describir el estado de activación de las células B. Puesto que las células B necesitan varias señales para la activación completa, incluyendo el receptor de células B y la ligación de CD40, los inventores se preguntaron si los agonistas de receptor CD40 podrían conducir a regulación por incremento de la expresión en superficie de CD86.

Para ese fin, se incubaron células Ramos B con PROTEÍNA X 1 µg/ml (b), PROTEÍNA X 10 µg/ml (c), PROTEÍNA A 1 µg/ml (d) o PROTEÍNA A 10 µg/ml (e) en placas de 24 pocillos durante la noche a 37°C y el 5% de CO2. Las células no tratadas sirvieron como control (a). Al día siguiente, se incubaron todas las muestras con un anticuerpo anti-CD86 humano marcado con PE durante 30 minutos en hielo y en la oscuridad. Los receptores Fc se bloquearon

mediante la adición de IgG humana al 1% (Gamunex) a los tampones de tinción y lavado. Las muestras se procesaron posteriormente para citometría de flujo en un citómetro de flujo Guava EasyCyte. Se obtuvieron las unidades de fluorescencia media en última instancia de los datos de citometría de flujo sin procesar usando el software FlowJo mediante la separación de células vivas y el análisis de la fluorescencia de PE dentro de esta separación. Los valores de fluorescencia medios se usaron para expresar los niveles en superficie de CD86 y los valores se normalizaron a la muestra de control, que no se incubó con un agonista de receptor CD40 (a).

Tal como puede observarse en la figura 8, todos los agonistas de receptor CD40 conducen a un aumento en la expresión en superficie de CD86, indicando que todos los compuestos desencadenaron la señalización de CD40. De manera importante, este aumento era dependiente de la dosis cuando se compararon las barras b y c o d y e (1  $\mu\text{g/ml}$  frente a 10  $\mu\text{g/ml}$  del mismo compuesto, respectivamente). Además, la regulación por incremento de CD86 fue más fuerte para la PROTEÍNA A, que es hexavalente. Esto implicaba un claro efecto de avidéz en comparación con la PROTEÍNA X, que solo es trivalente. Los resultados indican que los agonistas de receptor CD40 usados en el presente documento tienen actividad biológica de una manera dependiente de la dosis.

#### 5C. Ensayo de sangre completa para mostrar la estimulación de células inmunitarias concomitante con la regulación por incremento de CD83 por agonistas de receptor CD40

CD83 es una molécula de superficie, que se regula por incremento durante el proceso de proliferación y maduración de células inmunitarias humanas. CD83 se encuentra principalmente en células dendríticas y células T y puede usarse como marcador para la estimulación de células inmunitarias. Tal como muestran Chowdhury *et al.* (Cancer Immunology Research, 2013, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0070), puede usarse la regulación por incremento de CD83 como medio para estudiar la activación de células inmunitarias después de la ligación de CD40 por anticuerpos. Por tanto, los inventores se preguntaron si los agonistas de receptor CD40 también podrían conducir a regulación por incremento de CD83 en un ensayo que emplea sangre completa.

Para ese fin, se recogió sangre completa de donantes sanos en tubos de EDTA. Se incubaron 2 ml de sangre con PROTEÍNA X 1  $\mu\text{g/ml}$  (b), PROTEÍNA X 50  $\mu\text{g/ml}$  (c), PROTEÍNA A 1  $\mu\text{g/ml}$  (d) o PROTEÍNA A 50  $\mu\text{g/ml}$  (e) en placas de 24 pocillos durante 4 horas a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. La sangre no tratada sirvió como control (a). Después de 4 horas, todas las muestras se incubaron con un anticuerpo anti-CD83 humano marcado con PerCP/Cy5.5 durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, se procesaron las muestras para citometría de flujo mediante fijación y lisis de glóbulos rojos usando disolución de lisis BD FACS según las instrucciones del fabricante. Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo Guava EasyCyte y las poblaciones de células (granulocitos, linfocitos y monocitos) se separaron basándose en su perfil de dispersión. Se adquirió la fluorescencia en el canal rojo lejano para cada población y se analizó usando el software FlowJo. Se determinó el porcentaje de células positivas para CD83 y normalizó a la muestra de control, que no se incubó con un agonista de receptor CD40.

Tal como puede observarse en la figura 9, tanto la PROTEÍNA X como la PROTEÍNA A conducen a la generación de una nueva población positiva para CD83 en comparación con las células sanguíneas no tratadas (a). Esta nueva población positiva para CD83 apareció para todas las poblaciones celulares analizadas (linfocitos, monocitos y granulocitos) y fue lo más prominente en el caso de los linfocitos. De manera importante, el percentil compartido de células positivas para CD83 era dependiente de la dosis al comparar las barras b y c o d y e (1  $\mu\text{g/ml}$  frente a 50  $\mu\text{g/ml}$  del mismo compuesto, respectivamente). Además, el tamaño de la población positiva para CD83 fue más fuerte para la PROTEÍNA A hexavalente al comparar las mismas dosis con la PROTEÍNA X. Los resultados muestran un claro efecto de avidéz de la PROTEÍNA A hexavalente en comparación con la PROTEÍNA X trivalente. Los resultados también muestran que los agonistas de receptor CD40 usados en el presente documento tenían una actividad biológica de una manera dependiente de la dosis usando sangre humana fresca.

#### Ejemplo 6: Ensayo de unión *in vitro* a receptor CD40 inmovilizado

Se calcularon constantes de unión en equilibrio ( $K_D$ ) de constructos trivalentes de CD40L (por ejemplo: PROTEÍNA X) y constructos hexavalentes de CD40L (por ejemplo, PROTEÍNA A, PROTEÍNA B y PROTEÍNA C) a CD40 basándose en datos de unión cinética ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ) determinados con un sistema de biosensor automatizado (Attana A100). El A100 permite investigar interacciones moleculares en tiempo real basándose en la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM).

Para este fin, se inmovilizó CD40-Fc humano, adquirido de Enzo (número de catálogo: ALX-522-016-C050), en la superficie de un chip QCM activado con carboxilo. Los constructos de CD40L triméricos y hexaméricos se usaron como analito soluble a concentraciones de 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se analizó la unión ( $k_{on}$ ) y disociación ( $k_{off}$ ). Las mediciones en tiempo real y  $K_D$  calculadas de los mismos revelaron una actividad de unión comparable entre todas las proteínas A, B y C hexavalentes, pero una unión superior de proteínas hexavalentes con respecto a la proteína X trivalente.

#### **Tabla 8: Fuerza de unión de**

| Compuesto  | K <sub>on</sub>    | K <sub>off</sub>    | K <sub>D</sub> [mol] |
|------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| Proteína X | 9,87e <sup>4</sup> | 8,93e <sup>-4</sup> | 9,05e <sup>-9</sup>  |
| Proteína A | 1,75e <sup>6</sup> | 2,92e <sup>-4</sup> | 1,67e <sup>-10</sup> |
| Proteína B | 1,91e <sup>6</sup> | 2,90e <sup>-4</sup> | 1,52e <sup>-10</sup> |
| Proteína C | 1,82e <sup>6</sup> | 3,21e <sup>-4</sup> | 1,76e <sup>-10</sup> |

#### Ejemplo 7: Determinación de la semivida

5 Las moléculas PROTEÍNA A/PROTEÍNA B/PROTEÍNA C están constituidas cada una por dos polipéptidos unidos covalentemente por tres enlaces disulfuro intercatenarios y todos comprenden la mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (según el índice UE), dando como resultado la aglicosilación del dominio CH2. Las cisteínas de la superficie externa de los dominios de CD40L solubles se mutaron a serina (posiciones equivalentes a C194 de CD40L tal como se muestra en SEQ ID NO: 1), dando como resultado SEQ ID NO: 31 (PROTEÍNA B) con C94S, C243S, C392S, en comparación con SEQ ID NO: 15 (PROTEÍNA A). Alternativamente, las cisteínas de la superficie externa de los dominios de CD40L solubles se mutaron a alanina (posiciones equivalentes a C194 de CD40L tal como se muestra en SEQ ID NO: 1), dando como resultado SEQ ID NO: 35 (PROTEÍNA C) con C94A, C243A, C392A, en comparación con SEQ ID NO: 15 (PROTEÍNA A). La semivida de las proteínas de fusión de FC resultantes se evaluó para un efecto introducido por estas alteraciones.

15 Se trataron ratones NMRI hembra con 1,0 mg/kg de cada compuesto (PROTEÍNA A/PROTEÍNA B/PROTEÍNA C) como una única inyección intravenosa en bolo. Se recogió sangre completa antes de la aplicación (antes de la dosis) y hasta 312 horas después de la administración del artículo de prueba. Se preparó suero y se almacenaron las muestras a -80°C hasta la determinación de las concentraciones séricas.

20 La cuantificación de las concentraciones de PROTEÍNA A/PROTEÍNA B/PROTEÍNA C en suero de ratón se realizó con un ensayo ELISA que detecta los agonistas de CD40 individuales mostrados en la tabla 7. Las placas se recubrieron con CD40-Fc. Entonces se detectaron constructos de CD40-ligando que se unen específicamente a su receptor CD40 por medio de su etiqueta de estrep. empleando StrepTactin-HRP. Los ensayos ELISA se llevaron a cabo usando PROTEÍNA A o PROTEÍNA B o PROTEÍNA C como muestras de calibración y control. Los datos medidos de las concentraciones convencionales se usaron para crear curvas de calibración usando un ajuste de 5 parámetros. Esto permitió la determinación de las concentraciones desconocidas de PROTEÍNA A o PROTEÍNA B o PROTEÍNA C en las muestras de suero de ratón respectivas.

30 Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando las concentraciones séricas medias y el programa de evaluación farmacocinética PK Solutions versión 2.0 para el análisis de datos farmacocinéticos no compartimental (Summit Research Services, Montrose, CO). PK Solutions es una aplicación automatizada basada en Excel, que calcula los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos de concentración-tiempo obtenidos a partir del análisis de, por ejemplo, muestras biológicas siguiendo vías de administración intravenosas o extravasculares. PK Solutions calcula los resultados sin suponer ningún modelo compartimental específico.

Los resultados de la evaluación farmacocinética se resumen en la tabla 9.

**Tabla 9: Resultados del estudio PK exploratorio en ratones NMRI: única dosis intravenosa de 1 mg/kg de PROTEÍNA A/PROTEÍNA B/PROTEÍNA C.**

|                                | PROTEÍNA A | PROTEÍNA B | PROTEÍNA C |
|--------------------------------|------------|------------|------------|
| t <sub>máx.</sub> (h)          | 0,083      | 0,083      | 0,083      |
| C <sub>máx.</sub> (µg/ml)      | 8,22       | 10,23      | 9,74       |
| t <sub>último</sub> (h)        | 192        | 312        | 144        |
| C <sub>último</sub> (µg/ml)    | 0,286      | 0,122      | 0,242      |
| t <sub>1/2</sub> E (h)         | 70,85      | 79,25      | 60,46      |
| t <sub>1/2</sub> E (d)         | 2,95       | 3,30       | 2,52       |
| AUC <sub>0-t</sub> (µg*h/ml)   | 178        | 273        | 134        |
| AUC <sub>0-inf</sub> (µg*h/ml) | 222        | 287        | 155        |

45 Los resultados muestran que la PROTEÍNA B que contiene la subsecuencia Q121-L261 mutada C194S tenía una estabilidad *in vivo* prolongada en comparación con la proteína silvestre (PROTEÍNA A) o PROTEÍNA C que contiene la muteína C194A.

#### Ejemplo 8: Prueba de estabilidad/agregación (ejemplo profético)

50 Los contenidos de monómeros y agregados se determinan mediante SEC analítica tal como se describe en el ejemplo 2. Para este fin particular, el análisis se realiza en tampones que contienen concentraciones fisiológicas de sal a pH fisiológico (por ejemplo, NaCl al 0,9%, pH 7,4; PBS pH 7,4). Un análisis de agregación típico se realiza en

una columna Superdex200 (GE Healthcare). Esta columna separa las proteínas en el intervalo de 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 traza una curva de calibración y se calcula el peso molecular aparente de las proteínas de fusión purificadas de peso molecular desconocido basándose en el volumen de elución.

El análisis SEC de la proteína soluble, no agregada, muestra normalmente un pico de proteína individual distinto a un volumen de elución definido (medido a DO de 280 nm o DO de 214 nm). Este volumen de elución corresponde al peso molecular nativo aparente de la proteína particular. Con respecto a la definición de “monómero” en el caso de las proteínas de fusión de FC, el ensamblaje de dos cadenas polipeptídicas está dirigido por la parte de FC de la proteína y la unidad funcional es una proteína que consiste en dos cadenas. Esta unidad que contiene dos cadenas de polipéptidos unidas a FC se define como “monómero” en el caso de las proteínas de fusión de Fc, independientemente de ser un polipéptido de fusión de cadena sencilla dimerizado.

Si se produce la agregación de proteínas, el análisis SEC muestra picos de proteínas adicionales con volúmenes de retención inferiores. Los oligómeros de proteínas sirven potencialmente como simientes de agregación y un alto contenido de oligómeros conduce potencialmente a la agregación de la proteína. Los oligómeros de gran peso molecular y agregados eluyen en el volumen vacío de la columna Superdex200 y no pueden analizarse por SEC con respecto a su peso molecular nativo.

Las preparaciones purificadas de proteínas de fusión agonistas de receptor CD40 deben contener preferiblemente solo proteína monomérica definida y solo una cantidad muy baja de proteína oligomérica. El grado de agregación/oligomerización de una preparación particular de proteína de fusión agonista de receptor CD40 se determina basándose en el análisis de SEC calculando las áreas de pico del diagrama de DO280 para el monómero definido y la fracción de oligómero/agregado, respectivamente. Basándose en el área de pico total, el porcentaje de proteína de monómero definida se calcula de la siguiente manera:

Contenido de monómero [%] = [Área de pico de proteína de monómero] / [área de pico total] x 100)

La definición de proteína soluble tal como se usa en este texto describe una preparación de proteína de proteína agonista de receptor CD40 purificada en un tampón de concentraciones de sal fisiológica a pH fisiológico que contiene un contenido definido de proteína soluble > 90% dentro de un intervalo de concentración de proteína típico de 0,2 a 10,0 mg/ml.

Ejemplo 9: La señalización de CD40 desencadenada por agonistas de receptor CD40 aumenta la expresión de marcadores de activación en macrófagos polarizados a M2

Los macrófagos de tipo M2 se caracterizan por una baja expresión de marcadores de activación/moléculas de activación de células T, tales como CD83, CD86 y HLA, y una alta expresión de moléculas inmunorreguladoras, tales como IL-10. Debido a esto, los macrófagos de tipo M2 se denominan a menudo protumorales en contraposición a los macrófagos “antitumorales” de tipo M1. Se decidió someter a prueba si el tratamiento con PROTEÍNA-B (SEQ ID NO: 31) podría aumentar el desarrollo de macrófagos de tipo M1 en condiciones de polarización normalmente a M2. Para lograr esto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas y se purificaron a partir de capas leucocíticas obtenidas de voluntarios sanos usando Ficoll-Hypaque (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se aislaron monocitos cultivando PBMC en medio (RPMI) en placas de 12 pocillos durante 2 horas a 37°C. Los monocitos se incubaron en condiciones de polarización a M2, IL-4 (50 ng/ml) e IL-10 (50 ng/ml), o medio solo para 3 días. Durante este período de incubación, se añadió PROTEÍNA-B (50 ng/ml) o control de medio a la mitad de los pocillos. El 3° día, las suspensiones celulares se tiñeron con un cóctel de anticuerpos monoclonales, incluyendo CD206, CD163, CD86, CD83, HLA-DR y CD4 (BioLegend, eBioscience o BD Biosciences). Se usó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato) (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante para eliminar las células muertas del análisis. Se analizaron las células usando el citómetro de flujo Guava easyCyte 12 (Merck Millipore). Se verificó la calidad de los anticuerpos y se realizó la separación usando controles de isotipo. Se usó el software Tree Star FlowJo y Guava InCyte para el análisis de datos de citometría de flujo. La expresión se cuantificó usando separaciones y la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI). El tratamiento con IL-4 e IL-10 (macrófagos polarizados a M2) aumentó la expresión de CD206 y CD163, marcadores clásicos de macrófagos de tipo M2, en monocitos (véase la tabla 10). En cambio, el tratamiento simultáneo con PROTEÍNA B redujo la expresión de CD206 y CD163 desde el 37% hasta el 22%. CD86 (B7.2) es una molécula coestimuladora clásica de células T, y la pareja de unión de CD28, mientras que CD83 es un marcador de maduración de células presentadoras de antígeno. De manera importante, el tratamiento con PROTEÍNA-B aumentó la coexpresión de CD86 y CD83, desde el 5% hasta el 20%, en comparación con IL-4/IL-10 solo. Además, la expresión de HLA-DR, DP fue mayor después del tratamiento con PROTEÍNA B, de 94 a 162 (MFI), en comparación con IL-4/IL-10 solo. Estos resultados demuestran que el tratamiento con PROTEÍNA B aumenta el estado de activación de macrófagos polarizados a M2 y los convierte en células presentadoras de antígeno más potentes.

**Tabla 10: Condiciones de polarización a M2: IL-4 (50 ng/ml) e IL-10 (50 ng/ml) durante 3 días**

|   | Monocitos no estimulados | Monocitos polarizados a M2 | Monocitos polarizados a M2 con scCD40LRBD-Fc 50 ng/ml |
|---|--------------------------|----------------------------|---|
| Porcentaje de macrófagos que son CD206 <sup>+</sup> y CD163 <sup>+</sup> (de tipo M2)             | 27%                      | 37%                        | 22%   |
| Porcentaje de macrófagos que son CD86 <sup>+</sup> y CD83 <sup>+</sup> (marcadores de activación) | 7%                       | 5%                         | 20%   |
| HLA-DR, DP (MFI)  | 82                       | 94                         | 162   |

Ejemplo 10: Los agonistas de receptor CD40 tratados con macrófagos polarizados a M2 son células presentadoras de antígeno más potentes para la activación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en un sistema de cocultivo alogénico.

5 Los macrófagos de tipo M2 se caracterizan por una capacidad débil para estimular respuestas de las células T debido a la baja expresión de HLA y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD86). Se quería someter a prueba si el tratamiento con PROTEÍNA B podría aumentar la potencia de macrófagos de tipo M2.

10 Para someter a prueba esto, se generaron macrófagos de tipo M2 tal como se describió anteriormente con IL-10 e IL-4 (50 ng/ml de cada una). Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> vírgenes de PBMC de un segundo donante (alogénico) usando el kit II de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. Se marcaron las células T con el kit de proliferación celular CellTrace CFSE (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. Se añadieron los monocitos tratados durante 3 días a células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a una razón de 10 linfocitos con respecto a 1 monocito. La proliferación y explosión de células T (crecimiento antes de la división celular) se midieron en 3 días más tarde usando CFSE y dispersión directa (FSC), respectivamente. Solo el 2% de las células T incubadas en medio solo mostraron evidencia de proliferación (dilución de CFSE) o explosión (aumento de FSC) (véase la tabla 11). En cambio, el 23% de las células T incubadas con monocitos alogénicos no estimulados mostraron evidencia de activación. La incubación de las células T con macrófagos polarizados a M2 redujo la respuesta de células T hasta el 16%. De manera interesante, la adición de PROTEÍNA B a las condiciones de polarización a M2 aumentó la potencia de los macrófagos alogénicos y el 31% de las células T respondieron. Estos datos demuestran que el tratamiento de monocitos en condiciones de polarización a M2 normalmente con AGP1233 da como resultado células presentadoras de antígeno más potentes.

25 **Tabla 11: Condiciones de polarización a M2: IL-4 (50 ng/ml) e IL-10 (50 ng/ml) durante 3 días**

|   | Células T CD4 <sup>+</sup> solas | Células T CD4 <sup>+</sup> + monocitos no estimulados | Células T CD4 <sup>+</sup> + monocitos polarizados a M2 | Células T CD4 <sup>+</sup> + monocitos polarizados a M2 con scCD40L-RBD-Fc 50 ng/ml |
|---|----------------------------------|---|---|---|
| Porcentaje de células T que son CFSE <sup>dim</sup> o FSC <sup>alta</sup> | 2%                               | 23%   | 16%   | 32%   |

Ejemplo 11: La señalización de CD40 desencadenada por el agonista de receptor CD40 hexavalente es más eficaz en el aumento de la expresión de marcadores de activación y reduce el desarrollo de macrófagos de tipo M2 después del cultivo con monocitos humanos purificados.

30 Para someter a prueba la eficacia de la agrupación de receptores y la señalización posterior, se comparó el agonista hexavalente de la invención PROTEÍNA B con dos agonistas de receptor CD40 trivalentes homotriméricos que representan conceptos de ingeniería comunes conocidos en la técnica, la PROTEÍNA X2 (SEQ ID NO: 39) representa el propio CD40L-RBD homotrimérico, no estabilizado y la PROTEÍNA X (SEQ ID NO: 38) representa el CD40L-RBD homotrimérico estabilizado mediante un armazón de trimerización fusionado C-terminal derivado del bacteriófago RB69. Puesto que se mostró que la señalización productiva del receptor CD40 conduce a una regulación por incremento de marcadores de activación y a un aumento en el desarrollo de macrófagos de tipo M1, se purificaron monocitos humanos de capas leucocíticas, tal como se describió anteriormente. Se incubaron los monocitos purificados en medio suplementado con tres concentraciones diferentes (10, 100 y 1000 ng/ml) de los tres constructos diferentes (véase la tabla 12) durante 3 días y se analizaron las células por citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de activación y fenotipo. El tratamiento con las tres concentraciones de PROTEÍNA B hexavalente produjo un aumento dependiente de la dosis en la expresión de CD86 (tanto como MFI como porcentaje positivo) en comparación con el control. Por el contrario, ninguna de las concentraciones de PROTEÍNA X2 trivalente mostró una diferencia en comparación con el control. En el caso de la PROTEÍNA X trivalente estabilizada con el armazón de RB69, solo la concentración más alta produjo un ligero aumento de la expresión de CD86. Además, se observó el mismo efecto de compuesto y dosis con la expresión de HLA-DR, DP que confirma que incluso dosis bajas de constructo hexavalente son suficientes para la agrupación de receptores y

5 señalización productiva, mientras que los constructos trivalentes no muestran actividad o actividad baja a concentraciones muy altas. Finalmente, aproximadamente el 20% de los monocitos en los medios regulan por incremento generalmente la expresión de CD206 y CD163 en 3 días, lo que es indicativo de desarrollo de macrófagos de tipo M2. El tratamiento con las tres concentraciones de PROTEÍNA B hexavalente redujo esto hasta menos del 3%. Consecuente con los datos de marcador de activación, solo la alta concentración de la PROTEÍNA X trivalente mostró alguna disminución en el desarrollo de macrófagos de tipo M2. Tomados conjuntamente, los datos demuestran una actividad biológica superior de la proteína B de la invención.

10 **Tabla 12: Se cultivaron monocitos durante 3 días en las condiciones indicadas**

| Condiciones de cultivo  | Medio solo | PROTEÍNA-X2 (ng/ml) |     |      | PROTEÍNA-X (ng/ml) |     |      | PROTEÍNA-B (ng/ml) |     |      |
|---|------------|---------------------|-----|------|--------------------|-----|------|--------------------|-----|------|
|   |            | 10                  | 100 | 1000 | 10                 | 100 | 1000 | 10                 | 100 | 1000 |
| CD86 (MFI)  | 12         | 11                  | 12  | 11   | 11                 | 11  | 12   | 17                 | 39  | 47   |
| Porcentaje de macrófagos que son CD86 <sup>+</sup>                                    | 8%         | 7%                  | 7%  | 8%   | 7%                 | 8%  | 16%  | 30%                | 58% | 64%  |
| HLA-DR, DP (MFI)  | 27         | 26                  | 29  | 22   | 26                 | 26  | 31   | 39                 | 54  | 55   |
| Porcentaje de macrófagos que son HLA-DR, DP <sup>+</sup>                              | 5%         | 5%                  | 7%  | 2%   | 5%                 | 6%  | 12%  | 20%                | 35% | 37%  |
| Porcentaje de macrófagos que son CD206 <sup>+</sup> y CD163 <sup>+</sup> (de tipo M2) | 23%        | 21%                 | 23% | 21%  | 17%                | 21% | 10%  | 3%                 | 2%  | 1%   |

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína agonista de receptor CD40 que comprende un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende:
  - (i) un primer dominio de CD40L soluble,
  - (ii) un primer ligador peptídico,
  - (iii) un segundo dominio de CD40L soluble,
  - (iv) un segundo ligador peptídico, y
  - (v) un tercer dominio de CD40L soluble, y
  - (vi) un fragmento Fc de anticuerpo, que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 o 14 o los aminoácidos 1-217 de SEQ ID NO: 13 o 14,
 en la que el fragmento Fc de anticuerpo (vi) se ubica de manera C-terminal con respecto al tercer dominio de CD40L (v), y se fusiona al dominio de CD40L soluble (v) por medio de una bisagra-ligador de una cualquiera de SEQ ID NO: 16 y 19-24.
2. Proteína agonista de receptor CD40 según la reivindicación 1, en la que al menos uno de los dominios de CD40L solubles es un dominio de CD40L soluble con una secuencia N-terminal seleccionada de
  - (a) Gln121 o Ile122 y
  - (b) (Gly/Ser)121.
3. Proteína agonista de receptor CD40 según la reivindicación 2, en la que el dominio de CD40L soluble termina con el aminoácido Leu261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1 y/o comprende una mutación en las posiciones E129, S132, T134, E142, Y145, Y146, C178, C194, R199, C218, Q220 o N240 o en dos o más de dichas posiciones.
4. Proteína agonista de receptor CD40 según la reivindicación 2 o 3, en la que los dominios de CD40L solubles (i), (iii) y (v) consisten en los aminoácidos 121-261 de CD40L humano según SEQ ID NO: 1.
5. Proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los ligadores peptídicos primero y segundo (ii) y (iv) tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos.
6. Proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, que puede comprender un sitio de escisión de proteasa, y/o que comprende adicionalmente un elemento C-terminal que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación.
7. Proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 15 y 25-35.
8. Proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende dos polipéptidos que tienen cada uno la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 32 o 34.
9. Proteína agonista de receptor CD40 según la reivindicación 8, en la que uno o más de los residuos de asparagina en las posiciones 147 y 296 de los polipéptidos están N-glicosilados.
10. Proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el/los polipéptido(s) está(n) modificado(s) postraduccionalmente.
11. Molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. Vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11, en unión operativa con una secuencia de control de la expresión.
13. Célula u organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico según la

reivindicación 11 o un vector según la reivindicación 12.

- 5 14. Composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína agonista de receptor CD40 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 11 o un vector según la reivindicación 12.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14 para su uso como medicamento.
- 10 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas o rechazos de trasplantes.

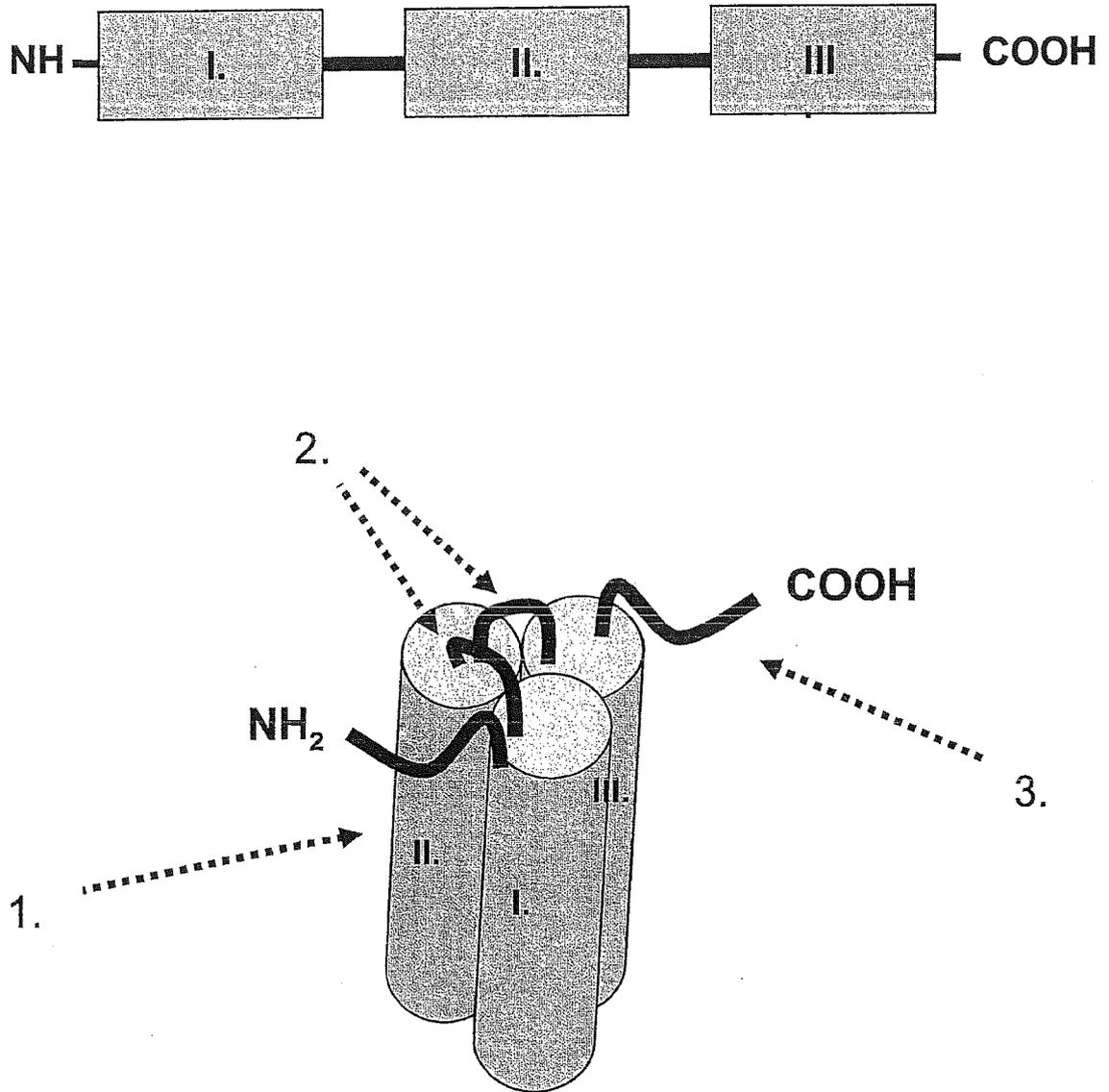


Figura 1

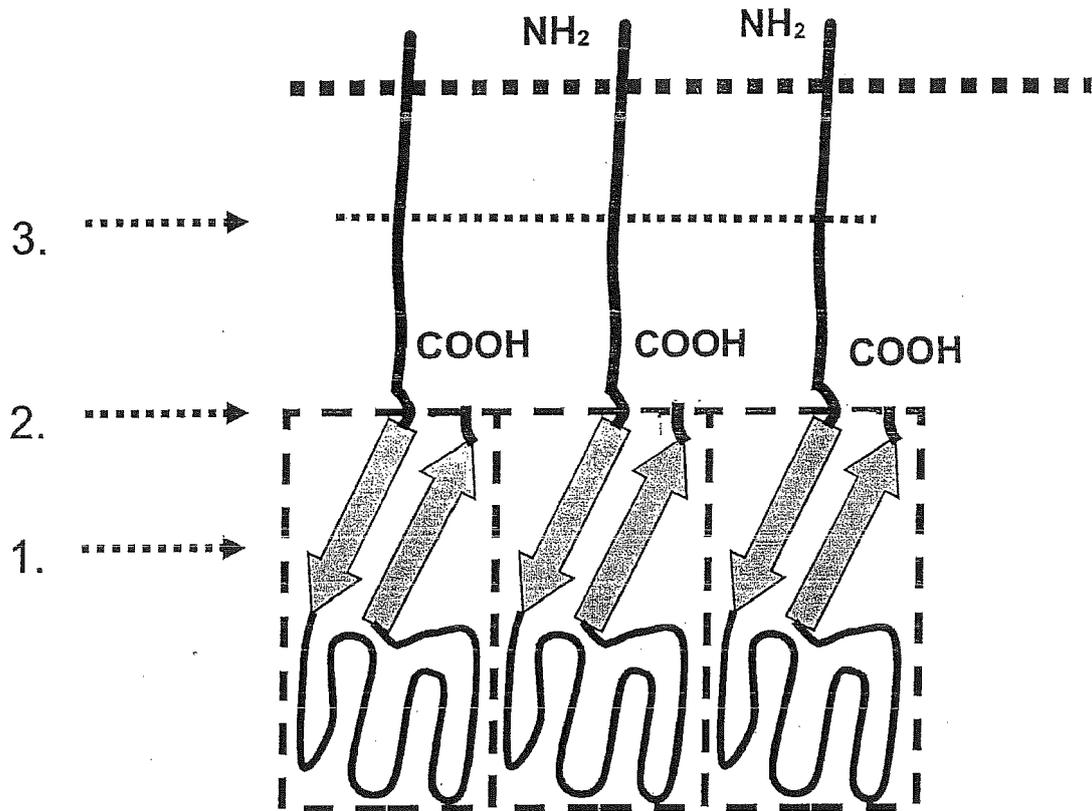


Figura 2

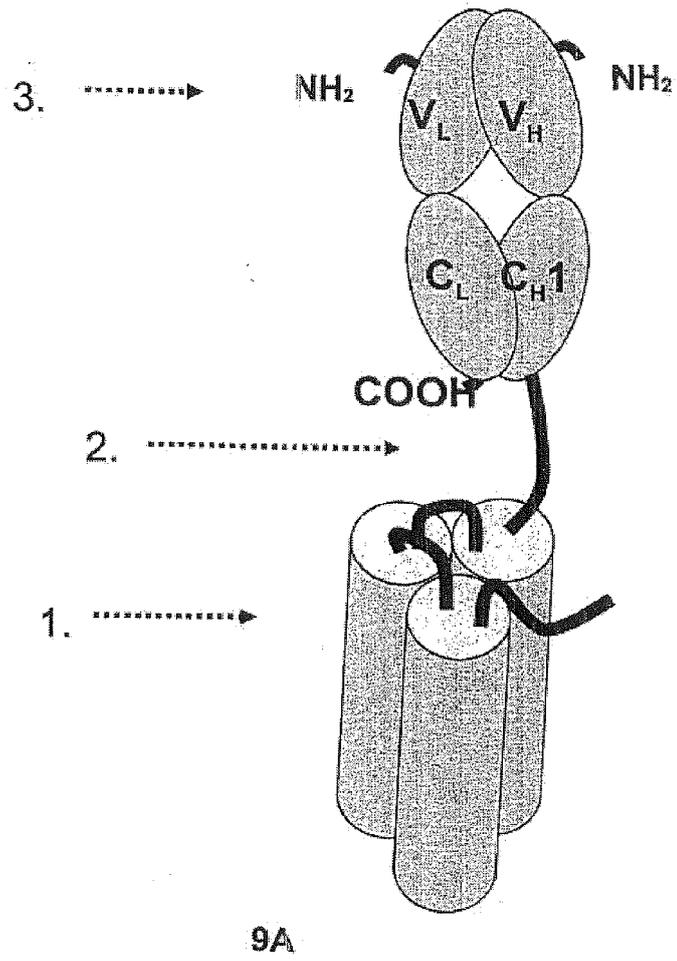


Figura 3

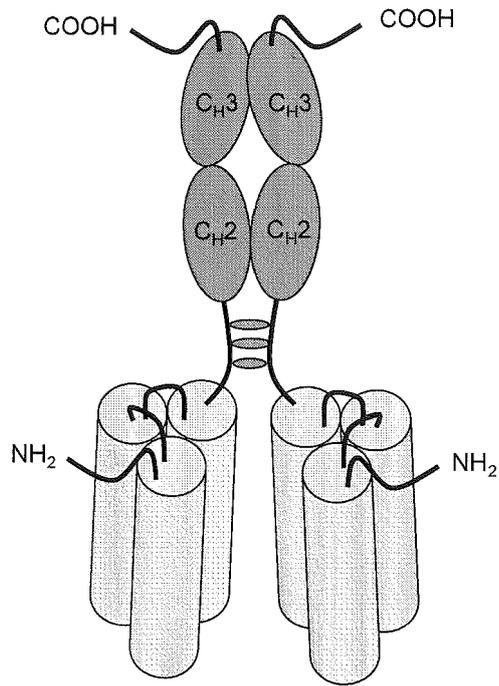


Figura 4

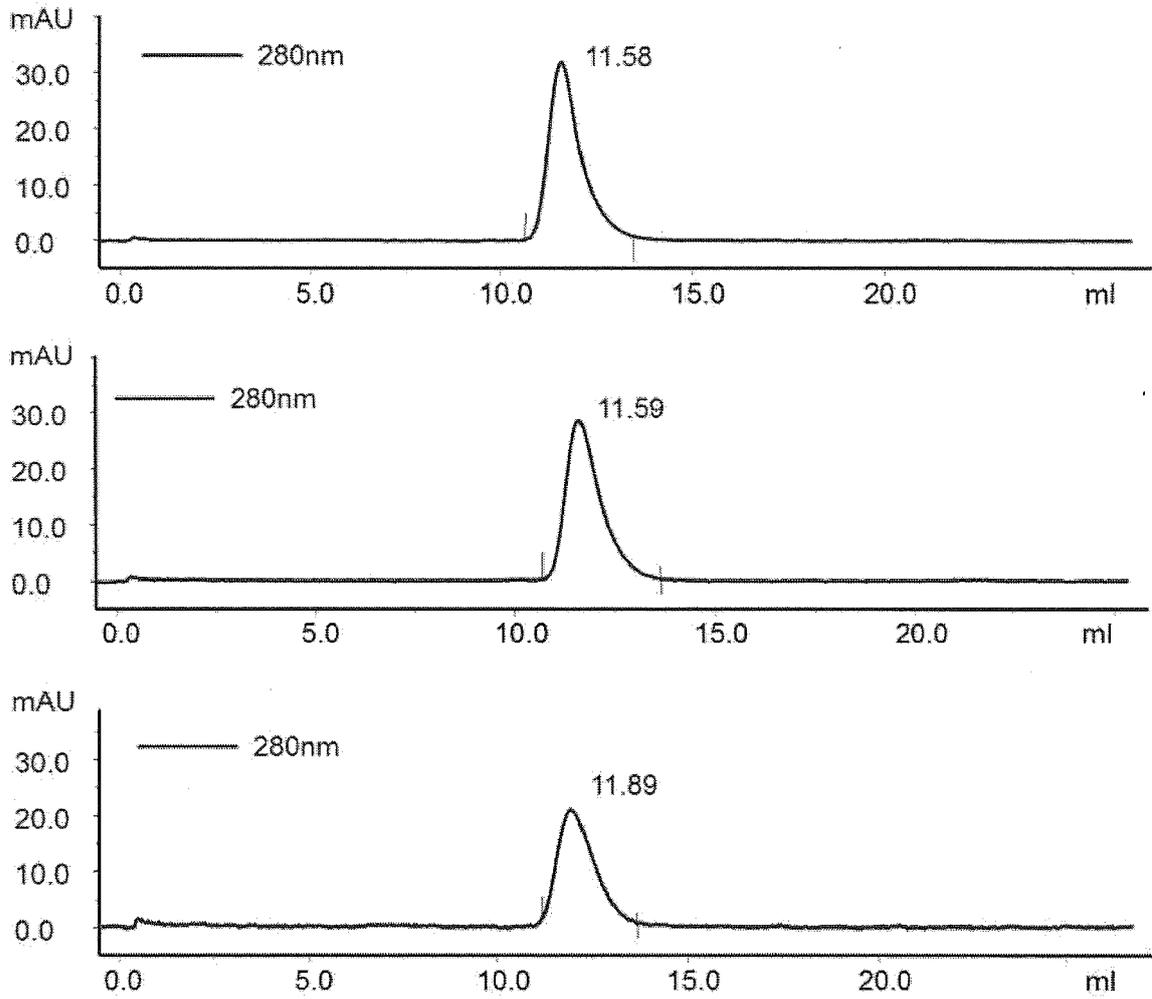
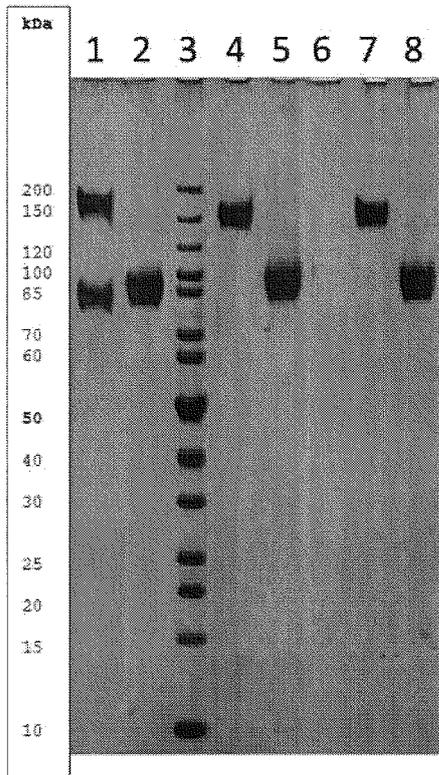


Figura 5

**SDS-PAGE / Tinción de plata**

Bis-Tris al 4-12%



| Carril | Muestra                       |
|--------|-------------------------------|
| 1      | APG1232 Lot5362 (no reducida) |
| 2      | APG1232 Lot5362 (reducida)    |
| 3      | Marcador                      |
| 4      | APG1233 Lot5368 (no reducida) |
| 5      | APG1233 Lot5368 (reducida)    |
| 6      | -                             |
| 7      | APG1234 Lot5369 (no reducida) |
| 8      | APG1234 Lot5369 (reducida)    |

**Figura 6**

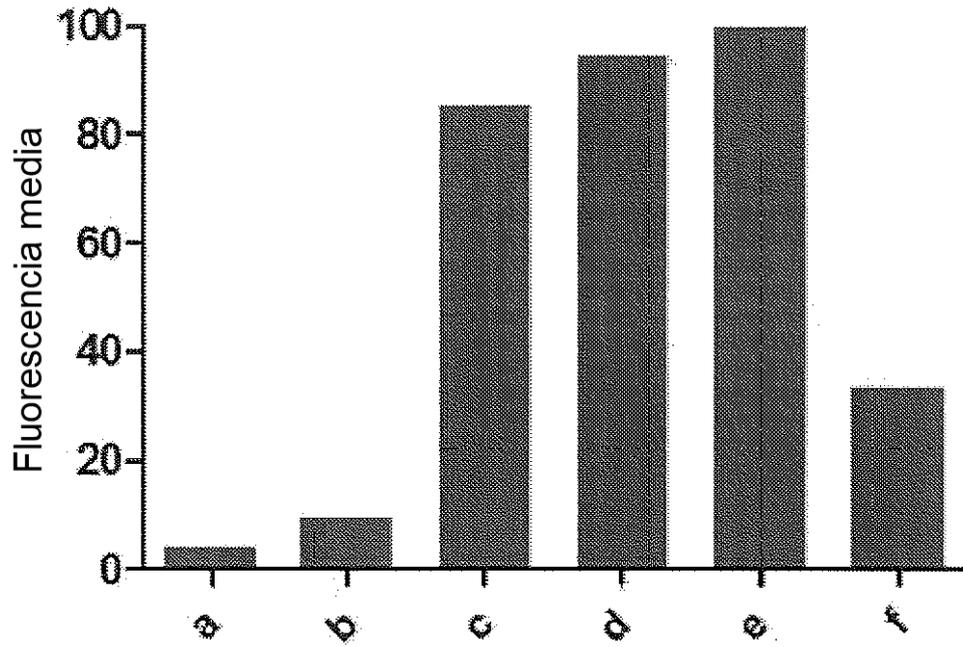


Figura 7

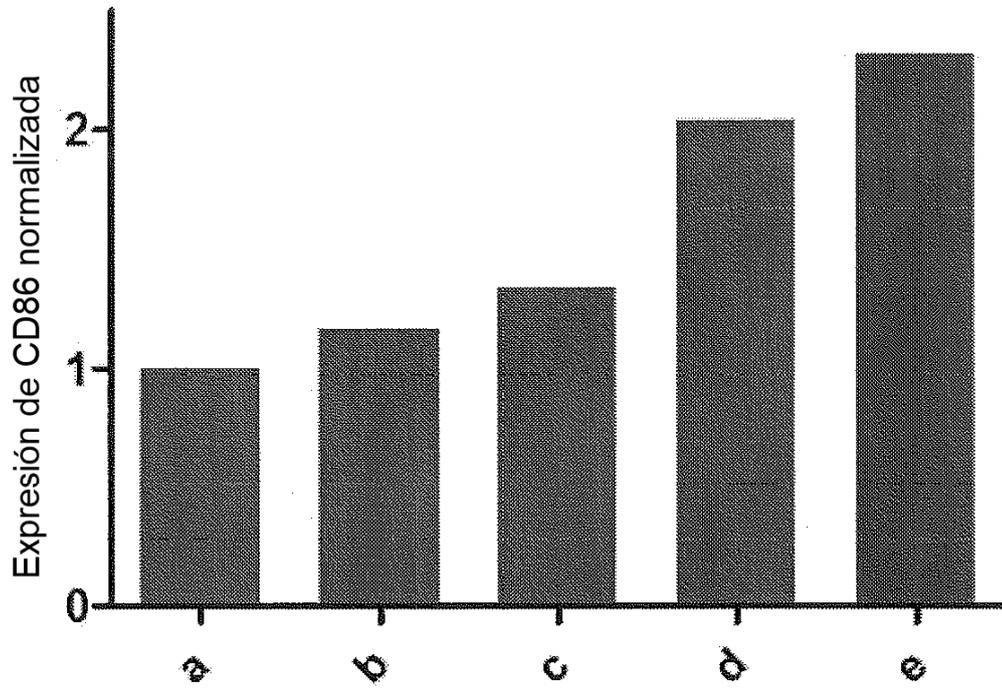


Figura 8

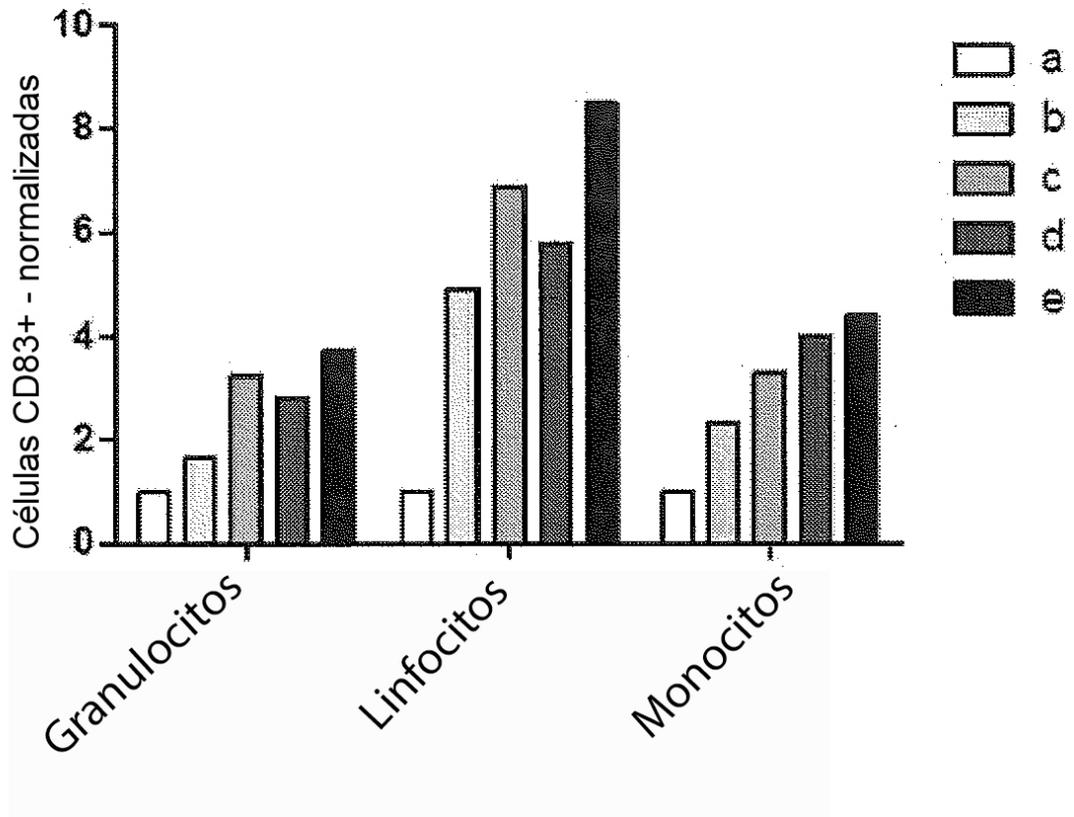


Figura 9

