

PROTEÍNAS AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE TRAIL DE CADENA SIMPLE

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de
5 Patente Provisoria N° 61/983152, presentada el 23 de Abril de 2014, que se
incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

En la presente invención se proveen proteínas específicas que son
agonistas de los receptores de TRAIL, que comprenden tres dominios de TRAIL
10 solubles y un fragmento Fc, moléculas de ácidos nucleicos que las codifican y su
uso. Las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL no forman agregados de
manera sustancial y son apropiadas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico
y/o de investigación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Se sabe que la trimerización de las citoquinas que pertenecen a la
superfamilia del TNF (TNFSF) es imprescindible tanto para que ocurra una unión
eficiente a los receptores como para que éstos se activen. Sin embargo, los
complejos triméricos que comprenden citoquinas de la superfamilia del TNF
resultan difíciles de preparar a partir de unidades monoméricas recombinantes.

20 En WO 01/49866 y en WO 02/09055 se describen proteínas de fusión
recombinantes que comprenden una citoquina de la superfamilia del TNF y un
componente de multimerización, que en particular es una proteína que pertenece
a la familia C1q o una colectina. Sin embargo, estas proteínas de fusión presentan
desventajas, ya que su dominio de trimerización generalmente tiene un peso
25 molecular elevado y/o su trimerización resulta más bien ineficiente.

Schneider et al. (J. Exp. Med., 187 (1989), 1205-1213) indicaron que los
trímeros de las citoquinas de la superfamilia del TNF eran estabilizados merced a
la presencia de motivos de estabilización en el extremo N. Se presume que la
estabilización del trímero de dominios que posibilitan la unión al receptor en
30 CD95L se debe a la presencia de otros dominios de aminoácidos que se
encuentran hacia el extremo N, cerca de la membrana citoplasmática.

Shiraishi et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 322 (2004), 197-202) indicaron que el dominio de CD95L en el que tiene lugar la unión al receptor podía ser estabilizado mediante la introducción de motivos artificiales en espiral, en forma de hélices α (con cierres de leucina), en el extremo N. Sin embargo, se ha
5 determinado que la relación entre la orientación que presentan las diversas cadenas que constituyen los polipéptidos, que por ejemplo, puede ser paralela o antiparalela, resulta prácticamente impredecible. Por otra parte, no resulta fácil establecer la cantidad óptima de repeticiones séptuples que debe haber en los motivos de los cierres en espiral. Más aun, las estructuras en espiral tienden a
10 formar agregados macromoleculares cuando se altera el pH y/o la fuerza iónica.

En WO 01/25277 se describen polipéptidos oligoméricos de cadena simple que pueden unirse a un dominio extracelular de un receptor celular que posibilita la unión a un ligando, donde estos polipéptidos comprenden al menos tres sitios en los que puede tener lugar la unión al receptor, de los cuales al menos uno
15 puede unirse a un dominio en el que puede ocurrir la unión a un ligando del receptor celular y al menos uno no puede hacerlo, por lo cual estos polipéptidos oligoméricos de cadena simple pueden unirse al receptor pero no pueden activarlo. A modo de ejemplo, los monómeros pueden derivar de ligandos del tipo de las citoquinas de la superfamilia del TNF, particularmente del TNF- α .

20 En WO 2005/103077 se describen polipéptidos de fusión de cadena simple que comprenden al menos tres monómeros del tipo de los ligandos que pertenecen a la superfamilia del TNF y al menos dos conectores peptídicos que son útiles para unir los monómeros. Sin embargo, en experimentos recientes se ha comprobado que estos polipéptidos de fusión de cadena simple pueden formar
25 agregados de una manera no deseada.

En WO 2010/010051 se describen polipéptidos de fusión de cadena simple que comprenden tres dominios solubles del tipo de las citoquinas que pertenecen a la superfamilia de TNF y al menos dos conectores peptídicos. Los polipéptidos de fusión que se describen no forman agregados de manera sustancial.

30 Más aun, en trabajos anteriores, que abarcan el de Papadopoulos et al. (Cancer Chemother. Pharmacol., 2015, DOI 10.1007/s00280-015-2712-0), se ha

comprobado que la aglomeración de una gran cantidad de receptores de TRAIL puede dar lugar a efectos tóxicos.

Por consiguiente, en la técnica existe la necesidad de agonistas de los receptores de TRAIL novedosos que presenten una actividad biológica alta, una
5 estabilidad alta y una toxicidad baja y que puedan ser elaborados de manera eficiente con procedimientos de recombinación.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente invención se proveen proteínas específicas que son agonistas de los receptores de TRAIL, que son poco susceptibles a la degradación
10 proteolítica, que presentan una vida media prolongada y que dan como resultado una aglomeración escasa de los receptores de TRAIL *in vivo* (por lo que no resultan tóxicas).

Las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL de la presente invención generalmente comprenden (i) un primer dominio soluble de una
15 citoquina del tipo de los TRAIL, (ii) un primer conector peptídico, (iii) un segundo dominio de un TRAIL soluble, (iv) un segundo conector peptídico, (v) un tercer dominio de un TRAIL soluble y (vi) un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc.

En un aspecto, en la presente invención se provee un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende (i) un primer dominio de un TRAIL soluble, (ii)
20 un primer conector peptídico, (iii) un segundo dominio de un TRAIL soluble, (iv) un segundo conector peptídico, (v) un tercer dominio de un TRAIL soluble y (vi) un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc. En una forma de realización, el fragmento de un anticuerpo del tipo Fc (vi) se encuentra en el extremo N del primer dominio de un TRAIL (i) y/o en el extremo C del tercer dominio de un TRAIL (v). En otra
25 forma de realización, el fragmento de un anticuerpo del tipo Fc se encuentra en el extremo C del tercer dominio de un TRAIL (v). En una forma de realización, el polipéptido no forma agregados de manera sustancial. En otra forma de realización, el segundo dominio de un TRAIL soluble y/o el tercer dominio de un TRAIL soluble son dominios acortados en el extremo N que pueden comprender
30 mutaciones a nivel de su secuencia de aminoácidos.

En una forma de realización, al menos uno de los dominios de TRAIL solubles, particularmente al menos uno de los dominios de TRAIL solubles (iii) y

(v), es un dominio de un TRAIL soluble cuya secuencia en el extremo N comienza entre los aminoácidos Gln120 y Val122 de un TRAIL humano, donde el aminoácido Arg121 puede ser reemplazado por un aminoácido neutro, tal como la Ser o la Gly. En otra forma de realización, al menos uno de los dominios de TRAIL solubles, particularmente al menos uno de los dominios de TRAIL solubles (iii) y (v), es un dominio de un TRAIL soluble cuya una secuencia en el extremo N se selecciona entre (a) Arg121-Val122-Ala123 y (b) (Gly/Ser)121-Val122-Ala123. En una forma de realización, el dominio de un TRAIL soluble termina con el aminoácido Gly281 de un TRAIL humano y puede comprender una mutación en uno, dos o más de los siguientes aminoácidos: R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 o D269. En una forma de realización, el dominio de un TRAIL soluble (i) consiste en los aminoácidos Gln120-Gly281 de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1, mientras que los dominios de TRAIL solubles (iii) y (v) consisten en los aminoácidos Arg121-Gly281 de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1.

En una forma de realización, el primer conector peptídico y el segundo conector peptídico (ii) y (iv) presentan de manera independiente una longitud de 3-8 aminoácidos, y en particular presentan una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, preferiblemente comprenden residuos de glicina o de serina y pueden comprender un residuo de asparragina que puede estar glucosilado. En una forma de realización, el primer conector peptídico y el segundo conector peptídico (ii) y (iv) consisten en una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 2. En otra forma de realización, el polipéptido también comprende un dominio que puede actuar como péptido señal en el extremo N, que por ejemplo, puede ser como el que se representa en SEQ ID N° 12, que puede comprender un sitio en el que una proteasa puede efectuar una escisión y que también puede comprender un elemento en el extremo C, el cual puede comprender un dominio útil para el reconocimiento o para la purificación y/o puede conectarse con un dominio de este tipo, tal como una marca del tipo Strep como la que se representa en SEQ ID N° 13.

En una forma de realización, un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc (vi) se fusiona con los dominios de TRAIL solubles (i) y/o (v) a través de un conector que hace las veces de bisagra, el cual preferiblemente es como el que se representa en SEQ ID N° 11. En otra forma de realización, el fragmento de un anticuerpo del tipo Fc (vi) consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 10 ó 17. En una forma de realización, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 14, 15 ó 18.

En otro aspecto, en la presente invención se provee una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprende un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19, 20 ó 21.

En otro aspecto, en la presente invención se provee una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 26, 27, 28, 29 ó 30.

En otro aspecto, en la presente invención se provee una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprende dos polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19. En una forma de realización, los dos polipéptidos están unidos a través de enlaces covalentes, más precisamente a través de tres enlaces disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína 513, 519 y 522 de cada una de las cadenas.

En una forma de realización, uno o más de los residuos de asparragina en las posiciones 168 y 337 de los uno o más polipéptidos se encuentran N-glucosilados. En otra forma de realización, los dos residuos de asparragina en las posiciones 168 y 337 de los uno o más polipéptidos se encuentran N-glucosilados.

En otra forma de realización, los uno o más polipéptidos también son sometidos a modificaciones posteriores a la traducción. En otra forma de realización, las modificaciones posteriores a la traducción comprenden una sustitución de un residuo de glutamina por un residuo de piroglutamato en el extremo N.

En otro aspecto, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista de los receptores de TRAIL

como las que se describen en la presente y uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, en la presente invención se provee una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína agonista de los receptores de TRAIL como la
5 que se ha descrito. En otra forma de realización, en la presente invención se provee un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico como la que se ha descrito. En otra forma de realización, en la presente invención se provee una célula que comprende una molécula de ácido nucleico como la que se ha descrito. En una forma de realización adicional, la célula es
10 una célula eucariota. En otra forma de realización, la célula es una célula de mamífero. En otra forma de realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En otras formas de realización, la célula se selecciona del grupo que consiste en las células CHO-DBX11, CHO-DG44, CHO-S o CHO-K1. En otras formas de realización, la célula se selecciona del grupo que consiste en
15 las células Vero, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK-293, NIH-3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0, CRL7030, HsS78Bst, PER.C6 o SP2/0-Agl4 y las células provenientes de los hibridomas.

En otro aspecto, en la presente invención se provee un método útil para tratar una enfermedad o un trastorno asociado a los TRAIL en un sujeto, que
20 comprende administrarle al sujeto una cantidad eficaz de una proteína agonista de los receptores de TRAIL. En una forma de realización, una proteína agonista de los receptores de TRAIL se administra por sí sola. En otra forma de realización, la proteína agonista de los receptores de TRAIL se administra antes de administrar un segundo agente, de manera simultánea con él o después de él. En una forma
25 de realización adicional, la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en los tumores, las enfermedades infecciosas, las enfermedades inflamatorias, las enfermedades en el metabolismo, los trastornos autoinmunes, las enfermedades degenerativas, las enfermedades asociadas a la apoptosis y los rechazos de trasplantes. En una forma de realización, los tumores son tumores
30 sólidos. En una forma de realización, los tumores pertenecen a un grupo cánceres que consiste en los sarcomas, el cáncer de esófago y el cáncer gástrico. En otra forma de realización, los tumores provienen de un sarcoma o de un fibrosarcoma

de Ewing, En otra forma de realización, los tumores pertenecen a un grupo
 cánceres que consiste en los carcinomas asociados a las células no pequeñas en
 los pulmones (NSCLC), el cáncer de páncreas, el cáncer colorrectal, el cáncer de
 mama, el cáncer de ovario, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer asociados a
 5 las células pequeñas en los pulmones (SCLC). En otra forma de realización, los
 tumores son tumores linfáticos. En una forma de realización, los tumores son
 tumores hematológicos. En otra forma de realización, los tumores provienen de un
 linfoma no Hodgkin, de una leucemia, de una leucemia linfoblástica aguda (ALL),
 de una leucemia mieloide aguda (AML), de una linfoma en las células B, de un
 10 linfoma de Burkitt, de una leucemia mielocítica crónica (CML), de una leucemia
 linfocítica crónica (CLL) o de una leucemia en las células pilosas. En otra forma de
 realización, los trastornos autoinmunes son enfermedades relacionadas con el
 reuma, enfermedades relacionadas con la artritis o enfermedades relacionadas
 tanto con el reuma como con la artritis. En una forma de realización adicional, la
 15 enfermedad o el trastorno son la artritis reumática. En otra forma de realización, la
 enfermedad degenerativa es una enfermedad neurodegenerativa. En una forma
 de realización adicional, la enfermedad neurodegenerativa es la esclerosis
 múltiple.

En una forma de realización, el segundo agente es un agente
 20 quimioterapéutico, un agente radioterapéutico o un agente biológico. En una forma
 de realización, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en el
 duvelisib, el ibrutinib, el navitoclax y el venetoclax, En otra forma de realización, el
 segundo agente es un agente apoptótico. En una forma de realización, el segundo
 agente apoptótico se selecciona del grupo que consiste en el bortezomib, la
 25 azacitidina, el dasatinib y el gefitinib. En una forma de realización particular, las
 composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se administran en
 los pacientes por vía intravenosa o por vía subcutánea. En otras formas de
 realización, las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se
 administran en los pacientes por vía oral, parenteral, intramuscular, intraarticular,
 30 intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria,
 intracelial, intercerebral, intracerebroventricular, intracólica, intracervical,
 intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica,

intrapericardiaca, intraperitoneal, intraprostática, intrapulmonar, intraespinal, intratorácica, intrauterina, intravesical, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, intrapleural, intrarrectal, intrarrenal, intraretinal, intrasinovial o transdérmica o por medio de un bolo.

5 En una forma de realización, la proteína agonista de los receptores de TRAIL se administra a través de un único bolo. En otra forma de realización, la proteína agonista de los receptores de TRAIL puede administrarse en varias dosis divididas. Una proteína agonista de los receptores de TRAIL puede administrarse en una cantidad aproximada de 0,1-100 mg/kg. En una forma de realización, una

10 proteína agonista de los receptores de TRAIL puede administrarse en una dosis aproximada que selecciona del grupo que consiste en 0,1-0,5, 0,1-1, 0,1-10, 0,1-20, 0,1-50, 0,1-75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 1,25-7,5, 2,5-7,5, 2,5-15, 5-15, 5-7,5, 1-20, 1-50, 7-75, 1-100, 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 y 10-100 mg/kg. En otras formas de realización, una proteína agonista de los

15 receptores de TRAIL está presente en una composición farmacéutica en una cantidad aproximada de 0,1-100 mg/ml. En una forma de realización, una proteína agonista de los receptores de TRAIL está presente en una composición farmacéutica en una cantidad aproximada que selecciona del grupo que consiste en 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-

20 10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-50, 5-75, 10-20, 10-50, 10-75 y 10-100 mg/ml. En otras formas de realización, se administra una cantidad eficaz para el uso terapéutico de una proteína agonista de los receptores de TRAIL en un sujeto. En otra forma de realización, se administra cantidad eficaz para el uso profiláctico de una proteína agonista de los receptores de TRAIL en un sujeto.

25 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la figura 1 se representa la estructura de los dominios de un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende tres dominios de TRAIL, donde I, II y III representan los dominios de TRAIL solubles.

En la figura 2 se provee un esquema donde se representa la estructura

30 general de un dominio de un TRAIL. Los cuadrados representan la membrana de la célula y el extremo N se encuentra localizado en el interior de la célula. En 1 se representa el pliegue β antiparalelo del dominio que posibilita la unión al receptor

(RBD). En 2 se representa la interfase entre el RBD y la membrana de la célula. En 3 se representa un sitio en el que una proteasa puede efectuar una escisión.

En la figura 3 se provee un esquema donde se representa la estructura de un trímero de dominios de TRAIL nativos. Las estructuras cilíndricas representan los RBD. En los extremos N, los RBD están unidos a la membrana de la célula.

En la figura 4 se provee un esquema donde se representa la estructura de tres dominios solubles, cada uno de los cuales comprende un dominio en el que puede ocurrir la unión al receptor y proviene de un TRAIL humano, donde I, II y III representan los dominios de TRAIL solubles.

En la figura 5 se representa la trimerización de los dominios solubles que constituyen los RBD de un dominio de un TRAIL, donde el extremo N y el extremo C de los tres dominios solubles forman una superficie.

En la figura 6 se provee un esquema donde se representa la estructura de un dominio de un TRAIL de cadena simple que comprende la totalidad o una parte de la región del tallo, donde puede observarse que se necesitan conectores más largos para compensar la distancia hasta el extremo N del siguiente dominio soluble.

En la figura 7 se representa una proteína de fusión scFv-TRAIL conocida a partir de los antecedentes técnicos.

En la figura 8 se representa una proteína de fusión Fc-TRAIL conocida a partir de los antecedentes técnicos.

En la figura 9A se representa un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende un fragmento adicional de un anticuerpo del tipo Fab.

En la figura 9B se representa un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende un fragmento adicional de un anticuerpo del tipo scFv.

En la figura 10 se representa la dimerización de dos polipéptidos de fusión scFc fusionados a través de enlaces disulfuro en el extremo N.

En la figura 11 se representa la dimerización de dos polipéptidos de fusión scFc fusionados a través de enlaces disulfuro en el extremo C.

En la figura 12 se representa la dimerización de diversos polipéptidos de fusión de cadena simple a través de un conector.

En la figura 13 se representa un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende un fragmento adicional de un anticuerpo del tipo Fab y que también está fusionado con un segundo polipéptido de fusión o con un polipéptido de fusión scFv.

5 En la figura 14 se representa la dimerización de dos polipéptidos de fusión scFab a través de enlaces disulfuro.

En la figura 15 se representan polipéptidos de fusión scFc que están fusionados en el extremo N y que también comprenden fragmentos de anticuerpos del tipo Fv y/o del tipo Fab.

10 En la figura 16 se representan polipéptidos de fusión scFc que están fusionados en el extremo C y que también comprenden fragmentos de anticuerpos del tipo Fv y/o del tipo Fab.

En la figura 17A la proteína agonista de los receptores de TRAIL que se representa a modo de ejemplo comprende un dominio que puede actuar como péptido señal en el extremo N como el que se representa en SEQ ID N° 14. La proteína madura (que no incluye el dominio que puede actuar como péptido señal en el extremo N) se detalla en SEQ ID N° 19.

En la figura 17B se provee un esquema donde se representa la estructura general y precisa de un ejemplo de una proteína agonista de los receptores de
20 TRAIL.

En la figura 18 se representa la preparación de un análisis del tipo de los ELISA que se llevó a cabo para cuantificar los agonistas de los receptores de TRAIL que contenían dominios Fc.

En la figura 19 puede observarse que una proteína agonista de los
25 receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 fue útil para inducir la muerte de células provenientes de diversas líneas tumorales humanas in vitro. Para comprobar esto, se trataron células SKM-1, Colo205 o Jurkat con una concentración creciente de la proteína agonista de los receptores de TRAIL
30 durante 24 horas y se evaluó su viabilidad.

En la figuras 20A-C puede observarse que una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia

de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 presentó una acción sinérgica con diversos agentes antitumorigénicos in vitro. Para comprobar esto, se incubaron células SU-DHL-4 con una concentración creciente de la proteína agonista de los receptores de TRAIL, sin otros componentes o en presencia de venetoclax (figura 20A) o navitoclax (figura 20B) en las concentraciones que se indican durante 24 horas. Como alternativa (figura 20C), se trataron células NCI-H596 con una concentración creciente de la proteína agonista de los receptores de TRAIL, sin otros componentes o en presencia de docetaxel (DTX) en las concentraciones que se indican durante 72 horas. Se determinó la viabilidad de las células y se analizó si había sinergia en función del resultado de una suma de Bliss.

En la figura 21 se representa el efecto que tuvo una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 sobre el crecimiento de los tumores en un modelo basado en el xenoinjerto de células de carcinoma colorrectal de la línea Colo205.

En la figura 22 se representa el efecto que tuvo una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 sobre el crecimiento de los tumores en un modelo basado en el xenoinjerto de células de leucemia mieloide aguda SKM-1.

En la figura 21 se representa el efecto que tuvo una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 sobre el crecimiento de los tumores en un modelo basado en el xenoinjerto de células pulmonares no pequeñas H460LM.

En las figuras 24A-G se representa el efecto que tuvo una proteína agonista de los receptores de TRAIL que comprendía dos polipéptidos que tenían una secuencia de aminoácidos como la que se detalla en SEQ ID N° 19 sobre el crecimiento de los tumores en modelos PDX. Con los rombos, se representa el resultado que se obtuvo con la proteína agonista de los receptores de TRAIL. Con los cuadrados, se representa el resultado que se obtuvo en ausencia del

tratamiento. En particular, se representa el volumen que se obtuvo en el caso de (A) CTG-0069, (B) CTG-0167, (C) CTG-0293, (D) CTG-0785, (E) CTG-0714, (F) CTG-0136 y (G) CTG-0485.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 En el contexto de la presente invención, se descubrió que la fusión entre un dominio de cadena simple que podía unirse a los receptores de TRAIL y un fragmento Fc podía dar como resultado un agonista de los receptores de TRAIL hexavalente, caracterizado por una actividad biológica alta en combinación con una estabilidad apropiada. Como consecuencia, en la presente se provee un
10 polipéptido de fusión de cadena simple que comprende al menos tres dominios de TRAIL solubles conectados a través de dos conectores peptídicos y que comprende un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc en el extremo N y/o en el extremo C.

 Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena simple no puede formar
15 agregados. El término “no puede formar agregados” es una referencia a un contenido de monómeros en una preparación que es de 50% o más, que preferiblemente es de 70% o más y que más preferiblemente es de 90% o más. La proporción entre el contenido de monómeros y el contenido de agregados puede determinarse examinando la cantidad de agregados que se forman por medio de
20 un procedimiento de cromatografía de exclusión en función del tamaño (SEC). La estabilidad relacionada con la agregación puede determinarse por medio de un análisis de SEC después de un período de tiempo definido, que por ejemplo, puede abarcar unos pocos días, varios días, varias semanas o varios meses, bajo diversas condiciones de almacenamiento, por ejemplo, a 4°C o a 25°C. Para
25 afirmar que una proteína de fusión no forma agregados de manera sustancial, es preferible que el contenido de monómeros después de un almacenamiento a 4°C o 25°C durante período de tiempo de varios días, por ejemplo, de 10 días, más preferiblemente de varias semanas, por ejemplo, de 2, 3 ó 4 semanas, y aun más preferiblemente después de varios meses, por ejemplo, de 2 ó 3 meses, sea como
30 se indicó con anterioridad.

 Un polipéptido de fusión de cadena simple puede comprender dominios adicionales, los cuales pueden estar localizados en su extremo N y/o en su

extremo C. A modo de ejemplo, los dominios de fusión adicionales pueden tomar la forma de dominios que pueden actuar como péptidos señal en el extremo N, los cuales a su vez pueden comprender sitios en los que una proteasa puede efectuar una escisión, o bien pueden tomar la forma de elementos en el extremo C, que pueden comprender dominios útiles para el reconocimiento o para la purificación y/o que pueden conectarse con dominios de este tipo. De acuerdo con una forma de realización preferida, el polipéptido de fusión comprende una marca del tipo Strep unida a través de un conector en su extremo C. Un ejemplo de una marca del tipo Strep es el conector corto que comprende serina que se representa en SEQ ID N° 13.

La proteína agonista de los receptores de TRAIL de la presente invención comprende tres dominios de TRAIL solubles. Preferiblemente, los dominios solubles derivan de TRAIL de los mamíferos, y particularmente de los seres humanos, y dentro del alcance de la invención también se incluyen todas las variantes alélicas y/o los derivados posibles. Los dominios solubles comprenden la porción extracelular de un TRAIL, que abarca el dominio en el que tiene lugar la unión al receptor pero no los dominios que se localizan en la membrana. Al igual que otras proteínas de la superfamilia del TNF, los TRAIL se fijan a la membrana a través de una porción de 15-30 aminoácidos que se encuentra en su extremo N, que se conoce como región del tallo. La región del tallo contribuye a la trimerización y provee una cierta distancia hasta la membrana celular. Sin embargo, la región del tallo no forma parte del dominio en el que tiene lugar la unión al receptor (RBD).

Vale destacar que, en su extremo N y en su extremo C, el RBD se caracteriza por aminoácidos que se encuentran en posiciones particulares. Más precisamente, estos aminoácidos se encuentran en posiciones inmediatamente adyacentes, en el área central del eje del trímero. Los primeros aminoácidos que se encuentran en el extremo N del RBD forman una cadena beta antiparalela con los aminoácidos que se encuentran en el extremo C (figuras 2 y 3).

Por lo tanto, la cadena beta antiparalela del RBD forma una interfase con la membrana de la célula, donde la unión a la membrana de la célula y la fijación propiamente dicha tienen lugar a través de los aminoácidos que constituyen la

región del tallo. Resulta particularmente preferible que los dominios de TRAIL solubles que estén presentes en la proteína agonista de los receptores de TRAIL comprendan un dominio en el que pueda tener lugar la unión a los receptores de TRAIL que carezca de cualquiera de los aminoácidos propios de la región del tallo (figuras 4 y 5). De lo contrario, sería necesario introducir un conector largo entre el extremo C de uno de los dominios solubles y el extremo N del dominio soluble siguiente, con el propósito de compensar la presencia de la región del tallo en el extremo N de este último (figura 6), lo cual podría dar como resultado una proteína inestable y/o la formación de agregados.

Una ventaja adicional de los dominios solubles de este tipo es que los aminoácidos hacia el extremo N y el extremo C del RBD no se encuentran en posiciones accesibles para los anticuerpos. Preferiblemente, un polipéptido de fusión de cadena simple puede formar una estructura trimérica ordenada que comprende al menos un sitio funcional en el que puede ocurrir la unión a un receptor de TRAIL determinado.

La proteína agonista de los receptores de TRAIL comprende tres sitios funcionales donde puede ocurrir la unión a los receptores de TRAIL, es decir, secuencias de aminoácidos que son útiles para formar complejos con los receptores de TRAIL. Por lo tanto, cada uno de los dominios solubles puede unirse a un receptor de TRAIL determinado. En una forma de realización, al menos uno de los dominios solubles puede activar un receptor, con lo que puede afectarse la actividad apoptótica y/o proliferativa. En una forma de realización adicional, se seleccionan uno o más dominios solubles que no pueden activar los receptores correspondientes.

Un dominio de un TRAIL soluble puede provenir de un TRAIL humano como el que se detalla en SEQ ID N° 1. Preferiblemente, los dominios de TRAIL solubles provienen de un TRAIL humano que comienza entre los aminoácidos 120 y 122 de SEQ ID N° 1, y que más preferiblemente abarca los aminoácidos 120-281, 121-281 ó 122-281 de SEQ ID N° 1. Opcionalmente, el aminoácido Arg121 de SEQ ID N° 1 puede ser reemplazado por un aminoácido no cargado, tal como la Ser o la Gly.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de un TRAIL humano

SEQ ID N°	Secuencia
1	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVFTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQ MQDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLR QLVRKMILRTSEETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVAAHITGT RGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNG ELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYP DPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVT NEHLIDMDHEASFFGAFLVG

Según se indicó con anterioridad, los dominios de TRAIL solubles pueden comprender la secuencia salvaje que se detalla en SEQ ID N° 1. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que también es posible introducir mutaciones en uno o más de estos dominios solubles, por ejemplo, mutaciones útiles para alterar (por ejemplo, incrementar o disminuir) la capacidad de unión de los dominios solubles. En una forma de realización, pueden seleccionarse dominios solubles que no pueden unirse a los receptores de citoquinas correspondientes.

En otra forma de realización preferida de la invención, el dominio de un TRAIL soluble (i) comprende una variante mutada de un TRAIL o de un dominio de un TRAIL en el que puede tener lugar la unión a un receptor, que puede unirse al receptor de TRAIL 1 (TRAILR1) y/o al receptor de TRAIL 2 (TRAILR2) y/o activarlo. La capacidad de unión y/o la actividad de una variante mutada pueden determinarse, por ejemplo, con análisis como los que se describen en las publicaciones de van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103: 8634-8639), de Kelley et al. (J. Biol. Chem., 2005, 280: 2205-2215) y de MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270).

Las variantes mutadas han de resultar conocidas para aquellos versados en la técnica, pueden generarse con cualquier procedimiento, por ejemplo, según se describe en las publicaciones de van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103: 8634-8639), de Kelley et al. (J. Biol. Chem., 2005, 280: 2205-2215) y de MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270), y pueden comprender mutaciones estructurales de cualquier tipo, como es el caso de las sustituciones, las supresiones, las duplicaciones o las inserciones a nivel de los aminoácidos. Una forma de realización preferida está relacionada con la generación de sustituciones.

Una sustitución puede afectar a al menos un aminoácido de un TRAIL o un dominio de un TRAIL en el que puede tener lugar la unión a un receptor como los que se describen en la presente. En una forma de realización preferida, la sustitución puede afectar a al menos un aminoácido de un TRAIL, por ejemplo, de un dominio de un TRAIL humano (tal como el que se representa en SEQ ID N° 1). En este contexto, las sustituciones preferidas pueden afectar a al menos uno de los siguientes aminoácidos de un dominio de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1: R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 y D269. Las sustituciones preferidas a nivel de los aminoácidos que pueden llevarse a cabo en un dominio de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1 abarcan las siguientes: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R y D269K.

Las una o más sustituciones que pueden realizarse a nivel de los aminoácidos pueden alterar la unión entre un TRAIL, por ejemplo, un dominio de un TRAIL humano, y el TRAILR1 o el TRAILR2, y/o la actividad sobre cualquiera de ellos. Como alternativa, las una o más sustituciones que pueden realizarse a nivel de los aminoácidos pueden alterar la unión entre un TRAIL, por ejemplo, un dominio de un TRAIL humano, y tanto el TRAILR1 como el TRAILR2, y/o la actividad sobre ambos. La unión al TRAILR1 y/o al TRAILR2 y/o la actividad sobre cualquiera de ellos pueden verse afectadas de manera positiva, lo que implica que puede conferírseles una mayor fuerza, una mayor selectividad o una mayor especificidad, y/o que puede obtenerse una activación mayor de los receptores. Como alternativa, la unión al TRAILR1 y/o al TRAILR2 y/o la actividad sobre cualquiera de ellos pueden verse afectadas de manera negativa, lo que implica que pueden tornarse más débiles, menos selectivas o menos específicas, y/o que puede obtenerse una activación menor o incluso nula de los receptores.

Pueden hallarse ejemplos de las variantes de TRAIL de la invención que presentan una o más sustituciones a nivel de los aminoácidos útiles para alterar la unión tanto al TRAILR1 como al TRAILR2 y/o la activación de cualquiera de ellos, por ejemplo, en la tabla 1 de la publicación de MacFarlane et al. que se ha citado, donde se provee una variante mutada de un TRAIL humano como el que se

detalla en SEQ ID N° 1 que presenta sustituciones en los residuos de aminoácidos Y213W y S215D o una sustitución en el residuo de aminoácido Y189A.

Pueden hallarse ejemplos de las variantes de TRAIL de la invención que presentan una o más sustituciones a nivel de los aminoácidos útiles para alterar la unión al TRAILR1 y/o su activación, por ejemplo, en la tabla 1 de la publicación de MacFarlane et al. que se ha citado, donde se provee una variante mutada de un TRAIL humano como el que se detalla en SEQ ID N° 1 que presenta sustituciones en los residuos de aminoácidos N199V, K201R, Y213W y S215D o en los residuos de aminoácidos Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D, así como en la tabla 2 de la publicación de Kelley et al. que se ha citado, donde se provee una variante mutada de un TRAIL humano que presenta sustituciones en los residuos de aminoácidos Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V y K201R o en los residuos de aminoácidos Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R y K201R.

Pueden hallarse ejemplos de las variantes de TRAIL de la invención que presentan una o más sustituciones a nivel de los aminoácidos útiles para alterar la unión al TRAILR2 y/o su activación, por ejemplo, en la tabla 1 de la publicación de MacFarlane et al. que se ha citado o en la tabla 2 de la publicación de Kelley et al. que se ha citado, donde se provee una variante mutada de un TRAIL humano como el que se detalla en SEQ ID N° 1 que presenta sustituciones en los residuos de aminoácidos Y189Q, R191 K, Q193R, H264R, I266L y D267Q, así como en la tabla 2 de la publicación de van der Sloot et al. que se ha citado, donde se provee una variante mutada de un TRAIL humano que presenta una sustitución en el residuo de aminoácido D269H, en los residuos de aminoácidos D269H y E195R o en los residuos de aminoácidos D269H y T214R.

Por lo tanto, una forma de realización preferida es una proteína agonista de los receptores de TRAIL que es como las que se describen en la presente, donde al menos uno de los dominios solubles comprende una variante mutada de un TRAIL o de un dominio de un TRAIL en el que puede tener lugar la unión a un receptor, que puede unirse al TRAILR1 y/o al TRAILR2 y/o activarlos.

Otros ejemplos de variantes mutadas de TRAIL que dan como resultado una menor agregación de los TRAIL inducida por los receptores abarcan las que

presentan sustituciones en los residuos de aminoácidos H168 (por S, T o Q), R170 (por E, S, T o Q) o H177 (por S o T).

Una forma de realización preferida de una proteína agonista de los receptores de TRAIL y que comprende una variante mutada de un TRAIL o de un dominio de un TRAIL en el que puede tener lugar la unión a un receptor como las que se describen en la presente es una proteína agonista de los receptores de TRAIL en la cual el componente (i) presenta al menos una sustitución a nivel de los aminoácidos, que en particular es como las que se detallan a continuación.

Las sustituciones a nivel de los aminoácidos que se han descrito pueden afectar a al menos uno de los residuos de aminoácidos de un TRAIL humano (SEQ ID N° 1) que se detallan a continuación: R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 o D269.

Una sustitución a nivel de los aminoácidos como las que se han mencionado puede abarcar al menos una de los siguientes: R130E, G160M, H168 (por S, T o Q), R170 (por E, S, T o Q), H177 (por S o J), Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R o D269K.

Un dominio preferido con selectividad por el TRAILR2 comprende las siguientes sustituciones a nivel de los aminoácidos: Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L y D267Q.

Un dominio preferido con selectividad por el TRAILR1 comprende las siguientes sustituciones a nivel de los aminoácidos: Y189A, Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D.

Una molécula de fusión de cadena simple de la presente invención comprende tres dominios de TRAIL solubles, a saber, los componentes (i), (iii) y (v). La estabilidad de un polipéptido de fusión de cadena simple que comprende dominios de TRAIL ante la agregación es mayor cuando el segundo dominio de un TRAIL soluble y/o el tercer dominio de un TRAIL soluble toman la forma de dominios acortados en el extremo N, que opcionalmente pueden comprender mutaciones a nivel de su secuencia de aminoácidos. Como consecuencia, preferiblemente, tanto el segundo dominio de un TRAIL soluble como el tercer

dominio de un TRAIL soluble toman la forma de dominios acortados en el extremo N, y opcionalmente pueden comprender mutaciones a nivel de la secuencia de aminoácidos de sus regiones hacia el extremo N, preferiblemente en los primeros cinco aminoácidos hacia el extremo N. Estas mutaciones pueden abarcar la
 5 sustitución de diversos aminoácidos cargados, que por ejemplo, pueden ser ácidos o básicos, por aminoácidos neutros, particularmente por serina o por glicina.

En contraste, la selección del primer dominio de un TRAIL soluble no es tan crítica. En este caso, puede emplearse un dominio soluble cuya secuencia en el
 10 extremo N se encuentra completa. Sin embargo, vale destacar que el primer dominio de un TRAIL soluble también puede comprender una secuencia acortada en el extremo N, la cual opcionalmente puede estar mutada.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, los dominios de TRAIL solubles (i), (iii) y (v) toman la forma de dominios de TRAIL
 15 humanos solubles. El primer dominio de un TRAIL soluble (i) puede seleccionarse entre las secuencias nativas, las secuencias acortadas y las secuencias mutadas. Por lo tanto, el primer dominio de un TRAIL soluble (i) presenta una secuencia en el extremo N que puede comenzar entre los aminoácidos Glu116 y Val122 de un TRAIL humano, donde el aminoácido Arg121 puede ser reemplazado por un
 20 aminoácido neutro, tal como la Ser o la Gly. El segundo dominio de un TRAIL soluble (iii) y el tercer dominio de un TRAIL soluble (v) presentan una secuencia acortada en el extremo N, que preferiblemente comienza entre los aminoácidos Gln120 y Val122 de un TRAIL humano, donde el aminoácido Arg121 puede ser sustituido por otro aminoácido, tal como la Ser o la Gly.

25 Preferiblemente, la secuencia en el extremo N de los dominios de TRAIL solubles (iii) y (v) se selecciona entre

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

El dominio de un TRAIL soluble preferiblemente finaliza en el aminoácido
 30 Gly281 de un TRAIL humano. En determinadas formas de realización, el dominio de un TRAIL puede comprender mutaciones internas como se las que se describieron con anterioridad.

Los componentes (ii) y (iv) de la proteína agonista de los receptores de TRAIL son elementos que pueden actuar como péptidos conectores y están localizados entre los componentes (i) y (iii) o (iii) y (v). Los elementos conectores flexibles tienen una longitud de 3-8 aminoácidos, y en particular tienen una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos. Los elementos conectores preferiblemente comprenden residuos de glicina o de serina, es decir, se trata de conectores peptídicos que consisten sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. Cuando el dominio de una citoquina soluble finaliza en un aminoácido S o G (en el extremo C), lo que por ejemplo, puede observarse en un TRAIL humano, el conector comienza después del aminoácido S o G. Cuando el dominio de una citoquina soluble comienza en un aminoácido S o G (en el extremo N), el conector termina antes del aminoácido S o G.

Vale destacar que no es imprescindible que el conector (ii) y el conector (iv) presenten una longitud idéntica. Con el propósito de disminuir la inmunogenicidad potencial, puede resultar preferible emplear conectores más cortos. Adicionalmente, los conectores más cortos dan como resultado moléculas de cadena simple que se caracterizan por una tendencia reducida a formar agregados. En contraste, si se emplean conectores sustancialmente más largos que los que se describen en la presente, puede provocarse una agregación desfavorable.

Si se lo desea, un conector puede comprender un residuo de asparragina que puede formar un sitio glucosilado Asn-Xaa-Ser. En determinadas formas de realización, uno de los conectores, por ejemplo, el conector (ii) o el conector (iv), comprende un sitio glucosilado. En otras formas de realización, los dos conectores (iv) comprenden sitios glucosilados. Con el fin de incrementar la solubilidad de las proteínas de cadena simple que comprenden dominios de TRAIL y/o con el objeto de disminuir la inmunogenicidad potencial, puede resultar preferible que el conector (ii), el conector (iv) o ambos comprendan un sitio glucosilado.

Las secuencias preferidas para los conectores se seleccionan entre GSGSGSGS (SEQ ID N° 3), GSGSGNGS (SEQ ID N° 2), GGSGSGSG (SEQ ID N° 4), GGSGSG (SEQ ID N° 5), GGSG (SEQ ID N° 6), GGSGNGSG (SEQ ID N° 7), GGNGSGSG (SEQ ID N° 8), GGNGSG (SEQ ID N° 9) y GSGS (SEQ ID N° 23).

De acuerdo con una forma de realización más preferida, las secuencias conectoras son GSGSGNGS, que se representa en SEQ ID N° 2. En la tabla 2 se proveen ejemplos de las secuencias conectoras.

Tabla 2. Ejemplos de secuencias conectoras

SEQ ID N°	Secuencia
2	GSGSGNGS
3	GSGSGSGS
4	GGSGSGSG
5	GGSGSG
6	GGSG
7	GGSGNGSG
8	GGNGSGSG
9	GGNGSG
22	GSGSGS
23	GSGS
24	GSG

5 La proteína agonista de los receptores de TRAIL también comprende un dominio que es un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc, que puede estar localizado en el extremo N del primer dominio de un TRAIL (i) y/o en el extremo C del tercer dominio de un TRAIL (v). Preferiblemente, el dominio que es un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc comprende una secuencia de aminoácidos
10 como la que se representa en SEQ ID N° 10 o consiste en ella. Como alternativa, el dominio que es un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc comprende una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 17 o consiste en ella. En la tabla 3 se proveen ejemplos de dominios del tipo de los fragmentos Fc.

15 **Tabla 3. Ejemplos de dominios del tipo de los fragmentos Fc**

SEQ ID N°	Secuencia
10	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL

DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK
17 PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK

La cantidad total de sitios glucosilados y la localización tridimensional de cada uno de los hidratos de carbono afectan la estabilidad in vivo de las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL. Por otra parte, el reconocimiento de los hidratos de carbono depende de la densidad local de los sacáridos terminales, de la ramificación del árbol de los hidratos de carbono y de la posición relativa de los hidratos de carbono.

Es necesario eliminar los hidratos de carbono de los dominios CH2 para evitar un entrecruzamiento mediado por los receptores Fc in vivo, así como la toxicidad potencial debida a la aglomeración de una gran cantidad de receptores de TRAIL. Por otro lado, los hidratos de carbono parcialmente degradados dan como resultado una disminución en la vida media in vivo que pueden presentar las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL, a través de mecanismos mediados por las lectinas. Si se reduce la cantidad total de sitios glucosilados en una molécula, puede obtenerse un producto menos susceptible a estos mecanismos y puede incrementarse su vida media. Por consiguiente, en una forma de realización, la cantidad total de sitios glucosilados en las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL de la presente invención se redujo eliminando los sitios glucosilados en los dominios CH2, con lo que fue posible obtener proteínas agonistas de los receptores de TRAIL que comprendieron mutaciones equivalentes a N297S (de acuerdo con el sistema de numeración de la UE) y que presentaron dominios CH2 no glucosilados.

Los sitios glucosilados presentes en las superficies interiores de los dominios CH2 normalmente confieren protección contra la acción de las proteasas durante las “transiciones entre las conformaciones abiertas de los fragmentos Fc”,

en cuyo transcurso se reducen los enlaces disulfuro que hacen las veces de bisagras entre las cadenas, lo que da como resultado la interrupción de los enlaces covalentes entre las cadenas. Esto posibilita la disociación de los dominios CH2 y la exposición de la superficie interior a las proteasas.

5 Como consecuencia de lo anterior, es probable que las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL que comprendan mutaciones equivalentes a N297S (de acuerdo con el sistema de numeración de la UE) y que presenten dominios CH2 no glucosilados sean menos estables ante la proteólisis que las estructuras salvajes equivalentes que comprendan dominios CH2 glucosilados. Esto podría
10 afectar la estabilidad de los compuestos durante el procesamiento preliminar, durante el procesamiento ulterior y durante el almacenamiento, en cuyo transcurso hay proteasas de las células huésped presentes que tienen un acceso a largo plazo a la estructura. Por consiguiente, en determinadas formas de realización, un agonista de los receptores de TRAIL carece de sitios glucosilados en el dominio
15 CH2 pero comprende sitios glucosilados en las secuencias que conectan las diversas cadenas polipeptídicas que lo constituyen (por ejemplo, GSGSGNGS, que se representa en SEQ ID N° 2). A modo de ejemplo, en determinadas formas de realización, un agonista de los receptores de TRAIL comprende dos sitios glucosilados en cada una de las cadenas polipeptídicas que lo constituyen, es
20 decir, comprende un total de cuatro sitios glucosilados.

 De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el dominio que es un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc se fusiona a través de un elemento conector que hace las veces de bisagra. El elemento conector que hace las veces de bisagra tiene una longitud de 10-30 aminoácidos, y en particular
25 tiene una longitud de 15-25 aminoácidos, por ejemplo, de 22 aminoácidos. El elemento conector que hace las veces de bisagra preferiblemente comprende una secuencia que corresponde a la región que hace las veces de bisagra de una inmunoglobulina, que en la presente se conoce como la “región de la bisagra de una Ig”. El término “región de la bisagra de una Ig” se aplica a cualquier
30 polipéptido cuya secuencia de aminoácidos presenta identidad o similitud con una porción de la secuencia de la región que hace las veces de bisagra de una Ig de origen natural, que incluye los residuos de cisteína en los cuales están presentes

los enlaces disulfuro a través de los cuales se unen las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina.

Los derivados y los análogos de la región de la bisagra pueden obtenerse como resultado de diversas mutaciones. En la presente, una referencia a un
 5 derivado o a un análogo es una referencia a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos presenta identidad o similitud con la secuencia de la proteína salvaje completa (o de origen natural), donde las una o más diferencias que pueden observarse a nivel de su secuencia de aminoácidos pueden atribuirse a supresiones, a inserciones y/o a sustituciones. Sin embargo, de acuerdo con la
 10 presente invención, el alcance del término “conector que hace las veces de bisagra” no se encuentra limitado a aquellos conectores que comprenden la región de la bisagra de una Ig o un derivado de ésta, sino que abarcan todos los conectores que son suficientemente largos para posibilitar que los dominios que estén unidos a través de él adopten una conformación con actividad biológica.

15 La cantidad de moléculas con fragmentos Fc que presentan una conformación abierta en una proteína agonista de los receptores de TRAIL depende de la cantidad de enlaces disulfuro que están presentes en la región que hace las veces de bisagra entre las cadenas. Por consiguiente, en una forma de realización, se introdujo un tercer residuo de cisteína en la región de la bisagra de
 20 las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL de la presente invención con el fin de mejorar el efecto de eliminación de los sitios glucosilados en los dominios CH2.

Las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL de la invención también comprenden una mutación de lisina por glicina en la parte superior de la bisagra
 25 para disminuir la susceptibilidad al procesamiento proteolítico en el sitio.

Un elemento conector que hace las veces de bisagra particularmente preferido comprende una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 11 (tabla 4) o consiste en ella.

Una proteína agonista de los receptores de TRAIL también puede
 30 comprender un dominio que puede actuar como péptido señal en el extremo N, que puede posibilitar el procesamiento, por ejemplo, la secreción extracelular, en una célula huésped apropiada. Preferiblemente, el dominio que puede actuar

como péptido señal y que se encuentra en el extremo N comprende un sitio en el que una proteasa puede efectuar una escisión, por ejemplo, un sitio en el que una proteasa puede escindir el péptido señal después de la expresión o en su transcurso, de modo tal de obtener una proteína madura. Un dominio preferido
5 que puede actuar como péptido señal y que se encuentra en el extremo N comprende una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 12 (tabla 4).

Una proteína agonista de los receptores de TRAIL también puede comprender un elemento en el extremo C que tiene una longitud, por ejemplo, de
10 1-50 aminoácidos, y preferiblemente de 10-30 aminoácidos, el cual puede comprender un dominio útil para el reconocimiento o para la purificación y/o puede conectarse con un dominio de este tipo, como podría ser el caso de un dominio FLAG, una marca del tipo Strep, una marca del tipo Strep II y/o un dominio de poli-His. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, el
15 polipéptido de fusión comprende una marca del tipo Strep fusionada con el extremo C a través de un conector corto que comprende serina, tal como el que se representa en SEQ ID N° 13 (tabla 4).

En la tabla 4 se provee un ejemplo de un elemento conector que puede ser útil como bisagra, de un dominio que puede actuar como péptido señal en el
20 extremo N y de un conector que comprende serina.

Tabla 4. Ejemplos de dominios y de conectores

SEQ ID N°	Secuencia
11	GPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
12	METDTLLVFVLLVWVPAGNG
13	SSSSSSAWSHQPFEK
25	GPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPC

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida de la invención, el polipéptido de fusión comprende tres dominios de TRAIL solubles conectados a través de elementos conectores como el que se representa en SEQ
25 ID N° 2. El primer dominio de un TRAIL soluble (i) consiste en los aminoácidos 120-281 de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1, mientras que los dominios de TRAIL solubles (iii) y (v) consisten en los

aminoácidos 121-281 de un TRAIL humano como el que se representa en SEQ ID N° 1. Además, el polipéptido de fusión comprende un dominio que es un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc como el que se representa en SEQ ID N° 10, que está fusionado en su extremo C con el dominio de un TRAIL soluble (v) a través de un conector que hace las veces de bisagra como el que se representa en SEQ ID N° 11. Los inventores descubrieron que un polipéptido de fusión de este tipo sorprendentemente presenta una actividad biológica superior y resulta particularmente estable. En SEQ ID N° 19 se provee la secuencia de aminoácidos de un ejemplo de una proteína agonista de los receptores de TRAIL de acuerdo con una forma de realización de la invención.

Más aun, un polipéptido de fusión puede comprender un dominio que puede actuar como péptido señal, por ejemplo, en el extremo N, que puede ser como el que se representa en SEQ ID N° 12. En SEQ ID N° 14 se provee un ejemplo específico de una proteína agonista de los receptores de TRAIL de la invención.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, un polipéptido de fusión también puede comprender una marca del tipo Strep en el extremo C, que puede estar fusionada con el polipéptido de la invención a través de un conector corto que comprende serina como el que se representa en SEQ ID N° 13. De acuerdo con este aspecto de la invención, un fragmento Fc preferiblemente consiste en una secuencia de aminoácidos como la que se representa en SEQ ID N° 10 ó 17. Adicionalmente, un fragmento Fc puede consistir en un fragmento Fc más corto, que por ejemplo, puede abarcar los aminoácidos 1-217 de SEQ ID N° 10. En SEQ ID N° 15 y 18 se proveen ejemplos particularmente preferidos de polipéptidos de fusión que comprenden una marca del tipo Strep en el extremo C.

Los ejemplos de proteínas agonistas de los receptores de TRAIL que se representan en SEQ ID N° 14, 15 y 18 comprenden un dominio que puede actuar como péptido señal en el extremo N. El dominio que puede actuar como péptido señal abarca los aminoácidos 1-20. En cada caso, la proteína madura comienza en el aminoácido 21. En SEQ ID N° 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29, y 30 se provee un ejemplo de una proteína agonista de los receptores de TRAIL madura de la presente invención. Los ejemplos de proteínas agonistas de los receptores de TRAIL que se describieron con anterioridad se detallan en la tabla 5.

El agonista de los receptores de TRAIL que se representa en SEQ ID N° 19 comprende una menor cantidad total de sitios glucosilados (la mutación N297S en la región CH2 da como resultado un dominio CH2 no glucosilado), una mayor cantidad de enlaces disulfuro entre las cadenas en la región de la bisagra y una mutación de lisina por glicina en la parte superior de la bisagra. Estas alteraciones se traducen en una disminución en el potencial de degradación y en la susceptibilidad a que se aglomere una gran cantidad de receptores de TRAIL (lo que podría resultar tóxico), así como en un incremento en la vida media de la molécula. En algunas formas de realización, se sustituye un residuo de glutamina por un residuo de piroglutamato en el extremo N (Liu et al., 2011, J. Biol. Chem., 286: 11211-11217).

Tabla 5. Ejemplos de proteínas agonistas de los receptores de TRAIL

SEQ ID N°	Secuencia
14	METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKN EKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQT YFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSK DAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL VGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS WESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKE NTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIY QGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNG SRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKEND RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
15	METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKN

EKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQT
YFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSK
DAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL
VGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS
WESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKE
NTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIY
QGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNG
SRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GSSSSSSAWSHQPFEK

18 METDTLLVFVLLVWVPAGNGQRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKN
EKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQT
YFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSK
DAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFL
VGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINS
WESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKE
NTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIY
QGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNG
SRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGPGSSSSSSSGSCDKTHT
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT

KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K
19 QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPN
SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY
SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSC
WSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFF
GAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
20 LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPN
SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY
SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSC
WSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFF
GAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP

21

KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK
QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPN
SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY
SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSC
WSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFF
GAFLVGGPGSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

26

QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPN
SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIY

27

SQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSC
WSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFF
GAFLVGGPGSSSSSSSGSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK
QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK
ALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF
RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKD
AEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
GGPGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK

28

QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGR
SNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIH

EKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLM
KSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDM
DHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK
ALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYF
RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKD
AEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
GGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK
QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
LSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKEND
RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGNGSRVAAHITGTR
GRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGEL
VIHEKGFYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPI
LLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLI
DMDHEASFFGAFLVGGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK
ALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYIYSQTYF
RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKD
AEYGLYSIQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
GGPGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

QRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF
 LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQ
 YIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKEND
 RIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGR
 SNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGHSF LSNLHLRNGELVIH
 EKGFFYYIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLM
 KSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDM
 DHEASFFGAFLVGGSGSGSRVAAHITGTRGRSNTLSSPNSKNEK
 30 ALGRKINSWESSRSGHSF LSNLHLRNGELVIHEKGFYYIYSQTYF
 RFQEEIKENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKD
 AEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
 GGPSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína agonista de los receptores de TRAIL como las que se describen en la presente. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN, por ejemplo, una molécula de ADN de
 5 cadena doble o de cadena simple, o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína agonista de los receptores de TRAIL o un precursor de ésta, por ejemplo, una proforma o una preforma de la proteína agonista de los receptores de TRAIL, que puede comprender una secuencia señal u otras porciones de aminoácidos heterólogos para la secreción o la purificación,
 10 las cuales preferiblemente han de hallarse en el extremo N y/o en el extremo C. Las porciones de aminoácidos heterólogos pueden estar unidas al primer dominio y/o al segundo dominio a través de un sitio en el que una proteasa puede efectuar una escisión, tal como los que pueden hallarse en el factor X3, en la trombina o en la IgA. Un ejemplo específico de una secuencia de ácido nucleico de la invención

se representa en la tabla 6 como SEQ ID N° 16. Esta molécula de ácido nucleico codifica el polipéptido de fusión que se representa en SEQ ID N° 14.

Tabla 6. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican ejemplos de proteínas agonistas de los receptores de TRAIL

SEQ ID N°	Secuencia
16	gatatcggtagccaccatggaaccgacaccctgctggtgtcgtgctgctcgtgtggg tgccagccggcaatggacagagagtggccgctcatatcaccggcaccggggcagat ctaacaccctgtccagccccaactccaagaacgagaaggccctgggccggaagatca actcctgggagtcctccagatccggccactcctttctgtccaacctgcacctgagaaacgg cgagctggatcatccacgagaagggcttactacatctactcccagacctacttcaggtttc aggaagagatcaaagagaacacaaagaacgacaagcagatggtgcagtatatctac aagtacacctctaccccgaccccatcctgctgatgaagtccgcccgaactcctgctgg tccaaggatgctgagtacggcctgtacagcatctaccagggcggcatcttcgagctgaa agagaacgaccggatcttcgtgtccgtgaccaacgagcacctgatcgacatggaccac gaggccagcttttcggcgcccttctcgtgggcggatccggaagcggaaacggcagtag agtggctgcccacattaccggaaccagaggccggtccaacaccctgagcagccctaac agcaaaaatgagaaagctctcgggcgcaagatcaacagctgggaatctagcagaagc ggccacagctttctgagcaatctgcatctgcggaacggcgaactcgtgattcatgagaag gggtttattatatctatagccagacatactttcgattccaggaggaaatcaaggaaaaca ccaaaaatgataaacagatggtccagtacattataagtataaccagctaccctgatcctat cctcctcatgaagtctgccagaaactctgttgaggcaaggacgccgagtatggactgta ctctatctatcagggggggatctttgaactcaaagaaaacgatcgcatctttgtcagcgtca ccaatgagcatctcattgatatggatcatgaagctagtttctcggggcattcctcgtgggag gctccggctctggcaacggatctagagtcgccgcacacatcacagggaccagaggca gaagcaataccctgtcctcccaaatagtaaaaacgaaaaggcactcggccgcaaaat taattcctgggagagcagcagatccgggcacagtttctgtctaattcctatctgaggaatg gggagctggtgattcacgaaaaaggattttactacattacagtcagacttactttcgtttca ggaagagattaaggaaaataccaaaaacgacaagcagatggtccagtacatctataa atacacctcttatcctgacccaattctgctcatgaagagtgcccgcaacagctgctggtcta aagacgccgaatacgggctgtattccattaccaggggggaattttgagctgaaggaaa atgatcggattttgtctctgtcacaacgaacacctcatcgatatggatcacgaagcctctt tctttggcgccctcctggtcggaggccctggctcgagttccagctcctcttctggctcctgcga

caagacccacacctgtccccctgtcctgcccctgaactgctgggcggaccttccgtgtcc
 tgtccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgacccccgaagtgcctgc
 gtggtggtgatgtgttcacgaggaccctgaagtgaagttcaattggtacgtggacggc
 gtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtactcctccacctac
 cgggtggtgtctgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaa
 gtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgccccatcgaaaagaccatctccaaggcc
 aagggccagccccgggaaccccagggtgtacacactgccccctagccgggaagagat
 gaccaagaaccagggtgtccctgacctgcctggtaagggttttaccctccgacattgcc
 gtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccccctgtg
 ctggactccgacggctcattcttctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgggtggc
 agcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacc
 cagaagtccctgtccctgagccccggcaaataatgatagaagcttgatatac

La molécula de ácido nucleico puede estar unida operativamente a una
 secuencia apropiada para controlar la expresión, que por ejemplo, puede ser una
 secuencia útil para posibilitar la expresión de la molécula de ácido nucleico en la
 célula huésped deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar localizada en
 5 un vector, que por ejemplo, puede ser un plásmido, un bacteriófago, un vector viral
 o un vector de integración cromosómica, entre otras posibilidades. Se proveen
 ejemplos de las secuencias útiles para controlar la expresión y de los vectores
 apropiados, por ejemplo, en las publicaciones de Sambrook et al. (1989),
 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, y de Ausubel
 10 et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, así como
 en las ediciones más recientes de cualquiera de ellas.

Pueden usarse diversos sistemas de vectores y células huésped para llevar
 a cabo la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las
 proteínas agonistas de los receptores de TRAIL de la presente invención. Las
 15 células huésped apropiadas abarcan, sin limitaciones, las células huésped
 procariotas, tales como las bacterias, por ejemplo, *E. coli*, las células huésped
 eucariotas, tales como las células de las levaduras, las células de los insectos, las
 células de las plantas o las células de los animales, preferiblemente las células de
 los mamíferos y más preferiblemente las células humanas. Por otra parte, la
 20 invención está relacionada con un organismo no humano que ha sido

transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como las que se describieron con anterioridad. Estos organismos transgénicos pueden generarse con métodos para transferir genes conocidos, tales como la recombinación homóloga.

5 Un aspecto adicional de la presente invención está relacionado con una composición farmacéutica o de diagnóstico que como agente activo comprende al menos una proteína agonista de los receptores de TRAIL, un ácido nucleico que la codifica o una célula transformada o transfectada, tal como los que se describen en la presente.

10 El término “enfermedad o trastorno asociado a los TRAIL”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a cualquier enfermedad o cualquier trastorno que puede beneficiarse con la aplicación de un agonista de los receptores de TRAIL.

 Al menos una proteína agonista de los receptores de TRAIL, un ácido
15 nucleico que la codifica o una célula transformada o transfectada, tal como los que se describen en la presente, puede resultar útil en la terapia, por ejemplo, en la profilaxis y/o el tratamiento de aquellos trastornos que son provocados por las disfunciones a nivel de los TRAIL, que están asociados a dichas disfunciones y/o que están acompañados por ellas, lo que en particular abarca los trastornos
20 relacionados con la proliferación, como es el caso de los tumores, por ejemplo, los tumores sólidos o linfáticos, las enfermedades infecciosas, las enfermedades inflamatorias, las enfermedades en el metabolismo, los trastornos autoinmunes, por ejemplo, las enfermedades relacionadas con el reuma o con la artritis, las enfermedades degenerativas, por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas,
25 tales como la esclerosis múltiple, las enfermedades asociadas a la apoptosis y los rechazos de trasplantes.

 El término “disfunción a nivel de los TRAIL”, tal como se lo emplea en la presente, hace referencia a una función o expresión de un TRAIL que no son normales, como podría ser el caso de una expresión excesiva, reducida o nula de
30 una proteína que puede actuar como TRAIL o del gen que la codifica, en comparación con el nivel de expresión que presenta dicho TRAIL bajo condiciones fisiológicos normales, o bien una actividad de unión excesiva, reducida o nula de

un TRAIL, por ejemplo, con relación a un receptor, tal como un receptor de TRAIL o de otra molécula del tipo de las citoquinas.

En diversas formas de realización, se provee un método que es útil para diagnosticar y/o tratar un trastorno que puede ser diagnosticado y/o tratado sobre la base de la guía hacia los receptores de TRAIL en un sujeto humano, que comprende administrarle al sujeto humano una proteína agonista de los receptores de TRAIL como las que se describen en la presente, de manera tal de obtener un efecto agónico sobre la actividad en uno o más blancos, aliviar uno o más síntomas y/o completar el tratamiento. Las proteínas agonistas de los receptores de TRAIL que se describen en la presente pueden usarse para diagnosticar y/o tratar cánceres primarios o metastáticos en los seres humanos, donde los cánceres primarios o metastáticos abarcan los carcinomas en las mamas, en el colon, en el recto, en los pulmones (como es el caso del cáncer asociado a las células pequeñas en los pulmones, "SCLC", o el cáncer asociado a las células no pequeñas en los pulmones, "NSCLC"), en la orofaringe, en la hipofaringe, en el esófago, en el estómago, en el páncreas, en el hígado, en la vesícula biliar, en los conductos biliares, en el intestino delgado, en el tracto urinario (lo cual abarca los riñones, la vejiga y el urotelio), en el tracto genital femenino (lo cual abarca partes como el cuello del útero, el propio útero o los ovarios y trastornos como el coriocarcinoma o la enfermedad trofoblástica de la gestación), en el tracto genital masculino (lo cual abarca partes como la próstata, las vesículas seminales o los testículos y trastornos como los tumores que afectan a las células germinales), en las glándulas endocrinas (lo cual abarca la tiroides, las glándulas suprarrenales y la pituitaria) o en la piel, los hemangiomas, los melanomas, los sarcomas (los cuales abarcan los sarcomas que derivan de los tejidos óseos o blandos y el sarcoma de Kaposi), los tumores en el cerebro, en los nervios, en los ojos o en las meninges (lo cual abarca trastornos como los astrocitomas, los gliomas, los glioblastomas, los retinoblastomas, los neuromas, los neuroblastomas, los schwannomas y los meningiomas), los tumores derivados de las neoplasias hematopoyéticas, la leucemia aguda, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia mieloide aguda (LMA), los linfomas en las células B, el linfoma de Burkitt, la leucemia mieloide crónica (LMC), la leucemia linfocítica crónica (LLC), la

leucemia en las células pilosas, los linfomas no Hodgkin, los linfomas de Hodgkin, los DLBCL, los linfomas foliculares, las neoplasias hematopoyéticas, el sarcoma de Kaposi, los linfomas malignos, la histiocitosis maligna, los melanomas malignos, los mielomas múltiples, el síndrome paraneoplásico, la hipercalcemia
5 maligna y los tumores sólidos.

Se provee una composición farmacéutica que comprende una proteína agonista de los receptores de TRAIL como las que se describen en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende al menos un agente adicional que es útil
10 para tratar un trastorno determinado. A modo de ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico, un agente quimioterapéutico, un agente útil en el contexto del diagnóstico por imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de la angiogénesis, un inhibidor de una quinasa (lo que abarca, sin limitaciones, los inhibidores de las KDR y los inhibidores de TIE-2), una molécula útil para modular
15 de manera concurrente la estimulación, un inhibidor de los puntos de verificación en el sistema inmune (lo que abarca, sin limitaciones, los tratamientos que están basados en el uso de anticuerpos 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, anti-
20 proteínas de fusión livianas, anti-CD137, anti-CD137L, anti-OX40, anti-OX40L, anti-CD70, anti-CD27, anti-GAL9, anti-A2AR, anti-KIR, anti-IDO-1 o anti-CD20), un agente útil para modular las células dendríticas o las células presentadoras de antígenos (lo que abarca, sin limitaciones, los anticuerpos anti-CD40, anti-CD40 L, anti-DC-SIGN, anti-dectina-1, anti-CD301, anti-CD303, anti-CD123, anti-CD207, anti-DNGR1, anti-CD205, anti-DCIR, anti-CD206 o anti-ILT7), un agente útil para modular los receptores del tipo Toll (lo que abarca, sin limitaciones, los anticuerpos 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 o anti-TLR-9), un agente útil para bloquear las moléculas que participan en la adhesión (lo que abarca, sin limitaciones, los anticuerpos anti-LFA-1, los anticuerpos anti-selectinas E/L y las moléculas pequeñas que pueden actuar como inhibidores), un anticuerpos dirigido contra una citoquina o contra un fragmento funcional de una citoquina (lo que abarca, sin
30

limitaciones, los anticuerpos anti-IL-18, anti-TNF o anti-IL-6 y los anticuerpos que están dirigidos a los receptores de citoquina específicos), un agente biespecífico útil para redirigir la citotoxicidad provocada por las células T o NK (lo que abarca, sin limitaciones, el producto BiTE®), una terapia basada en el uso de receptores quiméricos de las células T (CAR-T), una terapia basada en el uso de receptores de las células T (TCR), una vacuna terapéutica contra el cáncer, el metotrexato, la ciclosporina, la rapamicina, FK506, una marca o un indicador detectable, un antagonista del TNF, un agente antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un droga antiinflamatoria no esteroidea (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un agente antimicrobiano, un agente antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, un agente útil para la inmunización, una inmunoglobulina, un agente inmunosupresor, una hormona de crecimiento, una droga útil para sustituir una hormona, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento útil para combatir el asma, un agonista beta, un esteroide inhalable, la epinefrina, un análogo de la epinefrina, una citoquina o un antagonista de una citoquina.

En una forma de realización relacionada con un método que es útil para tratar un cáncer o para prevenir o inhibir las metástasis a partir de un tumor como los que se describen en la presente, pueden usarse una o más proteínas agonistas de los receptores de TRAIL por sí solas o en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, con un agente quimioterapéutico, con una radioterapia o con un agente biológico. En algunas formas de realización, el agente puede ser cualquiera de los que se detallan a continuación: ácido 13-cis-retinoico (2-CdA), 2-clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), abraxano, Accutane®, actinomicina-D, adriamicina, Adrucil®, Afinitor®, Agrylin®, Ala-Cort®, aldesleuquina, alemtuzumab, ALIMTA, alitretinoína, Alkaban-AQ®, Alkeran®, ácido retinoico completamente trans, interferón alfa, altretamina, ametofterina, amifostina, aminoglutetimida, anagrelide, Anandron®, anastrozol, arabinosilcitosina, Ara-C Aranesp®, Aredia®, Arimidex®, Aromasin®, Arranon®, trióxido de arsénico, Arzerra™, asparraginas, ATRA, Avastin®, azacitidina, BCG, BCNU,

bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, BEXXAR®, bicalutamida, BiCNU, Blenoxane®, bleomicina, bortezomib, busulfano, Busulfex®, C225, leucovorina de calcio, Campath®, Camptosar®, camptotecina 11, capecitabina Carac™, carboplatino, carmustina, carmustina en grageas, Casodex®, CC-5013, CCI-779,

5 CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidine®, cetuximab, clorambucil, cisplatino, factor de Citrovorum, cladribina, cortisona, Cosmegen®, CPT-11, ciclofosfamida, Cytadren®, citarabina, citarabina liposomal, Cytosar-U®, Cytoxan®, dacarbazina, dacogeno, dactinomicina, darbepoyetina alfa, dasatinib, daunomicina, daunorrubicina, clorhidrato de daunorrubicina, daunorrubicina liposomal,

10 DaunoXome®, decadrón, decitabina, Delta-Cortef®, Deltasone®, denileuquina, diftiox, DepoCyt™, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato de sodio de dexametasona, dexasona, dexrazoxano, DHAD, DIC, diodex, docetaxel, Doxil®, doxorubicina, doxorubicina liposomal, Droxia™, dTIC, DTIC-Dome®, Duralone®, duvelisib, Efudex®, Eligard™, Ellence™, Eloxatin™, Elspar®, Emcyt®,

15 epirubicina, epoyetina alfa, erbitux, erlotinib, L-asparaginasa de *Erwinia*, estramustina, etiol Etopophos®, etopósido, fosfato de etopósido, Eulexin®, everolimus, Evista®, exemestano, Fareston®, Faslodex®, Femara®, filgrastim, floxuridina, Fludara®, fludarabina, Fluoroplex®, fluorouracilo, fluorouracilo en forma de crema, fluoximesterona, flutamida, ácido folínico, FUDR®, fulvestrant,

20 gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab con ozogamicina, gemzar, Gleevec™, Gliadel® en grageas, GM-CSF, goserelina, factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos (G-MCSF), Halotestin®, Herceptin®, hexadrol, Hexalen®, hexametilmelamina, HMM, Hycamtin®, Hydrea®, acetato de hidrocort,

25 hidrocortisona, fosfato de sodio de hidrocortisona, succinato de sodio de hidrocortisona, fosfato de hidrocortona, hidroxíurea, ibrutinib, ibritumomab, ibritumomab con tiuxetano, idamicina, idarrubicina Ifex®, interferón alfa 2a, interferón alfa 2b (conjugado con PEG), ifosfamida, interleuquina 11 (IL-11), interleuquina 2 (IL-2), mesilato de imatinib, imidazolcarboxamida, Intron A®,

30 ipilimumab, Iressa®, irinotecano, isotretinoína, ixabepilona, Ixempra™, KADCYCLA®, kidrolasa (t) Lanacort®, lapatinib, L-asparaginasa, LCR, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leukerano, Leukine™, leuprolida, leurocristina,

Leustatin™, lirilumab, Ara-C liposomal, Pred® en forma líquida, lomustina, L-PAM,
 L-sarcolisina, Lupron®, Lupron® en una forma que puede depositarse, Matulane®,
 maxidex, mecloretamina, clorhidrato de mecloretamina, Medralone®, Medrol®,
 Megace®, megestrol, acetato de megestrol, un inhibidor de una MEK, melfalán,
 5 mercaptopurina, mesna, Mesnex™, metotrexato, metotrexato de sodio,
 metilprednisolona, Meticorten®, mitomicina, mitomicina C, mitoxantrona M-
 Prednisol®, MTC, MTX, Mustargen®, mustina, Mutamicina®, Myleran®,
 Mylocel™, Mylotarg®, navitoclax, Navelbine®, nelarabina, Neosar®, Neulasta™,
 Neumega®, Neupogen®, Nexavar®, Nilandron®, nilotinib, nilutamida, Nipent®,
 10 mostaza de nitrógeno Novaldex®, nivolumab, Novantrone®, nplato, octreótido,
 acetato de octreótido, ofatumumab, Oncospar®, Oncovin®, Ontak®, Onxal™,
 oprelvekina, Orapred®, Orasone®, oxaliplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a
 proteínas, pamidronato, panitumumab, Panretin®, Paraplatin®, pazopanib,
 Pediapred®, interferón con PEG, pegaspargasa, pegfilgrastim, PEG-INTRON™,
 15 PEG-L-asparaginasa, pemetrexed, pembrolizumab, pentostatina, pertuzumab,
 mostaza de fenilalanina, pidilizumab, Platinol®, Platinol-AQ®, prednisolona,
 prednisona, Prelone®, procarbazona, PROCIT®, Proleukin®, prolifeoprospano 20
 con implantes de carmustina, Purinethol®, un inhibidor de BRAF, raloxifeno,
 Revlimid®, Rheumatrex®, Rituxan®, rituximab, Roferon-A®, romiplostim, Rubex®,
 20 clodhirato de rubidomicina, Sandostatin®, Sandostatin LAR®, sargramostim,
 Solu-Cortef®, Solu-Medrol®, sorafenib, SPRYCEL™, STI-571, STIVAGRA™,
 estreptozocina, SU11248, sunitinib, Sutent®, tamoxifeno Tarceva®, Targretin®,
 Tassigna®, taxol, taxótero, Temodar®, temozolomida, temsirolimus, tenipósido,
 TESPAs, talidomida, Thalomid®, TheraCys®, tioguanina, tioguanina Tabloid®,
 25 tiofosfamida, Thioplex®, tiotepa, TICE®, Toposar®, topotecano, toremifeneo,
 Torisel®, tositumomab, trastuzumab, Treanda®, tremelimumab, tretinoína,
 Trexall™, Trisenox®, TSPA, TYKERB®, urelumab, VCR, Vectibix™, Velban®,
 Velcade®, venetoclax, VePesid®, Vesanoid®, Viadur™, Vidaza®, vinblastina,
 sulfato de vinblastina, vincasar Pfs®, vincristina, vinorelbina, tartrato de
 30 vinorelbina, VLB, VM-26, vorinostat, votrient, VP-16, Vumon®, Xeloda®,
 Zanosar®, Zevalin™, Zinecard®, Zoladex®, ácido zoledrónico, Zolanza o

Zometa®, así como cualquier otro agente que esté dirigido a vías similares pero que no haya sido mencionado en presente.

Cuando se emplean dos o más sustancias activas o dos o más principios activos como parte de un régimen de tratamiento combinado, la administración
5 puede llevarse a cabo a través de una misma vía o a través de vías diferentes, esencialmente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, esencialmente de manera simultánea, de manera consecutiva o de acuerdo con un régimen alternado). Cuando se desea que la administración de las sustancias activas o de los principios activos tenga lugar de manera simultánea a través de
10 una misma vía, la administración podrá basarse en el uso de formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o de una formulación o una composición farmacéutica combinada, lo cual ha de resultar evidente para aquellos versados en la técnica.

Por otra parte, cuando se emplean dos o más sustancias activas o dos o
15 más principios activos como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias activas o cada uno de los principios activos puede administrarse en una cantidad idéntica a la que se emplearía en un régimen basado la administración de la misma sustancia activo o del mismo principio activo por separado, y un uso combinado de este tipo puede tener un efecto sinérgico o
20 no. En cualquier caso, cuando el uso combinado de dos o más sustancias activas o dos o más principios activos da como resultado un efecto sinérgico, también puede ser posible disminuir la cantidad de una o más de las sustancias activas o de uno o más de los principios activos, o incluso de todos ellos, sin que esto sea un impedimento para la obtención de la acción terapéutica deseada. A modo de
25 ejemplo, esto puede resultar útil para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados que podrían producirse como resultado de la administración de una o más de las sustancias activas o de uno o más de los principios activos en las cantidades usuales, sin que esto sea un impedimento para la obtención del efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

30 La eficacia de un régimen de tratamiento de acuerdo con la invención sobre una enfermedad o un trastorno determinado puede determinarse y/o monitorearse de cualquier manera conocida per se, lo cual ha de resultar evidente para el

médico a cargo. Eventualmente, y en función de las consideraciones de cada caso, el médico también podrá alterar o modificar un régimen de tratamiento en particular para obtener el efecto terapéutico deseado, para evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados y/o para obtener un equilibrio apropiado
5 entre la obtención del efecto terapéutico deseado y la prevención, la limitación o la reducción de los efectos secundarios no deseados.

En general, un régimen de tratamiento será seguido hasta que se obtenga el efecto terapéutico deseado y/o durante el período de tiempo durante el cual se desee mantener el efecto terapéutico deseado. Una vez más, esto podrá ser
10 determinado por el clínico a cargo.

En diversas formas de realización, en la presente se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden una o más proteínas agonistas de los receptores TRAIL, ya sea solas o en combinación con diversos agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
15 En diversas formas de realización, entre los ejemplos no limitativos de los usos que es posible darles a las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente, puede mencionarse el diagnóstico, la detección y/o el seguimiento de un trastorno, la prevención, el tratamiento, la gestión y/o la mejora de un trastorno o de uno o más de sus síntomas y la investigación. La formulación de las
20 composiciones farmacéuticas, ya sea solas o en combinación con una variedad de agentes profilácticos, agentes terapéuticos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, ha de resultar conocida para aquellos versados en la técnica (véase la publicación de patente de los EEUU N° 20090311253 A1).

En diversas formas de realización, una formulación farmacéutica puede
25 comprender uno o más aminoácidos, uno o más polisacáridos y/o uno o más polisorbatos, así como una proteína agonista de los receptores de TRAIL, donde esta última puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/ml, lo cual abarca cualquier rango intermedio (por ejemplo, 0,1-10, 1-10, 0,01 a 50, 1-50, 1-100, 10-100, 25-100, 25-50 ó 50-100 mg/ml) y donde el pH
30 de la formulación tiene un valor de entre aproximadamente 5,0 y 7,0, lo cual abarca cualquier rango intermedio (por ejemplo, un pH de aproximadamente 5,0-6,0, 5,5-6,0, 5,0-6,5, 5,5-6,5 ó 6,0-7,0). En una forma de realización, al menos un

aminoácido en la formulación es la histidina y está presente en una concentración de aproximadamente 10-20 mM, 10-15 mM, 15-20 mM o 15 mM. En una forma de realización, al menos un polisacárido en la formulación es la sacarosa y está presente a una concentración de aproximadamente 0-8,0% peso/volumen (p/v).

5 En una forma de realización, el polisorbato en la formulación es el polisorbato 80 y está presente en una concentración de aproximadamente 0-0,06% p/v. En una forma de realización, al menos un aminoácido en la formulación es la arginina y está presente en una concentración de aproximadamente 0-1,5% p/v (por ejemplo, 0,5-1,5, 1,0-1,5 ó 0,5-1,0 p/v). En una forma de realización, la proteína agonista de

10 los receptores de TRAIL está presente en la formulación en una concentración de aproximadamente 0,1-100 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 1-100 mg/ml, aproximadamente 1-15 mg/ml, aproximadamente 1-7,5 mg/ml, aproximadamente 2,5-7,5 mg/ml, aproximadamente 5-7,5 mg/ml, aproximadamente 25-100 mg/ml, aproximadamente 20-60 mg/ml, aproximadamente 25-50 mg/ml, aproximadamente

15 25 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0,1-60 mg/ml, aproximadamente 0,1-25 mg/ml, aproximadamente 1,0-60 mg/ml, aproximadamente 0,5-60 mg/ml, aproximadamente 0,1-2,0 mg/ml, aproximadamente 0,5-2,0 mg/ml, aproximadamente 1-5 mg/ml, aproximadamente 1-7,5 mg/ml, aproximadamente 1-15 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml o

20 aproximadamente 1,0 mg/m).

Tal como se la emplea en la presente, la frase “cantidad eficaz” hace referencia a una cantidad de una proteína agonista de los receptores de TRAIL que da como resultado una mejora detectable (de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o

25 más con relación al valor de referencia) en uno o más parámetros relacionados con una disfunción a nivel de los TRAIL o con una enfermedad o un trastorno asociado a los TRAIL.

En diversas formas de realización, una formulación farmacéutica toma la forma de una formulación acuosa, de una formulación liofilizada o de una

30 formulación liofilizada y rehidratada. En una forma de realización, la solución que se emplea para llevar a cabo la hidratación toma la forma de una solución a base de dextrosa y/o de una solución salina (donde por ejemplo, la solución a base de

dextrosa puede comprender dextrosa en una concentración de aproximadamente 5% p/v y/o la solución salina puede comprender sal en una concentración de aproximadamente 0,9% p/v). En una forma de realización, la formulación farmacéutica comprende histidina aproximadamente 15 mM, aproximadamente 5 0,03% (p/v) de polisorbato 80, aproximadamente 4% (p/v) de sacarosa y aproximadamente 0,1-25 mg/ml de la proteína agonista de los receptores de TRAIL o aproximadamente 1-15 mg/ml de la proteína agonista de los receptores de TRAIL, y tiene un pH de aproximadamente 6. En una forma de realización, la formulación también comprende al menos un agente adicional.

10 En diversas formas de realización, se emplea una formulación que contiene aproximadamente 25 mg/ml de una proteína agonista de los receptores de TRAIL, histidina aproximadamente 15 mM, 0,03% de polisorbato 80 (peso/volumen, p/v) y 4,0% de sacarosa (p/v) y que tiene un pH de aproximadamente 6,0. En algunas formas de realización, la formulación no comprende arginina. En algunas formas
15 de realización, la formulación, que puede tomar la forma de una formulación líquida o de una formulación liofilizada, presenta una estabilidad inesperadamente alta ante los ciclos de congelación y descongelación, en comparación con lo que podría observarse en formulaciones que comprendieran componentes diferentes o que comprendieran los mismos componentes en concentraciones diferentes.

20 Los métodos que pueden emplearse para administrar los agentes terapéuticos que se describen en la presente incluyen, sin limitaciones, la administración por vía oral, la administración por vía parenteral (por ejemplo, por vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea), la administración por vía epidural, la administración por vía intratumoral, la
25 administración en las mucosas (por ejemplo, por vía intranasal u oral) y la administración por vía pulmonar (por ejemplo, la administración de compuestos en forma de aerosoles, mediante el uso de inhaladores o nebulizador). En los antecedentes técnicos pueden hallarse descripciones de métodos para formular composiciones farmacéuticas útiles para vías de administración específicas y de
30 los materiales y los procedimientos necesarios para los diversos métodos de administración, los cuales han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica (véase la publicación de patente de los EEUU N° 20090311253 A1).

En diversas formas de realización, los regímenes de dosificación pueden ajustarse para obtener una respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). A modo de ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en un período de tiempo determinado
 5 o puede reducirse o incrementarse la dosis proporcional, sobre la base de las exigencias de una situación terapéutica en particular. En algunas formas de realización, las composiciones parenterales se formulan como formas de dosificación individuales para simplificar la administración y para obtener una dosificación uniforme. En este contexto, el término “forma de dosificación
 10 individual” hace referencia a una unidad físicamente discreta que puede administrarse de manera individual en el mamífero que se desea tratar, que contiene una cantidad predeterminada de un compuesto activo, la cual ha sido calculada con el propósito de producir el efecto terapéutico deseado en combinación con el vehículo farmacéutico seleccionado.

15 Un ejemplo no limitativo de un rango que puede corresponder a una cantidad eficaz para una aplicación terapéutica o profiláctica de una proteína agonista de los receptores de TRAIL como las que se describen en la presente 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 a 50, 0,1 a 75, 1-10, 1-15, 1-7,5, 1,25-15, 0,1,25-07,05,
 20 02,05-07,05, 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 ó 10-100 mg/kg, así como cualquier concentración intermedia). En algunas formas de realización, la proteína agonista de los receptores de TRAIL está presente en una composición farmacéutica en una concentración que es eficaz para una aplicación terapéutica, que por ejemplo,
 25 puede ser 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 ó 10-100 mg/ml, así como cualquier concentración intermedia). Vale destacar que una dosis puede variar en función de la naturaleza y/o la severidad de la afección que se
 30 desea combatir. También ha de comprenderse que el régimen de dosificación específico que se emplea para un sujeto puede ser ajustado con el correr del tiempo, en función de las necesidades del caso y/o del criterio del profesional que

administra las composiciones o que supervisa su administración, y que los rangos correspondientes a las dosis que se mencionan en la presente solamente se proveen a modo de ejemplo, ya que no tienen por objeto limitar el alcance o las aplicaciones prácticas de las composiciones que se reivindican.

5 EJEMPLOS

1. Preparación de una proteína agonista de los receptores de TRAIL (de cadena simple, basada en un TRAIL salvaje)

1.1. Estructura de los polipéptidos

- (a) Los aminoácidos Met1-Gly20 abarcaron el péptido señal de la Ig-kappa, y
10 se asumió que el sitio para la escisión del péptido señal quedó localizado después del aminoácido Gly20.
- (b) Los aminoácidos Gln21-Gly182 abarcaron un primer dominio soluble de una citoquina del tipo de un TRAIL humano (los aminoácidos 120-281 del TRAIL que se representa en SEQ ID N° 1).
- 15 (c) Los aminoácidos Gly183-Ser190 abarcaron un primer elemento conector peptídico como el que se representa en SEQ ID N° 2.
- (d) Los aminoácidos Arg191-Gly351 abarcaron un segundo dominio soluble de una citoquina del tipo de un TRAIL humano (los aminoácidos 121-281 del TRAIL que se representa en SEQ ID N° 1).
- 20 (e) Los aminoácidos Gly352-Ser359 abarcaron un segundo elemento conector peptídico como el que se representa en SEQ ID N° 2.
- (f) Los aminoácidos Arg360-Gly520 abarcaron un tercer dominio soluble de una citoquina del tipo de un TRAIL humano (los aminoácidos 121-281 del TRAIL que se representa en SEQ ID N° 1).
- 25 (g) Los aminoácidos Gly521-Cys542 abarcaron un elemento conector útil como bisagra como el que se representa en SEQ ID N° 11.
- (h) Los aminoácidos Pro543-Lys760 abarcaron un dominio que fue un fragmento de un anticuerpo del tipo Fc como el que se representa en SEQ ID N° 10.
- 30 La proteína agonista de los receptores de TRAIL que se ha descrito se representa en SEQ ID N° 14.

Los conectores indicados podrán ser sustituidos por otros conectores preferidos, tales como los que se representan en SEQ ID N° 3-9.

Vale destacar que no es imprescindible que el primer conector peptídico y el segundo conector peptídico sean idénticos.

- 5 La secuencia del péptido señal (a) puede ser sustituida por cualquier otra secuencia apropiada, por ejemplo, por la secuencia de un péptido señal de los mamíferos.

1.2. Casete génico que codifica el polipéptido

- El gen sintético puede ser optimizado en función del uso de codones para
10 mejorar la expresión en las células huésped apropiadas, por ejemplo, en células de insectos o en células de mamíferos. Una secuencia de ácido nucleico preferida se representa en la SEQ ID N° 16.

2. Expresión y purificación

Clonación, expresión y purificación de los polipéptidos de fusión

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

- Para el análisis inicial de las proteínas de fusión agonistas de los receptores de TRAIL mencionadas anteriormente, se transfectaron de manera transitoria células HEK293T que habían sido cultivadas en un DMEM combinado con
20 GlutaMAX (de Gibco), 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina con un plásmido que contenía un casete útil para expresar un polipéptido de fusión y un marcador de selección apropiado, por ejemplo un cassette de expresión funcional que comprende un gen de resistencia a blasticidina, puromicina o higromicina. En aquellos casos en los que fue necesario
25 emplear diversas cadenas de polipéptidos para obtener el producto final, los casetes de expresión se combinaron en forma de plásmidos o se colocaron en plásmidos diferentes en el transcurso de la transfección. Tres días después de la transfección, se recolectó el sobrenadante del cultivo de células, que contenía el polipéptido de fusión recombinante, y se lo purificó por medio de una
30 centrifugación a 300 x G, que fue seguida por una filtración a través de un tamiz estéril de 0,22 µm.

Para la expresión a mayor escala de proteínas de fusión agonistas de los

receptores de TRAIL que se van a utilizar, se insertaron cassettes de ADN sintéticos que codifican las proteínas mencionadas anteriormente en vectores de expresión eucariotas que comprenden marcadores de selección apropiados (por ejemplo un cassette de expresión funcional que comprende un gen de resistencia a blasticidina, puromicina o higromicina) y elementos genéticos apropiados para aumentar el número de sitios de inserción transcripcionalmente activos dentro del genoma de las células huésped. Los vectores de expresión con su secuencia verificada se introdujeron por electroporación en una suspensión de células adaptadas de ovario de Hamster chino (CHO-S, Invitrogen). Se aplicó una presión de selección apropiada tres días luego de la transfección a las células transfectadas. Las células sobrevivientes que portan el(los) gen(es) de resistencia derivado del vector se recuperaron por subsiguiente cultivo bajo la presión de selección. Al obtener el crecimiento estable de los conjuntos de células seleccionados en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37°C y atmósfera de CO₂ al 7% en una incubadora sacudidora orbital (100 rpm, carrera de sacudida de 50mm), los sobrenadantes individuales se analizaron por ensayos ELISA para detectar las proteínas mencionadas anteriormente y se expandieron los conjuntos de células con la mayor productividad específica en erlenmeyers para agitadora antes de la producción de proteínas (sacudidora orbital, 100 rpm, de carrera de sacudida 50mm).

Para la producción de proteínas a escala de laboratorio, conjuntos individuales de células se cultivaron durante 7-12 días en medio químicamente definido (PowerCHO2-CD, Lonza) a 37°C y atmósfera de CO₂ al 7% en un biorreactor Wave 20/50 EHT (GE-Healthcare). El medio de base fue PowerCHO2-CD suplementado con Glutamax 4mM. El cultivo en biorreactor Wave se inició con una concentración de células viables de 0,3 a 0,4 x 10⁶ células/ml y los siguientes ajustes (para una bolsa de cinco o diez litros): frecuencia de agitación 18rpm, ángulo de agitación 7°, corriente de gas 0,2-0,3 L/min, CO₂ al 7%, 36,5°C. Durante la corrida Wave, las células del cultivo se alimentaron dos veces con PowerFeed A (Lonza), usualmente el día 2 (alimentación del 20%) y el día 5 (alimentación del 30%). Luego de la segunda alimentación, la frecuencia de agitación se aumentó hasta 22rpm, así como el ángulo de agitación a 8°.

El biorreactor usualmente se cosechó entre el día 7 y el día 12 cuando la viabilidad de las células cayó por debajo del 80%. Primero, el sobrenadante del cultivo se aclaró usando un sistema de filtración en profundidad con dispensación manual (Millipore Millistak Pod, MC0HC 0,054m²). Para las proteínas marcadas con Strep, se agregó Avidina a una concentración final de 0,5mg/L. Por último, el sobrenadante del cultivo que contenía la proteína de fusión agonista de los receptores de TRAIL se sometió a filtración estéril usando un filtro para la parte superior de una botella (0,22µm, PES, Corning) y se almacenó a 2-8°C hasta continuar con el tratamiento.

Para llevar a cabo una purificación basada en la afinidad, se empleó una columna de sefarosa Streptactin (que comprendió un lecho de gel de 1 ml) que había sido equilibrada con 15 ml del amortiguador W (que comprendió Tris-HCl 100 mM y NaCl 150 mM y que tuvo un pH de 8,0) o con PBS con un pH de 7,4, sobre la cual se aplicó el sobrenadante del cultivo de células a una velocidad de flujo de 4 ml/minuto. Posteriormente, se lavó la columna con 15 ml del amortiguador W y se sometió el péptido unido a siete eluciones, en cada una de las cuales se empleó 1 ml del amortiguador E (que comprendió Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM y destiobiotina 2,5 mM y que tuvo un pH de 8,0). Como alternativa, en este paso podría haberse usado PBS con un pH de 7,4 en combinación con destiobiotina 2,5 mM.

Como alternativa al método basado en Sefarosa con Streptactina, se realizó una purificación por afinidad empleando una columna con proteína-A inmovilizada como ligando de afinidad y un sistema cromatográfico Akta (GE-Healthcare). Se seleccionó un material en fase sólida con alta afinidad para el dominio FC de la proteína de fusión: MABSelect SureTM (GE Healthcare). En resumen, el sobrenadante clarificado del cultivo de células se cargó en una columna MabSelectSure de HiTrap (CV= 5ml) equilibrada en solución reguladora de pH de lavado-1 (Pi 20 mM, NaCl 95 mM, pH 7,2) sin superar una carga de 10mg de proteína de fusión por ml de lecho de columna. La columna se lavó con diez volúmenes de columna (10CV) de la solución reguladora de pH de equilibración mencionada anteriormente seguido de cuatro volúmenes de columna (4CV) de solución reguladora de pH de lavado-2 (Pi 20mM, NaCl 95mM, pH 8,0) para

empobrecer en la proteína de la célula huésped y ADN de la célula huésped. Luego se eluyó la columna con solución reguladora de pH de elución (Pi 20mM, NaCl 95mM, pH 3,5) y el eluato se recolectó en hasta diez fracciones donde cada fracción tenía un volumen igual al volumen del lecho de columna (5ml). Cada
 5 fracción se neutralizó con un volumen igual de la solución reguladora de pH de lavado-2 mencionada anteriormente. La velocidad lineal se estableció en 150cm/h y se mantuvo constante durante el método de cromatografía por afinidad mencionado anteriormente.

Se determinó la cantidad de proteínas en las fracciones eluidas, se
 10 concentraron fracciones correspondientes a los picos por medio de una ultrafiltración y se las sometió a una purificación adicional por medio de una cromatografía de exclusión en función del tamaño (SEC).

La SEC se llevó a cabo en columnas Superdex 200 10/300 GL o HiLoad 26/60, mediante el uso de un sistema de cromatografía Akta (de GE-Healthcare).
 15 Las columnas se equilibraron con una solución salina amortiguada con fosfato y el polipéptido purificado por afinidad se cargó en la columna SEC sin superar el volumen de muestra del 2 % (v/v) del volumen de columna. En el caso de las columnas Superdex200 10/300 GL (GE Healthcare), se aplicó un caudal de 0,5ml por minuto. En el caso de las columnas HiLoad 26/60 Superdex200, se aplicó un
 20 caudal de 2,5 ml por minuto. El perfil de elución del polipéptido se controló en función de la absorbancia a 280 nm.

Para determinar el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado bajo condiciones nativas, se cargó una columna Superdex 200 con proteínas de referencia que tenían un peso molecular conocido. En función del
 25 volumen con el que se eluyeron las proteínas, se construyó una curva de calibración como referencia y se determinó el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado. El dominio FC que comprendía proteínas de fusión agonistas de los receptores de TRAIL típicamente eluyó de las columnas Superdex200 con un peso molecular aparente de aproximadamente 160-180 kDa
 30 para el homodímero.

3. Análisis basado en la apoptosis

Se empleó un análisis con una línea de células T Jurkat A3 permanente para determinar la actividad de inducción de la apoptosis de las proteínas de fusión agonistas de los receptores de TRAIL. Las células Jurkat se cultivaron en matraces con un medio RPMI 1640 en combinación con GlutaMAX (de Gibco), 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Antes del análisis, se sembraron 100000 células por cavidad en una placa de microtitulación con 96 cavidades. La adición de diversas concentraciones de los péptidos de fusión en las cavidades fue seguida por una incubación a 37°C durante 3 horas. Las células se lisaron mediante la adición de un amortiguador de lisis (que comprendió HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 10 mM, 5% de Triton-X-100, DTT 100 mM y AEBSF 10 mM y que tuvo un pH de 7,5) y se colocaron en placas en hielo durante un período de entre 30 minutos y 2 horas. La apoptosis estuvo acompañada por un incremento en la actividad de las caspasas, tales como la caspasa 3. En función de lo anterior, se utilizó la escisión de un sustrato específico para las caspasas, Ac-DEVD-AFC (de Biomol), para determinar la extensión de la apoptosis. De hecho, la actividad de las caspasas está correlacionada con el porcentaje de células apoptóticas, el cual puede determinarse sobre la base de la morfología, después de aplicar una coloración con ioduro de propidio y Hoechst-33342. Para analizar la actividad de las caspasas, se transfirieron 20 µl de las células lisadas a una placa de microtitulación con 96 cavidades de color negro. Después de agregar 80 µl de un amortiguador que contenía HEPES 50 mM, 1% de sacarosa, 0,1% de CHAPS, Ac-DEVD-AFC 50 mM y DTT 25 mM y que tenía un pH de 7,5, se colocó la placa en un lector para placas de microtitulación 500 Tecan Infinite y se monitoreó el incremento en la intensidad de la fluorescencia (con una excitación con una longitud de onda de 400 nm y una emisión con una longitud de onda de 505 nm).

3.1. Análisis basado en la muerte de las células

Para determinar la muerte de las células, se sembraron 15000 células de fibrosarcoma HT1080 en placas con 96 cavidades durante la noche, en un medio RPMI 1640 en combinación con GlutaMAX (de Gibco) y 10% de FBS (de Biochrom). Las células se incubaron de manera simultánea con cicloheximida (de Sigma), en una concentración final de 2,5 g/ml. La cantidad de células muertas se

determinó con la ayuda de una coloración con un amortiguador KV (que comprendió 0,5% de violeta cristalino y 20% de metanol). Después de aplicar la coloración, se lavaron las cavidades con agua y se las secó al aire. Se eluyó el colorante con metanol y se determinó la densidad óptica a 595 nm con un lector para ELISA.

4. Análisis basado en la estabilidad y en la agregación

4.1. Principio del análisis de la agregación (definición de las proteínas solubles)

El contenido de monómeros (definidos como los trímeros de módulos que pueden unirse a los receptores de TRAIL) y de agregados se determina por medio de un análisis de SEC, según se describió en el ejemplo 2. Para este propósito en particular, el análisis se lleva a cabo en amortiguadores que contienen una concentración fisiológica de sal y a un pH fisiológico (por ejemplo, con 0,9% de NaCl a un pH de 7,4 o con PBS a un pH de 7,4). Un análisis típico de la agregación se lleva a cabo en una columna Superdex 200 (de GE Healthcare). Con una columna de este tipo, pueden separarse proteínas cuyo peso se encuentra en el rango de entre 10 y 800 kDa.

Para determinar el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado bajo condiciones nativas, se carga una columna Superdex 200 con proteínas de referencia que tienen un peso molecular conocido. En función del volumen con el que se eluyen las proteínas, se construye una curva de calibración como referencia y se determina el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado.

En el análisis SEC de las proteínas no agregadas y solubles, tales como los trímeros de dominios de TRAIL, generalmente se observan picos distinguibles asociados a volúmenes de elución definidos. Estos volúmenes de elución corresponden al peso molecular aparente de las proteínas nativas que se estudian y es similar al peso molecular teórico, que se calcula en función de la secuencia de aminoácidos primaria.

Si se produce la agregación de las proteínas, en el análisis de SEC se observan otros picos, que están asociados a volúmenes de retención inferiores. En el caso de los TRAIL, la agregación de las proteínas solubles se produce de

una manera característica. Las proteínas tienden a formar oligómeros a partir de los “trímeros”, lo que da como resultado conjuntos de nueve unidades (3 x 3) o de veintisiete unidades (3 x 9). Estos oligómeros sirven como semillas para la agregación, y un contenido elevado de oligómeros puede dar como resultado la agregación de las proteínas. Los oligómeros con un peso molecular alto y los agregados son eluidos en el volumen vacío de la columna Superdex 200 y no pueden ser sometidos a un análisis de SEC para determinar su peso molecular nativo.

Debido a la inducción de la agregación (de manera completa), las preparaciones que comprendieran las proteínas de fusión TRAIL-SF purificadas preferiblemente deberían contener tan solo las proteínas triméricas definidas, junto con una cantidad muy baja de proteínas oligomerizadas. El grado de agregación y de oligomerización de una preparación que comprende una proteína TRAIL-SF particular se determina por medio de un análisis de SEC, mediante el cálculo del área de los picos en una representación basada en la densidad óptica a 280 nm para los trímeros y las fracciones de oligómeros/agregados que se han definido, respectivamente. A partir del área total de los picos, el porcentaje que representa una proteína trimérica definida se calcula con la siguiente ecuación:

Contenido porcentual de un trímero = $\frac{\text{área de los picos del trímero}}{\text{área total de los picos}} \times 100$.

La definición de las proteínas solubles, tal como se la emplea en la presente, está relacionada con un contenido de proteínas solubles (que son los trímeros de módulos que pueden unirse a los receptores de TRAIL) que es superior a 90% y una concentración de las proteínas que se encuentra en el rango de entre 0,2 y 10,0 mg/ml en una preparación que comprende proteínas del tipo de los TRAIL, que han sido purificadas en un amortiguador apropiado, en presencia de una concentración fisiológica de sal y a un pH fisiológico.

5. Determinación de la vida media

Cada una de las moléculas A-D está compuesta por dos polipéptidos unidos a través de enlaces covalentes, más precisamente a través de enlaces disulfuro entre las cadenas. Se analizó la cantidad de sitios glucosilados y de cisteínas en las bisagras (que están asociadas a los enlaces disulfuro entre las cadenas que

constituyen las proteínas) con el fin de determinar el efecto que podría tener la alteración de estas características sobre la vida media de los compuestos.

Se trataron ratones NMRI hembra con 1,2 mg/kg bw y/o con 4 mg/kg bw de los compuestos que se especifican como una única inyección intravenosa de un bolo.

5 Se recolectó sangre entera antes de la aplicación (predosis), y hasta 168 horas después de la administración del artículo de prueba. Se preparó el suero y las muestras se almacenaron a -80°C hasta la determinación de las concentraciones en suero. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando las concentraciones medias en suero y el programa de evaluación de farmacocinética
10 PK Solutions Versión 2.0 para análisis de datos farmacocinéticos no compartimentalizado (Summit Research Services, Montrose, CO). PK Solutions es una aplicación automatizada, basada en Excel, que calcula parámetros farmacocinéticos a partir de datos de concentración-tiempo que se obtuvieron del análisis, por ejemplo, de muestras biológicas luego de la administración
15 intravenosa o por rutas extravasculares. PK Solutions calcula los resultados sin suponer ningún modelo compartimentalizado específico.

La cuantificación de los artículos de prueba en suero se realizó con un ensayo ELISA para detectar los agonistas del receptor de TRAIL individuales que se muestran en la Tabla 7 independiente de que un marcador Strep fuese parte de
20 las moléculas. El esquema general se muestra en la Figura 18. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

La molécula A (formada por dos polipéptidos de SEQ ID NO:26) comprende dos cisteínas en las bisagras (que forman dos enlaces disulfuro entre las cadenas) y un residuo de N en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice de
25 la UE), lo que da resultando un dominio CH2 glucosilado. La molécula A también comprende sitios glucosilados en las posiciones 168 y 337. La molécula B comprende tres cisteínas en las bisagras (que forman tres enlaces disulfuro entre las cadenas) en las posiciones 513, 519 y 522 y presenta una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice de la UE), lo que da
30 como resultado un dominio CH2 no glucosilado. La molécula B (formada por dos polipéptidos de SEQ ID NO: 19) también comprende sitios glucosilados en las posiciones 168 y 337. La molécula C (formada por dos polipéptidos de SEQ ID

NO: 27) comprende tres cisteínas en las bisagras (que forman tres enlaces disulfuro entre las cadenas) y una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice de la UE), lo que da como resultado un dominio CH2 no glucosilado. Además, hay un sitio glucosilado en la posición 168 (en el conector 1) pero no en la posición 337 (en el conector 2). La molécula D (formada por dos polipéptidos de SEQ ID NO:28) comprende tres cisteínas en las bisagras (que forman tres enlaces disulfuro entre las cadenas) y una mutación N297S en la posición 297 de la región Fc (de acuerdo con el índice de la UE), lo que da como resultado un dominio CH2 no glucosilado. Más aun, en la molécula D se han eliminado los sitios glucosilados en el conector 1 y en el conector 2 (en las posiciones 168 y 337, respectivamente).

La estabilidad in vivo (basada en la vida media) de la molécula B (que presenta dos conectores glucosilados, carece de dominios CH2 glucosilados y comprende una tercera cisteína en las bisagras) fue superior a la de la molécula A. Además, la eliminación de todos los sitios glucosilados del compuesto (que dio como resultado la molécula D) se tradujo en una disminución a nivel de la estabilidad in vivo y de la productividad en el transcurso de la expresión transitoria. La molécula C (que presenta un primer conector glucosilado y un segundo conector no glucosilado y carece de dominios CH2 glucosilados) presentó una estabilidad intermedia in vivo en comparación con las moléculas B y D (los resultados se proveen en la tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis de la vida media de los compuestos en ratones NMRI

Molécula	Cantidad de sitios glucosilados	Cantidad de cisteínas en las bisagras	Vida media terminal 4mg/kg i.v.(hora)	Vida meda terminal 1,2 mg/kg i.v.(hora)	
A	6	2	23,1	17,7	
B	4	3	33,94	28,28	
C	2	3	21,03	-	

D	0	3	8,81	-	
---	---	---	------	---	--

En función de estos resultados experimentales, puede concluirse que la combinación de los conectores glucosilados (los conectores 1 y 2), un tercer enlace disulfuro entre las cadenas (a través de la adición de una cisteína en las bisagras) y la ausencia de dominios CH2 glucosilados en la región Fc de las moléculas de la presente invención da como resultado una mayor estabilidad in vivo.

6. Demostración de eficacia *in vitro*

6.1 La proteína agonista de los receptores de TRAIL con la SEQ ID NO: 19 inhibe in vitro la supervivencia de células de tumores humanos

10 hematológicos y sólidos

Se sembraron células tumorales a 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en los medios recomendados que contenían 10% de FBS y se trataron con una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO: 19 durante 24 horas a 37°C, en una atmósfera humidificada, con 5% de CO2. Luego se evaluó la viabilidad de las células usando reactivo CellTiter-Glo® según se describe en las instrucciones del fabricante (Promega; Madison, WI). En la Tabla 8 se muestran los resultados del tratamiento con una proteína agonista de los receptores de TRAIL hechos de dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 de las líneas celulares hematológicas (A; (n= 40; linfoma no de Hodgkin, NHL; linfoma mieloide agudo, AML; leucemia linfoblástica aguda, ALL) y tumor sólido (B; (n= 44; carcinoma de pulmón de células no pequeñas, NSCLC; pancreático; cáncer colorrectal, CRC; cáncer de mamas, BrCa; de ovarios, fibrosarcoma; de cabeza y cuello, H&N; cáncer pulmonar de células pequeñas, SCLC) durante 24 horas y donde la viabilidad se evaluó usando CellTiter-Glo®. Se presentan las IC₅₀ que se obtuvieron como resultado para la proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 para mostrar los efectos sobre la viabilidad celular de las células tumorales mediados por.

Tabla 8			
Potencia <i>in vitro</i> de la proteína agonista de los receptores de TRAIL con la SEQ ID NO: 19 en líneas celulares de tumor de canceroso humano			
Línea de células tumorales	Tipo de tumor	SEQ ID NO:19 IC ₅₀ (ng/ml)	
A			
SU-DHL-8	NHL	1,36	
NUDHL-1	NHL	6,50	
OCI-Ly8	NHL	7,49	
ULA	NHL	8,44	
OCI-Ly2	NHL	18,98	
OCI-LY19	NHL	26,34	
WSU-NHL	NHL	31,60	
OCI-Ly7	NHL	63,76	
SU-DHL-5	NHL	82,07	
OCI-Ly18	NHL	196,20	
OCI-Ly1	NHL	416,95	
SU-DHL-16	NHL	545,55	
SU-DHL-2	NHL	1000,00	
WSU-DLCL2	NHL	1000,00	
Toledo	NHL	1000,00	
OCI-LY3	NHL	1000,00	
RL	NHL	1000,00	
SU-DHL-4	NHL	1000,00	
U2932	NHL	1000,00	
HT	NHL	1000,00	
RC-K8	NHL	1000,00	
SKM-1	AML	0,95	
PL-21	AML	10,67	
EOL-1	AML	18,31	
HL-60	AML	76,62	
OCI-AML2	AML	124,32	
UKE-1	AML	205,35	
MV4-11	AML	312,55	
SET-2	AML	384,80	

MOLM-13	AML	722,10	
OCI-AML5	AML	1032,60	
Kasumi-1	AML	1000,00	
KG-1	AML	1000,00	
OCI-AML3	AML	1000,00	
SHI-1	AML	1000,00	
SKNO-1	AML	1000,00	
TF-1	AML	1000,00	
THP-1	AML	1000,00	
HEL	AML	1000,00	
Jurkat	ALL	3,08	
B			
NCI-H847	NSCLC	14,53	
NCI-H647	NSCLC	24,75	
NCI-H2444	NSCLC	27,75	
NCI-H2170	NSCLC	30,16	
NCI-H460	NSCLC	36,85	
NCI-H838	NSCLC	44,48	
NCI-H1792	NSCLC	61,09	
NCI-H2347	NSCLC	81,06	
NCI-H1373	NSCLC	125,15	
NCI-H522	NSCLC	259,87	
NCI-H2110	NSCLC	314,20	
NCI-H596	NSCLC	397,80	
HCC4006	NSCLC	407,24	
NCI-H2122	NSCLC	480,55	
NCI-H1299	NSCLC	716,00	
NCI-H1975	NSCLC	741,50	
HCC827	NSCLC	2824,50	
NCI-H727	NSCLC	3178,00	
NCI-H1944	NSCLC	4068,75	
NCI-H1299	NSCLC	4214,87	
Calu-6	NSCLC	4757,00	
NCI-H1693	NSCLC	5000,00	
HCC2935	NSCLC	5000,00	
A549	NSCLC	5000,00	
NCI-H1395	NSCLC	5000,00	

NCI-H2172	NSCLC	5000,00	
Calu-1	NSCLC	5000,00	
NCI-H441	NSCLC	5000,00	
NCI-H23	NSCLC	5000,00	
NCI-H661	NSCLC	5000,00	
NCI-H1650-GFP	NSCLC	>3	
BxPC3	pancreático	16,00	
Capan-1	pancreático	393,00	
MIA PaCa-2	pancreático	158,00	
PANC-1	pancreático	>1000	
SW48	CRC	6,10	
Colo205	CRC	1,30	
SW480	CRC	132,00	
HCT 116-GFP	CRC	337,00	
HCC38	BrCa	3,00	
HCC1569	BrCa	219,00	
MCF7	BrCa	>3000	
MDA-MB-231	BRCa	235,00	
HeyA8-GFP	de ovarios	141,00	
Fadu-GFP	H&N	>3	
HT-1080	Fibrosarcoma	377,00	
NCI-H211	SCLC	72,58	

6.2 La proteína agonista de los receptores de TRAIL con la SEQ ID NO: 19 presenta efecto sinérgico con agentes anti-tumorigénicos para inducir la muerte de células tumorales

Se sembraron células tumorales a 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en los medios recomendados que contenían 10% de FBS y se trataron en conjunto con una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y venetoclax (ABT-199), navitoclax (ABT-263) o docetaxel (DTX) durante 24hrs a 37°C, en una atmósfera humidificada, con 5% de CO2. Luego se evaluó la viabilidad de las

células usando reactivo CellTiter-Glo® según se describe en las instrucciones del fabricante. Se empleó el modelo Bliss independence (Wong *et al.*, 2012; Mol. Cancer Ther. 11:1026-1035; Bernebaum, 1981 Adv. Cancer Res. 35:269-335; Borisy *et al.*, 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7977-7982) para evaluar la actividad de la combinación, donde los números enteros negativos indican antagonismo, un valor de cero indica una actividad aditiva, y donde los números enteros positivos indican sinergia. Se calcularon los puntajes de Bliss para cada combinación en la matriz de dosis y se sumaron para dar un valor de la “Suma Bliss”. En las Figuras 20(A-C) se muestra un ejemplo de sinergia en la muerte de células tumorales inducida por el tratamiento conjunto de células tumorales humanas con una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO:19 y venetoclax, navitoclax o DTX, con la suma Bliss asociada. En la Tabla 9 se muestran las sumas Bliss determinadas para dichas combinaciones en cierto número de líneas celulares de tumor.

Tabla 9					
Evaluación por Bliss de la sinergia de la muerte celular debida a la proteína agonista de los receptores de TRAIL con SEQ ID NO:19 en combinación con DTX en líneas celulares NSCLC (A) y venetoclax o navitoclax en líneas celulares NHL & AML (B) <i>in vitro</i> .					
Línea de células tumorales	Suma Bliss (SEQ ID NO:19 + DTX)		Línea de células tumorales	Suma Bliss (SEQ ID NO:19+ venitoclax)	Suma Bliss (SEQ ID NO:19 + navitoclax)
LG0552	748,2		WSU-DLCL2	1292	560
NCI-H522	549,1		SU-DHL-4	898	617
NCI-H647	452		OCI-AML3	831,9	456,4
NCI-H727	429,4		OCI-AML5	777,8	174,5
NCI-H1373	387,1		U2932	736,2	636,1
NCI-H596	261		PL-21	600,8	244,9
HCC2935	224,2		ULA	343,8	79,4
NCI-H2347	154		OCI-Ly18	309,8	8,3

NCI-H2444	135		MV4;11	301,1	351
A549	118,1		RL	286,1	446,7
NCI-H23	70,6		MOLM-13	270,6	264,8
NCI-H847	64,2		SKM-1	222,9	88,1
HCC4006	15,75		OCI-Ly1	218,8	69,1
NCI-H2170	-97,1		SU-DHL-16	217,5	142,5
LG0567	-105,2		OCI-AM12	160,2	145,5
HCC2935	-183		OCI-Ly8	154,9	177
HCC827	-292,8		THP-1	152,7	43,1
NCI-H661	-344,5		OCI-Ly3	146,5	-242,2
NCI-H441	-362		OCI-Ly2	145	127,2
NCI-H1395	-512		OCI-Ly19	114,9	37,3
NCI-H1944	-565		SKNO-1	104,7	-138,9
NCI-H1693	-584		UKE-1	80,5	28,9
Calu-6	-628,7		WSU-NHK	79,8	84
LG0481	-803		EOL-1	69,7	-6,3
NCI-H2172	-1404		SU-DHL-2	53,5	-31,8
			Toledo	51,4	-68,2
			HEL	21,5	-92,4
			NuDHL-1	-28,4	18,7
			TF-1	-100,6	-50,2
			RC-K8	-131	-68
			HT	-173	12,1
			HL-60	-176	-112,7
			SHI-1	-208,4	-122,6
			SU-DHL-8	-210,6	-37
			SU-DHL-5	-233,8	-280,6
			SET-2	-248,4	71,2
			KG-1	-260	-20,3
			Kasumi-1	-356,4	-241,2

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

Se evaluó el efecto de una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO:19 sobre el crecimiento tumoral en xenoinjertos de tumores subcutáneos implantados Colo205 (colorrectal), SKM-1 (leucemia mieloide aguda), y H460LM (pulmonar de células no pequeñas) en ratones hembra SCID (Charles Rivers Laboratories; Wilmington, MA). En resumen, se inocularon subcutáneamente células cancerosas humanas en el flanco de la nalga derecha de ratones SCID hembra el día 0 del estudio. La administración de la proteína agonista de los receptores de TRAIL con la SEQ ID NO:19 (0,3, 1, o 3 mkd dosificada por vía IV, QDx5 o IP, Q2Dx5 según se indique) se inició en el momento en que se alcanzaba el tamaño deseado. Se midió el volumen tumoral durante la duración del experimento hasta que el volumen tumoral medio de cada grupo alcanzó un punto final de >2000 mm³ para Colo205 y SKM-1 o >2500 mm³ para H460LM. En las Figuras 21-23 se muestran los resultados. La administración de una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO:19 indujo una significativa inhibición del crecimiento tumoral en los modelos de xenoinjerto de tumor Colo205, SKM-1, y H460LM.

También se evaluó el efecto de una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO:19 sobre el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto obtenidos de pacientes: CTG-0069 (colorrectal), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (pancreático), CTG-0714 (sarcoma), CTG-0136 (esofágico), CTG-485 (gástrico), y CTG-0785 (sarcoma de Ewing) implantado en ratones hembra NSG (Champions Oncology; Hackensack, NJ). En resumen, se propagaron subcutáneamente fragmentos de tumor en el flanco de la nalga derecha de ratones NSG hembra el día 0 del estudio. La administración de una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO: 19 (3 mkd dosificada IP, Q2Dx5) se inició en el momento en que se alcanzaba el tamaño deseado. Se midió el volumen tumoral durante la duración del experimento hasta que el volumen tumoral medio de cada grupo alcanzó un punto final de >2000 mm³ o 60 días. Los resultados se muestran en las Figuras

24(A-G). La administración de una proteína agonista de los receptores de TRAIL formada por dos polipéptidos con la secuencia de aminoácidos que se da en la SEQ ID NO: 19 indujo una significativa inhibición del crecimiento tumoral en los modelos CTG-0069 (colorrectal), CTG-0167 (NSCLC), CTG-0293 (pancreático),
5 CTG-0714 (sarcoma), CTG-0136 (esofágico), CTG-485 (gástrico), y CTG-0785 (sarcoma de Ewing) PDX.