

PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE GITRL Y USOS DE LAS MISMAS
REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO
ELECTRÓNICAMENTE

El contenido del listado de secuencias presentado
5 electrónicamente en archivo de texto ASCII (nombre GITRLF-
100P2_ST25.txt; tamaño: 56,159 bytes; y Fecha de creación:
15 de junio de 2016) presentado con la solicitud se incorpora
a la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

10 La proteína relacionada con el receptor de factor de
necrosis tumoral (TNFR) inducido por glucocorticoides
(GITR), también conocida como TNFRSF18, AITR o CD357, se
expresa en células T reguladoras y se regula por incremento
en células T citotóxicas CD8⁺ y células auxiliares CD4⁺
15 expuestas a antígeno así como células NK activadas (Stephens
et al. *J. Immunol.* (2004) 173(8): 5008-5020; Clothier y
Watts, *Cytokine Growth Factor Rev.* (2014)). GITR es parte de
un sistema complejo de receptores y ligandos que están
implicados en el control de la activación de células T por
20 exposición a antígeno. GITR tiene un ligando endógeno
conocido, el ligando de GITR (GITRL), que existe en una forma
trimérica suelta y puede agrupar GITR dando como resultado
acontecimientos de señalización celular potentes dentro de
las células T (Chattopadhyay et al. (2007) *Proc. Natl. Acad.*
25 *Sci. USA* 104(49):19452-19457). La interacción entre GITR y
GITRL da como resultado el suministro de señales
coestimuladoras positivas a células T, lo que potencia su
proliferación y activación mediante exposición a antígeno,
ayuda a promover la generación de células de memoria y
30 reprograma las células T reguladoras; reduciendo sus
funciones supresoras (Clothier y Watts, *Cytokine Growth*

Factor Rev. (2014) Jan 4; Schaer et al. *Curr Opin Immunol.* (2012)).

SUMARIO

Esta divulgación se refiere a subunidades polipeptídicas, incluyendo cada una, como polipéptido de fusión, el dominio de unión a receptor del ligando de GITR (GITRL), un dominio de multimerización, p. ej. dominio de trimerización, y un dominio de Fc de IgG, que pueden formar proteínas multiméricas estables, p. ej., hexaméricas. Se proporcionan composiciones y métodos que son útiles para la inmunoterapia contra el cáncer y el tratamiento de infecciones virales.

En determinados aspectos, se proporcionan subunidades polipeptídicas de una sola cadena aisladas que incluyen: un dominio de Fc de IgG; un dominio de multimerización funcional; y un dominio de unión a receptor de un ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL), en el que la subunidad polipeptídica puede autoensamblarse para dar una proteína trimérica o una hexamérica.

En determinados aspectos, se proporcionan proteínas triméricas que incluyen tres subunidades polipeptídicas de una sola cadena que incluyen cada una: un dominio de Fc de IgG; un dominio de multimerización funcional; y un dominio de unión a receptor de un ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL).

En determinados aspectos, se proporcionan proteínas hexaméricas que incluyen seis subunidades polipeptídicas de una sola cadena que incluyen cada una: un dominio de Fc de IgG; un dominio de multimerización funcional; y un dominio de unión a receptor de un ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL).

En determinados aspectos, se proporcionan composiciones que incluyen las proteínas hexaméricas y un portador.

En determinados aspectos, se proporcionan polinucleótidos que incluyen un ácido nucleico que codifica
5 las subunidades polipeptídicas de una sola cadena o las proteínas hexaméricas.

En determinados aspectos, se proporcionan vectores que incluyen los polinucleótidos que codifican las subunidades polipeptídicas de una sola cadena o las proteínas
10 hexaméricas.

En determinados aspectos, se proporcionan células huésped que incluyen los polinucleótidos que codifican las subunidades polipeptídicas de una sola cadena o las proteínas hexaméricas o que incluyen los vectores que incluyen los
15 polinucleótidos.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de producción de las subunidades polipeptídicas o de producción de las proteínas hexaméricas, en donde los métodos incluyen cultivar las células huésped que incluyen polinucleótidos o
20 vectores que codifican las subunidades polipeptídicas o proteínas hexaméricas en condiciones en las que se expresa la subunidad polipeptídica o la proteína hexamérica codificada por el polinucleótido o vector, y recuperar la subunidad polipeptídica o proteína hexamérica.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos para promover la supervivencia o proliferación de células NK activadas y/o células T expuestas a antígeno, en donde los métodos incluyen poner en contacto células NK y/o células T expuestas a antígeno con la proteína hexamérica o la
25 composición, en los que la proteína hexamérica puede unirse
30

específicamente a GITR en la superficie de las células T y/o células NK.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de inducción de la liberación de citocinas a partir de células inmunitarias que expresan GITR activado, en donde los métodos incluyen poner en contacto estas células con la proteína hexamérica o la composición, en los que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de estas células.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de promoción de la activación de células T o células NK, en donde los métodos incluyen poner en contacto células T o células NK con la proteína hexamérica o la composición, en los que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de las células T o células NK.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de tratamiento de cáncer en un sujeto, en donde los métodos incluyen la administración a un sujeto que necesita tratamiento de una cantidad eficaz de la proteína hexamérica, o la composición.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde los métodos incluyen administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína hexamérica, o la composición.

En determinados aspectos, se proporcionan métodos de tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, que comprende administrar la subunidad polipeptídica de una sola cadena aislada dada a conocer anteriormente y un agonista de OX40 al sujeto.

En otro aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, que comprende administrar la subunidad polipeptídica de una sola cadena aislada dada a conocer anteriormente y un agente de sensibilización de células T al sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Análisis de SDS-PAGE de proteína de fusión (FP) de GITRL recombinante (matrilina 1 tn) y proteínas FP de GITRL (coronina 1a tn) purificadas usando cromatografía de proteína G y de exclusión molecular.

Figuras 2A-D. Gráfico que muestra el perfil de unión de las variantes de FP de GITRL hexaméricas a células CHO que expresan GITR.

Figuras 3A-D. Gráfico que muestra el perfil de inhibición de las variantes de FP de GITRL hexaméricas que compiten por la unión de GITRL trimérico a GITR-Fc.

Figuras 4A-D. Gráfico que muestra la potencia relativa de las moléculas de FP de GITRL usando una línea celular indicadora de gen de luciferasa NF- κ B transfectada con GITR.

Figuras 5A-D. Transiciones de desplegamiento de FP de GITRL hexamérica (GCN4 pII), FP de GITRL (coronina 1a tn), FP de GITRL (langerina tn) y FP de GITRL (langerina variante).

Figura 6. La composición de masa molar de los picos eluidos. El gráfico muestra que la proteína matrilina-1 de FP de GITRL multimérica (línea de puntos) en disolución forma tres especies con masa molar promedio en peso (de izquierda a derecha) de 612, 312 y 215 kDa sin especie principal fácilmente identificable. Por otro lado, >90% de la masa de proteína FP de GITRL multimérica (coronina 1a tn; línea discontinua) y FP de GITRL multimérica (GCN4 pII; línea

continua) eluye como una única especie de proteína. No obstante, estos picos no son perfectamente monodispersos los más probablemente debido a la heterogeneidad de glicanos unidos a la proteína.

5 Figura 7. Esquema de una molécula de FP de GITRL hexamérica.

Figura 8. Secuencia de nucleótidos y de proteína traducida de una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL IgG1 representativo. Los dominios individuales están resaltados e indicados. ECD = dominio extracelular; GITRL =
10 ligando de receptor de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; HA = hemaglutinina. La secuencia de ácido nucleico de la figura 8 se proporciona como SEQ ID NO: 7 y la secuencia de proteína precursora codificada se
15 proporciona como SEQ ID NO: 8.

Figura 9. Espectro de EM de CL-QTOF deconvoluido para una subunidad de FP de GITRL IgG1 reducida. La masa exacta de la subunidad monomérica de FP de GITRL IgG1 (SEQ ID NO: 6), tal como se determina mediante espectrometría de masas de cromatografía de líquidos acoplada con tiempo de vuelo de
20 cuadrupolo (QTOF) (EM de CL-QTOF), concuerda con la secuencia de aminoácidos esperada con la adición de un glicano biantenarico (predominantemente G0f) por cadena en el sitio de glicosilación canónico en el dominio de Fc.

25 Figura 10. GITR-Fc humano conjugado con criptato de europio se une a hGITRL-HA en un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogéneo. Una titulación del anticuerpo de control de isotipo IgG1 no inhibe esta unión. FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas que
30 tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 inhibe la unión entre hGITR y hGITRL con una concentración

inhibidora mitad de la máxima (CI50) de 0.562 nM. Se realizaron experimentos en pocillos por duplicado. Las barras de errores representan el error típico de la media. GITR(L) = receptor de factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (ligando).

Figura 11. FP de GITRL hexaméricas son agonistas potentes del receptor GITR. Se añadieron artículos de prueba en disolución, a las concentraciones indicadas, a células Jurkat transfectadas con hGITR y un gen de indicador de luciferasa unido a un promotor de NFκB. Se determinó la actividad luciferasa, medida como luminiscencia, tras tres horas. FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o FP de GITRL IgG4P hexamérica que comprende subunidades monoméricas que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40 dio como resultado un aumento de luminiscencia dependiente de la concentración. La CE₅₀ de la FP de GITRL IgG1 hexamérica con respecto a este efecto fue de 182 pM. La CE₅₀ de la FP de GITRL IgG4P hexamérica con respecto a este efecto fue de 289 pM. Un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto. Se realizaron experimentos en pocillos por triplicado. Las barras de errores representan el error típico de la media.

Figura 12. FP de GITRL hexamérica potencia la proliferación de células T humanas primarias en respuesta a anti-CD3 y anti-CD28. La proliferación de células T humanas primarias en respuesta a anti-CD3 y anti-CD28 aumentó mediante la adición de FP de GITRL IgG1 hexamérica unida a placa que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:6 o FP de GITRL IgG4P hexamérica que comprende subunidades monoméricas

que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40. El efecto era dependiente de la concentración, con una CE_{50} de 0.3 nM para la FP de GITRL IgG1 y una CE_{50} de 0.5 nM para la FP de GITRL IgG4P. La adición de un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto. Se realizaron experimentos en pocillos por triplicado. Las barras de errores representan el error típico de la media.

Figura 13. La liberación de IFN- γ por células T humanas primarias en respuesta a anti-CD3 y anti-CD28 aumentó mediante la adición de FP de GITRL IgG1 hexamérica unida a placa que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 o FP de GITRL IgG4P hexamérica que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40. El efecto era dependiente de la concentración, con una CE_{50} de 0.6 nM para la FP de GITRL IgG1 y una CE_{50} de 0.8 nM para la FP de GITRL IgG4P. La adición de un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto. Se realizaron experimentos en pocillos por triplicado. Las barras de errores representan el error típico de la media.

Figura 14. FP de GITRL IgG1 hexamérica media en la ADCC de células T humanas primarias por células NK. Se marcaron fluorescentemente células T humanas primarias expuestas a antígeno y se mezclaron con células NK humanas primarias a una razón de 1 célula T con respecto a 32 células NK. Se añadieron artículos de prueba tal como se indicó y se calculó el % de lisis de células T tras 24 horas de incubación. FP de GITRL hexamérica IgG1 que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 da como resultado un aumento en el porcentaje de lisis. El efecto era dependiente de la concentración con

una CE_{50} de 239 pM. El control negativo, FP de GITRL IgG4P hexamérica que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40, no dio como resultado ningún aumento en el porcentaje de lisis de células T.

Figura 15. ADCC mediada por FP de GITRL IgG1 hexamérica favorece la generación de una razón de células T CD8:CD4 aumentada. Se marcaron fluorescentemente células T humanas primarias expuestas a antígeno y se mezclaron con células NK humanas primarias a una razón de 1 célula T con respecto a 32 células NK. Se añadieron artículos de prueba tal como se indica y se evaluó el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en la población de células T total mediante citometría de flujo tras 24 horas de incubación. FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 da como resultado un desplazamiento dependiente de la concentración en la razón de células T CD8:CD4, lo que favorece células T CD8.

Figura 16. FP de GITRL IgG1 hexamérica supera la supresión mediada por células T reguladoras de la proliferación de células T efectoras. Se analizó el porcentaje células T efectoras CD4⁺ CD25⁻ divididas mediante citometría de flujo tras estimulación durante cinco días con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El porcentaje de células en división se redujo en presencia de números crecientes de T-reg. La adición de control de isotipo unido a placa disminuyó adicionalmente el porcentaje de células en división. La adición de FP de GITRL IgG1 hexamérica unida a placa que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 a la

concentración indicada restauró el porcentaje de células en división a lo observado en ausencia de T-regs. Los experimentos usando efectores solo fueron en pocillos individuales. Se realizaron todos los demás experimentos en pocillos por duplicado. Las barras de errores representan el error típico de la media.

Figura 17. La supervivencia de ratones tratados con FP de mGITRL depende del isotipo. Se trataron los ratones mediante administración intraperitoneal de FP de mGITRL mIgG2a o FP de mGITRL IgG1, ambas a 5 ó 10 mg/kg, diariamente desde el día 6 hasta el día 23 tras implantación subcutánea de células CT26. Se administró solución salina como control negativo.

Figura 18. FP de mGITRL da como resultado un aumento de la proliferación de células T. Se midió la expresión de Ki67 mediante citometría de flujo en células T esplénicas siete días tras el tratamiento con una única dosis de FP de mGITRL o bien 0.2 mg/kg o bien 1 mg/kg. Líneas negras con círculos = células T CD8; líneas gris oscuro con cuadrados = CD4⁺ Foxp3⁻; líneas gris claro con triángulos = células CD4⁺ Foxp3⁺. Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student en donde *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Figura 19. FP de mGITRL da como resultado un aumento de la expresión del marcador de activación ICOS en células T. Se midió la expresión de ICOS mediante citometría de flujo en células T esplénicas siete días tras el tratamiento con una única dosis de FP de mGITRL o bien 0.2 mg/kg o bien 1 mg/kg. Líneas gris oscuro con círculos = células T CD8; líneas negras con cuadrados = CD4⁺ Foxp3. Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student en donde

*p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. El tratamiento con FP de mGITRL dio como resultado una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ y células auxiliares CD4⁺ FOXP3⁻ dentro del tumor, pero no alteró la frecuencia de células T citotóxicas CD8⁺. El resultado global fue una razón de CD8:CD4 aumentada dentro del microentorno del tumor.

Figura 20. FP de mGITRL da como resultado una razón de CD8:CD4 aumentada dentro del tumor. Se midió la frecuencia de células T CD8 (línea negra con círculos); células CD4⁺ Foxp3⁻ (línea gris oscuro con cuadrados); células CD4⁺ Foxp3⁺ (líneas gris claro con triángulos) mediante citometría de flujo dentro del tumor 7 días tras el tratamiento con una única dosis de FP de mGITRL o bien 0.2 mg/kg o bien 1 mg/kg. Se calculó la significación usando la prueba de la t de Student en donde *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Figura 21. Datos de ELISA que demuestran que FP de hGITRL IgG1 FP hexamérica se une a GITR-Fc de ser humano y cynomolgus. Se usó la unión de FP de hGITRL IgG1 hexamérica biotinilada que comprende subunidades monoméricas que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 a GITR. CD137-Fc de ser humano y mono cynomolgus (cyno) recombinante como control negativo para determinar la señal de fondo en el ensayo. Se realizaron experimentos en pocillos por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. CD137 = grupo de diferenciación 137 (TNFRSF9); CD137-Fc = dominio extracelular de grupo de diferenciación 137 unido al dominio de Fc de hIgG1; Cyno = mono cynomolgus; ELISA = ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; GITR-Fc = dominio extracelular de receptor de factor de necrosis

tumoral inducido por glucocorticoides unido al dominio de Fc de hIgG1; DO450nm = lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm.

Figura 22. Medición de subpoblaciones de células T positivas para %KI67 en monos Cynomolgus tratados con FP de hGITRL IgG1 hexamérica. Se monitorizaron monos Cynomolgus para determinar los niveles de nivel inicial de subpoblaciones de células T positivas para %KI67 durante 20 días, tratadas con o bien un control de vehículo (círculos), FP de hGITRL IgG1 1 mg/kg (triángulos) o bien FP de hGITRL IgG1 10 mg/kg (cuadrados) en el día 0, y luego se monitorizaron para determinar las subpoblaciones de células T positivas para %KI67 en los días 1, 3, 5, 9, 11, 15, 18, 22 y 29.

Figuras 23 A-B. Perfiles de inhibición para proteínas FP de hGITRL proteínas que compiten por la unión de hGITRL trimérico a hGITR-Fc y valores de CI_{50} . FP de hGITRL tn, N92D y N104D (A) y FP de hGITRL, N161D (B)

Figura 24. Perfiles de unión para proteínas FP de hGITRL a hGITR-Fc y valores de K_d .

Figuras 25 A-C. Gráficos que muestran la potencia relativa de las moléculas de FP de GITRL usando una línea celular indicadora de gen de luciferasa NF- κ B transfectada con GTR humano y valores de CE_{50} . FP de hGITRL tn y N92D (A); FP de hGITRL tn, N161D, N129A y N129A/N161D (B); N161D y N129A/N161D (C).

Figuras 26 A-C. Gráficos que muestran la potencia relativa de las moléculas de FP de GITRL moléculas usando un ensayo de reestimulación de células T CD3⁺ primarias humanas con una lectura de incorporación de timidina. FP de hGITRL

tn y N92D (A); FP de hGITRL tn, N92D y N104D (B); tn y N161D (C).

Figura 27. Transiciones de desplegamiento FP de GITRL tn y variante N92D.

5 Figura 28. Estructuras de oligosacáridos predominantes encontradas en FP de hGITRL producidas en células de ovario de hámster chino; tipo complejo (A); alto contenido en manosa (B). Man = manosa; GlcNAc = N-acetilglucosamina; Fuc = fucosa; Gal = galactosa; NANA = ácido N-acetilneuramínico
10 (ácido siálico).

Figuras 29 A-C. Mapeo de péptidos de FP de GITRL. Cromatogramas iónicos extraídos para péptido tríptico 7 (T7), que contiene el sitio de N-glicosilación de Fc, para FP de GITRL tn (Ai) y FP de GITRL N161D (Aii). Espectros de
15 masas combinados, deconvueltos para T7, que muestran las glicoformas predominantes, para FP de GITRL tn (Aiii) y FP de GITRL N161D (Aiv). Cromatogramas iónicos extraídos para péptido tríptico 40 (T40), que contiene la secuencia consenso de N-glicosilación de GITRL ECD N129, para FP de GITRL tn
20 (Bi) y FP de GITRL N161D (Bii). Espectros de masas combinados, deconvueltos para T40, que muestran una masa consecuente con la ausencia de N-glicosilación en N129, para FP de GITRL tn (Biii) y FP de GITRL N161D (Biv). Cromatogramas iónicos extraídos para péptido tríptico 42-43
25 (T42-43) y 43 (T43) para FP de GITRL tn (Ci) y FP de GITRL N161D (Cii), respectivamente. Espectros de masas combinados, deconvueltos para T42-43 para FP de GITRL tn (Ciii) que muestran las glicoformas predominantes en el sitio de N-glicosilación GITRL ECD N161. Espectros de masas combinados,
30 deconvueltos para T43 para FP de GITRL N161D (Civ), que

muestran una masa que confirma la sustitución N161D y la ausencia de N-glicosilación.

Figuras 30 A-C. Estructura y potencial agonista de una proteína de fusión de ligando de GITR murino. (A) Esquema de FP-GITRL murino que consiste desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, en una región de fragmento cristalizable (Fc) de una inmunoglobulina G1 (IgG1) o 2a (IgG2a), un dominio de multimerización (MD) y el dominio extracelular (ECD) (de unión a GITR) de ligando de GITR murino (B) SDS-PAGE de la FP-GITRL murino. (C) Luminiscencia asociada a NF- κ B en una línea de células Jurkat transducida con receptor de GITR murino tras el tratamiento con FP de mGITRL, controles de isotipo de DTA-1 rIgG2b o FP de mOX40L. Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Figuras 31 A-E. El acoplamiento de Fc γ R exhaustivo aumenta la actividad antitumoral pero no dirige una proliferación de células T aumentada aguas abajo de GITR (A) Crecimiento tumoral en ratones Balb/c. Se trataron los ratones una vez mediante inyección i.p. de control de solución salina, FP de mGITRL mIgG1 o FP de mGITRL mIgG2a tal como se indica. El número de regresiones se indica en cada gráfico individual (B) Frecuencia de expresión de Ki67 en células T esplénicas 4 días tras el tratamiento de ratones que llevan tumor CT26. (C) Frecuencia de subconjuntos de células T intratumorales y (D) razón de células CD8+ con respecto a CD4+ FoxP3+ intratumorales 4 días tras el tratamiento de ratones que llevan tumor CT26 con 10 mg/kg de FP de mGITRL o control de solución salina tal como se indica. (E) Mediana de la intensidad de fluorescencia de la expresión de GITR en subconjuntos de células T esplénicas e

intratumorales 4 días tras el tratamiento. Las barras de error indican error estándar de la media; n= 7-10 ratones por grupo. Para (B) y (C) **p<0.005 ***p<0.001 y ****p<0.0001, tal como se calcula mediante ANOVA de dos vías; la significación para C está en negro para los cambios en células CD4+ Foxp3+ y en gris para los cambios en células CD4+ Foxp3-; para (D) *P<0.05, tal como se calcula mediante ANOVA de una vía; para (E) ****p<0.0001, tal como se calcula para la prueba de la T de Student.

Figuras 32 A-B. Agotamiento de T-reg intratumorales y razón de CD4+ Foxp3-: T-reg tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a o mIgG1. Se les inyectó a ratones que llevan tumor CT26 o bien control de solución salina, FP de mGITRL mIgG1 (10 mg/kg) o bien FP de mGITRL mIgG2a (10 mg/kg) una vez por vía i.p. a los 6 días tras la implantación de CT26. (A) Gráficos de citometría de flujo que muestran la proporción de T-reg CD4+ Foxp3+ en el tumor 4 días tras el tratamiento. La separación por análisis de citometría de flujo de CD4+ Foxp3+ se sitúa basándose en la fluorescencia de Foxp3 menos un control (FMO). (B) Razón de CD4+ Foxp3-: T-reg intratumoral medida a los 4 días tras el tratamiento tal como se indica. Se llevó a cabo análisis estadístico usando ANOVA de una vía en donde **** indica un valor de P <0.0001.

Figuras 33 A-C. GITRL murino-FP mIgG2a media en la actividad antitumoral de una manera dependiente de la dosis y el programa. Crecimiento tumoral en ratones Balb/c. Se trataron los ratones mediante inyección i.p. de (A) una única dosis de FP de mGITRL mIgG2a, al nivel de dosis indicado o (B) múltiple dosis de FP de mGITRL mIgG2a 0.2 mg/kg administradas diariamente [Q1D] o semanalmente [Q1W]. (C)

Concentración en suero predicha de FP de mGITRL tras la administración usando la dosis y el programa indicados. La línea discontinua indica el umbral de concentración en sangre de FP de mGITRL mIgG2a requerida para lograr la actividad antitumoral máxima.

Figuras 34 A-D. GITRL murino-FP mIgG2a media en los cambios de PD en la activación y proliferación de células T de una manera dependiente de la dosis y el programa. Frecuencia de (A) Ki67, (B) ICOS, (C) PD-1 y (D) células T CD4+ positivas para OX40 en el ganglio linfático drenante del tumor de ratones que llevan tumor CT26 7 días tras el tratamiento con mIgG2a FP de mGITRL 0.2 o 1 mg/kg una vez, cada tres días [Q3D] o cada día [Q1D]. Las barras de error representan el error estándar de la media de 7-8 ratones por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, tal como se calcula mediante ANOVA de una vía.

Figuras 35 A-B. Perfil de unión y potencia de una proteína de fusión de ligando de OX40 de ratón. (A) ELISA de unión que muestra que FP de mGITRL mIgG1 y mIgG2a se unen cada uno específicamente a Fc-GITR de ratón recombinante (barras negras) y no a Fc-OX40 de ratón recombinante y que FP de mOX40L mIgG1 y mIgG2a se unen cada uno específicamente a OX40 de ratón recombinante (barras grises) y no a GITR de ratón recombinante. El control de isotipo FP de mOX40L Y182A se une mínimamente a Fc-OX40 de ratón recombinante. (B) Unión de FP de mOX40L mIgG1 (círculos negros) o control de isotipo Y182A (círculos blancos) a OX40 humano en la línea celular indicadora de NF- κ B OX40 Jurkat. OX40L de ratón FP mIgG1 indujo señalización de NF κ B en el ensayo indicador pero esto no era evidente para el control de isotipo FP de mOX40L Y182A.

Figuras 36 A-B. La actividad antitumoral de FP de mGITRL es superior a la de FP de mOX40L en el modelo de CT26. (A) Crecimiento tumoral en ratones Balb/c. Se trataron los ratones dos veces a la semana con una inyección i.p. de mIgG2a o mIgG1 FP de mGITRL o FP de mOX40L 5 mg/kg, control de isotipo de proteína de fusión de mIgG1 5 mg/kg o solución salina, el número de regresiones totales se indica en cada gráfico individual. (B) Frecuencia de T-regs CD4+, FoxP3+ intratumorales en ratones Balb/c que llevan tumor CT26 a los 10 días tras el tratamiento tal como se indica.

Figuras 37 A-E. Los cambios en la farmacodinámica (PD) mediados por FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1 son diferenciales y pueden potenciarse a través de combinación. La frecuencia de células T (A) CD4+ FoxP3- o CD8+, Ki67+ (B) de memoria efectoras CD4+ o CD8+, CD44+ CD62L Lo/-, (C) de memoria centrales CD4+ CD44+ CD62L+, (D) CD4+ o CD8+, T-bet+ y (E) CD4+ EOMES+ en los bazo de ratones que llevan tumor CT26 14 días tras el tratamiento dos veces a la semana con o bien FP de mGITRL mIgG2a 25 mg/kg, FP de mOX40L mIgG1 15 mg/kg o bien una combinación de ambas moléculas. *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, ****p<0.0001, tal como se calcula mediante ANOVA de una vía.

Figuras 38 A-B. La combinación de FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1 produce sinergia para inducir una actividad antitumoral aumentada en ratones que llevan tumor CT26 y B16F10-Luc2. Crecimiento tumoral en ratones que llevan tumor CT26 v B16F10-Luc2. (A) Se les dosificó a ratones que llevan tumor B16F10-Luc2 por vía i.p. con solución salina, FP de mGITRL mIgG2a 25 mg/kg bisemanalmente durante dos semanas, FP de mOX40L mIgG1 15 mg/kg bisemanalmente durante tres semanas o una combinación de ambas moléculas y se midió

el crecimiento tumoral. (B) Los ratones que llevan tumor CT26 no se trataron o se trataron mediante inyección i.p. de control de isotipo, 7.5 mg/kg de FP de mOX40L mIgG1 dos veces a la semana durante dos dosis, una única dosis subóptima de
5 FP de mGITRL mIgG2a a 0.1 mg/kg o la combinación de ambas moléculas. El número de regresiones totales se indican al lado de cada gráfico individual.

Figura 39. La combinación de FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1 induce un aumento de supervivencia de ratones
10 que llevan tumores B16F10-Luc2 en comparación con el tratamiento de monoterapia. Se les dosificó a ratones que llevan tumor B16F10-Luc2 por vía i.p. con solución salina, FP de mGITRL mIgG2a 25 mg/kg bisemanalmente durante dos semanas, FP de mOX40L mIgG1 15 mg/kg bisemanalmente durante
15 tres semanas o una combinación de ambas moléculas y se midió la supervivencia. Prueba de rangos logarítmicos, en donde *** indica un valor de $P < 0.001$, ** indica un valor de $P < 0.01$ y * indica un valor de $P < 0.05$.

Figuras 40 (A)-(G). (A) Se implantaron células CT26 por
20 vía subcutánea en ratones Balb/c, 5×10^5 células/ratón. Se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 6 y se inició la dosificación (Grupo n=10 ratones). Se les dosificó a los ratones por vía i.p. FP de mGITRL IgG2a o bien con (B) una única dosis o (C) cada dos días durante 9
25 dosis, Q2Dx9. Se les dosificó a 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1 y 0.04 mg/kg. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos repetidos. (D) El día 11 se aleatorizaron basándose en el tamaño tumoral y se trataron con nada, DTA-1 (AcM anti-GITR) o FP de mGITRL (Grupo n=9). (E) Se agotaron
30 las células T CD8 de los ratones el día 8, 10, 12, 14 y 16. El día 11 se aleatorizaron basándose en el tamaño tumoral y

se trataron con nada, DTA-1 o FP de mGITRL IgG2a. (F) Mediana de supervivencia. (G) El día 18, se sacrificaron los ratones no tratados con tumores CT26 para examinar la expresión de GITR en células T CD8 y Tregs en el bazo y el tumor.

5 Figuras 41 (A) - (H). (A) Se implantaron células CT26 por vía subcutánea en ratones Balb/c, 5×10^5 células/ratón. Se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 10 y se inició la dosificación. Se les dosificó a los ratones por vía i.p. FP de mGITRL IgG2a bisemanalmente durante 4
10 dosis totales. El día 18 se sacrificaron los ratones para examinar (B) Tregs, (C) células T CD8. (D) Se reestimularon tumores de bazos de ratón con inhibidor del transporte de péptidos/proteínas AH1 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 horas y se tiñeron para detectar IFN γ y TNF α . (E) Expresión de GITR en
15 células CD8. (F) Expresión de GITR en Tregs en el bazo, ganglio linfático y tumor. (G) KI-67 en células T CD4 (H) KI-67 en las células T CD8.

 Figuras 42 (A)-(C). FP de mGITRL expande células T específicas de antígeno de una manera dependiente de la
20 dosis. (A) Ratones que llevan tumor CT26 tratados con una única dosis de FP de mGITRL IgG2a eliminan los tumores y están protegidos de la reexposición con 5×10^5 células CT26/ratón el día 85[flecha R]. (B) Tras la reexposición con CT26, el día 120, se recogió el bazo del ratón [flecha PD],
25 se procesó para dar células individuales y se reestimularon con inhibidor del transporte de péptidos/proteínas AH1 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 5 horas. Los ratones tenían un aumento dependiente de la dosis en células T específicas para AH1. (C) Gráfico representativo de 5 ratones de cada grupo. Para
30 comparación, se incluyen ratones sin tratamiento previo y ratones no tratados con tumores CT26 el día 10.

Figuras 43 (A)-(D). (A)-(B) Se implantaron células TC-1 en la almohadilla plantar de ratones C57BL/6, 2×10^4 células/ratón. Se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 14 y se inició la dosificación. Se les dosificó a los ratones por vía i.p. FP de mGITRL IgG2a bisemanalmente durante 4 dosis totales. El día 24, se sacrificaron los ratones no tratados para examinar (C) la expresión de GITR en Tregs y la expresión de GITR en células T CD8. Se evaluaron los ratones para detectar células T específicas de E7, y no se detectaron ninguna mediante reestimulación con E7 o mediante dextrámero.

Figuras 44 (A)-(K). (A) Para generar células T específicas de E7, se les inyectó a ratones C57BL/6 sin tratamiento previo 10 ug de E7 SLP en CpG (Addavax) en la base de la cola. Entonces se trataron los ratones con FP de mGITRL IgG2a a 1 mg/kg durante 3 dosis. Se evaluaron los ratones para detectar (B) células T CD4 (C) células T CD8 (D) células T E7 dextrámero+ (E) Tregs, (F) los niveles de GITR en las células específicas de antígeno. (G) Se implantaron células TC-1 en la almohadilla plantar de ratones C57BL/6, 2×10^4 células/ratón. Se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 14 y se inició la dosificación. Se les inyectó a ratones C57BL/6 10 ug de E7 SLP en CpG (Addavax) en la base de la cola. El día 28, se sacrificaron los ratones. Se evaluaron el bazo y el tumor para detectar (H)-(I) células T E7 y CD8 específicas (J)-(K).

Figura 45. (A) Se implantaron células TC-1 en la almohadilla plantar de ratones C57BL/6, 2×10^4 células/ratón. Se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 14 y se inició la dosificación. (B) Se les inyectó a ratones C57BL/6 vacunados 3.3 ug de E7 SLP en CpG (Addavax) en la

base de la cola. Se les dosificó a los ratones tratados por vía i.p. GITRL-FP IgG2a bisemanalmente durante 4 dosis totales. (C) Supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tras el implante de TC-1 con un $P < 0.05$. (D) Mediana de supervivencia de los grupos. (E) Para examinar los efectos farmacodinámicos, se sacrificaron grupos de ratones tratados igual en (A) y se recogieron los bazo y el tumor. Se dejaron los tumores y los bazo agrupados como individuos. (F) Se evaluaron células CD45+ en el tumor. (G) Se reestimularon los bazo y tumores de ratón con inhibidor del transporte de péptidos/proteínas E7 1 µg/ml durante 5 horas y se tiñeron para detectar IFNgamma y TNFalfa, y se midieron Tregs de bazo y tumor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El acoplamiento del receptor GITR en células T, p. ej., células T CD4+ o células T CD8+ durante, o poco después, de la sensibilización mediante un antígeno da como resultado un aumento de la respuesta de las células T, p. ej., células T CD4+ o células T CD8+ al antígeno. El acoplamiento del receptor GITR en células NK o células B, p. ej., durante, o poco después, de la sensibilización mediante una señal activante (p. ej., exposición a antígeno) da como resultado una respuesta aumentada de las células NK o células B. En el contexto de la presente divulgación, el término "acoplamiento" se refiere a unión a y estimulación de al menos una actividad mediada por el receptor GITR. Por ejemplo, el acoplamiento del receptor GITR sobre especificidades de antígeno, p. ej., células T CD4+ o células T CD8+ da como resultado un aumento de la proliferación de células T y un aumento de la producción de citocinas, en comparación con la respuesta a antígeno solo. La respuesta

elevada al antígeno puede mantenerse durante un periodo de tiempo sustancialmente más largo que en ausencia de acoplamiento a receptor GITR. Por tanto, la estimulación por medio del receptor GITR potencia la respuesta inmunitaria específica de antígeno reforzando el reconocimiento por células T, células NK o células B de antígenos no propios, p. ej., antígenos tumorales o antígenos virales. GITR se ha implicado en el control mediado por células T de determinadas infecciones virales crónicas (Pascutti, *et al.*, PLoS Pathog. 4 de marzo de 2015; 11(3); Clouthier, *et al.*, PLoS Pathog. 15 de enero de 2015; 11(1)).

Los agonistas de GITR pueden potenciar respuestas inmunitarias específicas de antígeno en un sujeto, tal como un sujeto humano, cuando se administran al sujeto durante o poco después de la sensibilización de células T mediante un antígeno. Los agonistas de GITR incluyen ligando de GITR ("GITRL"), tal como proteínas de fusión de GITRL soluble y anticuerpos anti-GITR o fragmentos de los mismos. Un ejemplo específico es una subunidad polipeptídica de fusión que comprende el dominio de unión a receptor de GITRL, un dominio de multimerización, p. ej., dominio de trimerización, p. ej., un dominio de alfa hélice superenrollada derivado de coronina 1a, y un dominio de Fc de IgG, en donde la subunidad polipeptídica se autoensambla para dar una proteína de fusión multimérica (p. ej., trimérica o hexamérica). También se describen en la presente ácidos nucleicos que incluyen secuencias de polinucleótido que codifican tales polipéptidos de fusión. Esta divulgación también proporciona métodos para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto usando las proteínas de fusión de GITRL multiméricas. Las composiciones y los métodos

divulgados en la presente con respecto a las proteínas de fusión de GITRL pueden aplicarse más generalmente a la producción y el uso de proteínas de fusión de unión a receptor multiméricas (p. ej., triméricas y hexaméricas),
5 por ejemplo, en un método de tratamiento de cáncer, un método de tratamiento de una infección viral o un método de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

Definiciones

El término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más
10 de esa entidad; por ejemplo, se entiende que el término "subunidad polipeptídica" representa una o más subunidades polipeptídicas. Como tales, los términos "un", "uno" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpreta comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2^a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of
20 Cell and Molecular Biology, 3^a ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos
25 utilizados en esta divulgación.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican con su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario,
30 las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo. Los

encabezados que se proporcionan en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o aspectos de la descripción, que pueden considerarse por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Por consiguiente, los
5 términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

Tal como se usa en la presente, la frase "expuesto a antígeno" se usa para describir una célula que se ha expuesto
10 a un antígeno en donde la exposición a ese antígeno ha provocado una respuesta en la célula.

Tal tal como se usa en la presente, se pretende que el término "polipéptido" abarque el singular, "polipéptido", así como el plural, "polipéptidos" y se refiere a una
15 molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unida linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto. De esta
20 manera, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteínas", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término o expresión utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos se incluyen en la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar
25 en vez de, o de forma indistinta con cualquiera de estos términos. Se pretende que el término "polipéptido" también haga referencia a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido que incluyen, sin carácter limitante, glucosilación, acetilación,
30 fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueadores/protectores conocidos, escisión proteolítica o

modificación mediante aminoácidos no convencionales. Un polipéptido se puede derivar de una fuente biológica natural o se puede producir mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Un polipéptido se puede generar de cualquier forma, incluida la síntesis química.

Una "proteína" tal como se usa en la presente puede referirse a un único polipéptido, es decir, una única cadena de aminoácidos como se ha definido anteriormente, pero también puede referirse a dos o más polipéptidos que están asociados, por ejemplo, por enlaces disulfuro, enlaces de hidrógeno, o interacciones hidrófobas, para producir una proteína multimérica. Tal como se usa en la presente, el término "subunidad polipeptídica" se refiere a una cadena polipeptídica de aminoácidos que puede interaccionar con otras subunidades polipeptídicas, tanto idénticas como diferentes, para formar una proteína multimérica, por ejemplo, una proteína hexamérica como se describe en el presente documento.

Un polipéptido como se divulga en esta memoria puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1,000 o más, o 2,000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no necesariamente tienen dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que adoptan más bien un gran número de diferentes conformaciones. Se denominan no plegados.

Una sustancia, composición "aislada", y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones o entidades, o cualquier variante gramatical de las mismas, p. ej., material biológico aislado, es una sustancia que no está en su medio natural. No se requiere un nivel concreto de purificación. Por ejemplo, un anticuerpo aislado es un anticuerpo que no se produce o se sitúa en su entorno nativo o natural. Los materiales biológicos producidos de manera recombinante se consideran aislados tal como se divulga en la presente, ya que son materiales que se producen en una célula no nativa, tal como un hibridoma. Una sustancia, p. ej., material biológico, se considera también "aislado" si se ha separado, fraccionado o purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada. En determinados aspectos, una sustancia aislada, p. ej., material biológico aislado, puede "producirse de manera no natural".

Tal como se usa en la presente, el término sustancia, composición, entidad "que se produce de manera no natural", y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones, o entidades, o cualquier variante gramatical de las mismas, es un término condicional que excluye explícitamente, pero sólo excluye, las formas de la sustancia, composición, entidad y/o cualquier combinación de sustancias, composiciones o entidades que los expertos habituales en la técnica entienden bien que se "producen de manera no natural", o que se determina o interpreta o podría determinarse o interpretarse en cualquier momento, por un juez o una agencia administrativa tal como la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, u órgano judicial, que se "produce de manera natural". Por ejemplo, el término "un anticuerpo que se produce de manera no natural" excluye explícitamente

anticuerpos que existen en la naturaleza, p. ej., un anticuerpo que estaría presente de manera natural en el sistema inmunitario de un ratón expuesto a un medio de estímulo antigénico, o un anticuerpo que determina finalmente un órgano administrativo, p. ej., la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, o un órgano judicial, p. ej., una corte federal, que se "produce de manera natural".

Otros polipéptidos divulgados en el presente documento son fragmentos, derivados, análogos o variantes de los péptidos anteriores, y cualquier combinación de estos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a una subunidad polipeptídica o a una proteína multimérica como se divulga en el presente documento pueden incluir cualquier polipéptido o proteína que retienen al menos alguna de las actividades del polipéptido y de la proteína completa, pero que es estructuralmente diferente. Los fragmentos de polipéptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección. Las variantes incluyen fragmentos, como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, deleciones, o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden producirse de forma espontánea o construirse a propósito. Las variantes de origen no natural se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis conocidas en la materia. Las variantes polipeptídicas pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Los derivados son polipéptidos que se han alterado con el fin de presentar características adicionales que no se encuentra en el polipéptido nativo. Ejemplos incluyen

proteínas de fusión. Las variantes de polipéptidos pueden también denominarse en esta memoria como "análogos de polipéptidos". Tal como se usa en la presente un "derivado" se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más aminoácidos químicamente derivatizados mediante reacción de un grupo secundario funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados aminoacídicos de origen natural o sintético de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina puede sustituirse por prolina; 5-hidroxilisina puede sustituirse por lisina; 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; homoserina puede sustituirse por serina; y ornitina puede sustituirse por lisina.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en donde un aminoácido se reemplaza por otro aminoácido que tiene una cadena secundaria similar. Se han definido en la técnica familias de aminoácidos que tienen cadenas secundarias similares, incluyendo cadenas secundarias básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas secundarias ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas secundarias no polares (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas secundarias beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas secundarias aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una fenilalanina por una tirosina es una sustitución conservadora. Los métodos para identificar nucleótidos y sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la actividad de la proteína

son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:.412-417 (1997)).

- 5 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo" (o un fragmento, variante o derivado del mismo) se refiere a al menos la parte mínima de un anticuerpo que puede unirse a antígeno, por ejemplo, al menos el dominio variable de una
- 10 cadena pesada (VH) y el dominio variable de una cadena ligera (VL) en el contexto de un anticuerpo típico producido por una célula B. Las estructuras básicas de los anticuerpos en sistemas vertebrados se comprenden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988).
- 15 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítipo, p. ej., Fab, Fab' y F(ab')₂,
- 20 Fd, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuros (sdFv), fragmentos que comprenden o bien un dominio VL o bien VH, y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. En la técnica se conocen moléculas de scFv y se describen, por
- 25 ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5,892,019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos abarcadas por esta divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de moléculas de
- 30 inmunoglobulina.

Se pretende que el término "polinucleótido" abarque un ácido nucleico en singular así como también ácidos nucleicos en plural, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislado, p. ej., ARN mensajero (ARNm) o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (*p. ej.*, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se pretende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que ha sido retirada de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica una subunidad polipeptídica en un vector se considera aislado como se divulga en el presente documento. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes conservados en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados incluyen además las mencionadas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión a ribosoma, o un terminador de la transcripción.

Tal como se usa en la presente, una "región de codificación" es una parte de ácido nucleico que comprende codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de detención" (TAG, TGA, o TAA) no se traduzca en un aminoácido,

se puede considerar que es parte de una región codificadora, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no son parte de una
5 región codificadora. Dos o más regiones codificantes pueden estar presente en un único constructo de polinucleótido, p. ej., en un único vector, o en constructos de polinucleótidos diferentes, p. ej., en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región
10 codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, p. ej., un único vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido, o ácido
15 nucleico puede codificar regiones de codificación heterólogas, tanto fusionadas como no fusionadas a un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica o proteína de fusión, como se proporciona en el presente documento. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación,
20 elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido puede
25 incluir normalmente un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o la traducción asociados de manera operativa con una o más regiones de codificación. Una asociación o enlace operativo es cuando una región de codificación de un producto génico, por ejemplo, un
30 polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que sitúa la expresión del producto génico

bajo la influencia o el control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como la región de codificación de un polipéptido y un promotor asociado a la anterior) se "asocian operativamente" o se "unen operativamente" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN que se va a transcribir. De esta manera, una región promotora se asociará operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor era capaz de efectuar la transcripción de este ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Se divulgan en el presente documento los promotores adecuados y otras regiones control de la transcripción.

Los expertos en la materia estarán familiarizados con una variedad de regiones control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tal como, pero no de forma limitativa, segmentos promotores y potenciadores procedentes de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus 40 de simio (el promotor temprano), y los retrovirus (tales como el virus

del sarcoma de Rous). Otras regiones control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrados tales como la actina, la proteína de choque térmico, la hormona de crecimiento de bovinos y la β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejidos así como promotores inducibles por linfocinas (*p. ej.*, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

De manera similar, un experto habitual en la materia conoce una variedad de elementos control de la traducción. Estos incluyen, pero no de forma limitativa, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (concretamente, un sitio de entrada a ribosomas interno, o IRES, denominado también secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido puede ser ARN, por ejemplo, en la forma de ARN mensajero (ARNm).

Las regiones que codifican polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden estar asociadas con regiones de codificación adicionales que codifican los péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido, como se divulga en el presente documento, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una subunidad polipeptídica proporcionada en el presente documento. De acuerdo con la hipótesis de la señal, las proteínas secretadas por células de mamíferos tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se ha iniciado la exportación de la cadena de la proteína de

crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso. Un experto habitual en la materia será consciente de que los polipéptidos secretados por células de vertebrados tienen generalmente un péptido de señal fusionado con el extremo N terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, *p. ej.*, una cadena pesada de inmunoglobulina o péptido señal de la cadena ligera, o un derivado funcional de esta secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que se asocia de manera operativa con este. De forma alternativa, se puede usar un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo natural puede sustituirse por la secuencia líder de hemaglutinina de virus influenza A, activación de plasminógeno tisular humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

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

Una célula "transformada", o una célula "huésped", es una célula en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Tal como se usa en la presente, el término transformación abarca todas las técnicas por las cuales se puede introducir una molécula

de ácido nucleico en dicha célula, incluyendo la transfección con vectores víricos, la transformación con vectores plásmidos, y la introducción de ADN puro mediante electroporación, lipofección, y aceleración en cañón de partículas. Una célula transformada o una célula huésped puede ser una célula bacteriana o una célula eucariota.

Por "se une específicamente", quiere decirse generalmente que una molécula, p. ej., un fragmento de unión a receptor o GITRL de la misma, se une a otra molécula, p. ej., GITR, por medio de su dominio de unión a receptor, y que la unión supone algo de complementariedad entre el ligando y su receptor. Según esta definición, se dice que un ligando se "une específicamente" a un receptor cuando se une a este receptor mediante su dominio de unión a receptor más fácilmente de lo que se uniría a una molécula no relacionada aleatoria. El término "especificidad" se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la cual un determinado ligando se une a un determinado receptor. Por ejemplo, puede considerarse que el ligando "A" tiene una especificidad superior por un receptor dado que el ligando "B", o puede decirse que el ligando "A" se une al receptor "C" con una especificidad superior a la que tiene para el receptor relacionado "D".

Por "un dominio de unión a receptor", está previsto un dominio de unión compuesto por un ligando, p. ej., un GITRL tal como se divulga en la presente.

Un ligando, p. ej., una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL fusión multimérica tal como se divulga en la presente puede unirse a un receptor, p. ej., GITR, con una velocidad de disociación ($k(\text{off})$) de menos de o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , 5×10^{-3}

s⁻¹ o 10⁻³ s⁻¹. Un ligando, p. ej., una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL multimérica tal como se divulga en la presente puede unirse a un receptor, p. ej., GITR, con una velocidad de disociación (k(off)) de menos de o igual a 5 X 10⁻⁴ s⁻¹, 10⁻⁴ s⁻¹, 5 X 10⁻⁵ s⁻¹, o 10⁻⁵ s⁻¹, 5 X 10⁻⁶ s⁻¹, 10⁻⁶ s⁻¹, 5 X 10⁻⁷ s⁻¹ o 10⁻⁷ s⁻¹.

Los términos "inhibir", "bloquear" y "suprimir" se usan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier disminución estadísticamente significativa de la actividad biológica, incluyendo el bloqueo total de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % de la actividad biológica.

Tal tal como se usa en la presente, el término "afinidad", se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un ligando a su receptor homólogo. Tal como se usa en la presente, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de ligandos y receptores, es decir, la fuerza de combinación funcional de una combinación de ligandos y receptores, p. ej., interacción de una proteína de fusión de GITRL IgG hexamérica (FP de GITRL) con GITR de la superficie celular. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de los dominios de unión a receptor individuales en la población con receptores específico, como también con las valencias de los ligandos y los receptores.

Un ligando, p. ej., una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL multimérica tal como se divulga en la presente también puede describirse o especificarse en cuanto a su afinidad de unión a un ligando. Por ejemplo, un ligando puede unirse a un receptor

con una constante de disociación o K_D no mayor de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Un ligando, *p. ej.*, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL multimérica tal como se divulga en la presente puede unirse a un receptor, *p. ej.*, GATR, con una velocidad (k_{on}) de más de o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Un ligando, *p. ej.*, a subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL multimérica tal como se divulga en la presente puede unirse a un receptor, *p. ej.*, GATR, con una velocidad (k_{on}) mayor de o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

GATR, o "receptor GATR" es una proteína, también denominada de manera variable proteína relacionada con TNF inducida por glucocorticoides, miembro 18 de la superfamilia del ligando de factor de necrosis tumoral, TNFSF18, receptor relacionado con TNF inducible por activación, AITR, CD357 y RP5-902P8.2, se expresa en la superficie de células NK activadas y células T expuestas a antígeno, *p. ej.*, células T CD4^+ y CD8^+ , así como sobre células T reguladoras $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ (Tregs; Stephens et al. *J. Immunol.* (2004) 173(8): 5008-5020). GATR es, *p. ej.*, la proteína de SEQ ID NO: 47. "Ligando de GATR" ("GITRL"), también denominado de manera variable ligando relacionado con TNF inducido por glucocorticoides, ligando de miembro 18 de la superfamilia de factor de necrosis tumoral, ligando de TNFSF18, TL6,

ligando relacionado con TNF inducible por activación, ligando de AITR, AITRL, y RP1-15D23, se encuentra en gran parte sobre células presentadoras de antígeno (APCs; Stephens et al. *J. Immunol.* (2004) 173(8): 5008-5020). GITRL
5 se expresa en la superficie de células e incluye un dominio intracelular, uno transmembrana y uno de unión a receptor extracelular.

Tal como se usa en la presente, el término "GITRL" se refiere a todo el ligando de GITR, ligando de GITR soluble,
10 y porciones funcionalmente activas del ligando de GITR. También se incluye dentro de la definición de GITRL tanto variantes alélicas que se producen de manera natural de GITRL, variantes de ligando de GITR que varían en secuencia de aminoácidos con respecto a moléculas de ligando de GITR
15 que se producen de manera natural, y combinaciones de tales variantes, en donde las variantes conservan la capacidad para unirse específicamente a un receptor GITR. Determinadas variantes de GITRL que comprenden sustituciones de residuos de aminoácido se identifican en la presente mediante el
20 número de residuo en la proteína GITRL madura de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, N161D se refiere a una sustitución de un residuo de asparagilo en la posición 161 de una GITRL humana madura de SEQ ID NO: 1 con un residuo de aspartilo y también a esa misma sustitución en la posición equivalente en el
25 dominio extracelular de una GITRL humana de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8. En referencia a diversas sustituciones en la secuencia de GITRL de SEQ ID NO: 1, sustituciones equivalentes de los residuos correspondientes en polipéptidos de GITRL distintos del polipéptido de GITRL de
30 SEQ ID NO: 1 también se proporcionan en la presente. Tales residuos correspondientes pueden identificarse fácilmente

alineando la secuencia SEQ ID NO: 1 con la secuencia de GITRL que va a sustituirse. Por ejemplo, un péptido de GITRL que tiene una única adición de aminoácido N-terminal a SEQ ID NO: 1 podría tener una sustitución de un residuo de asparagilo en la posición 162 que sería equivalente a una sustitución de un residuo de asparagilo en la posición 161 de SEQ ID NO: 1.

Tal como se usa en la presente, el término "subunidad polipeptídica de fusión de GITRL" o "subunidad de FP de GITRL" se refiere a una subunidad polipeptídica de una sola cadena que comprende: un dominio de Fc de IgG humano; un dominio de trimerización funcional; y un dominio de unión a receptor de un ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL), en el que la subunidad polipeptídica puede autoensamblarse para dar una proteína multimérica, p. ej. una trimérica o una hexamérica. Los términos "proteína de fusión de GITRL multimérica" o "FP de GITRL multimérica" se refieren a multímeros autoensamblados de una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL incluyendo, p. ej., trímeros y hexámeros. Cuando se usa un dominio de Fc de IgG de un determinado isotipo en una subunidad de FP de GITRL, la FP de GITRL que tiene ese isotipo se describe como "FP de GITRL IgGX", en donde X puede ser 1, 2, 2a, 3, 4 o 4P, p. ej., FP de GITRL IgG1, FP de GITRL IgG2, FP de GITRL IgG2a, FP de GITRL IgG3, FP de GITRL IgG4 y FP de GITRL IgG4P.

Tal como se usa en la presente, "polipéptido de OX40" significa un polipéptido o fragmento del mismo que tiene una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 85% con el n.º de registro de NCBI NP_003318. OX40 es un miembro de la superfamilia de TNFR de receptores que se expresa en

la superficie de linfocitos T CD4+ y CD8+ de mamífero
activados por antígeno. Véanse, por ejemplo, Paterson et
al., Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987); Mallett et al., EMBO
J 9, 1063-1068 (1990); y Calderhead et al., J Immunol 151,
5 5261-5271 (1993)). OX40 también se denomina CD134, ACT-4 y
ACT35. Se conocen en la técnica secuencias de receptor de
OX40 y se proporcionan, por ejemplo, con los números de
registro de GenBank: AAB33944 o CAE11757.

A continuación se proporciona una secuencia de
10 aminoácidos de OX40 humano a modo de ejemplo:

```
      1      mcvgarrlgr gpcaallllg lglstvtglh cvgdtypsnd  
      rcchecrp gn gmvsr csrsq  
      61      ntvcrpcpgp fyndvvs skp ckpctwcnlr sgserkqlct  
      atqdtvcrcr agtqp ldsyk  
15      121      pgvdcapcpp ghfspgd nqa ckpwt nctla gkhtlq pasn  
      ssdaicedrd ppatqp qetq  
      181      gpparpitvq pteawprtsq gpstrpvevp ggravaailg  
      lglvlgllgp laillalyll  
      241      rrdqrlppda hkppgggsfr tpiqeeqada hstlaki (SEQ ID  
20      NO: 52)
```

Por "ligando de OX40" quiere decirse un polipéptido o
fragmento del mismo que tiene una identidad de aminoácidos
de al menos aproximadamente el 85% con el n.º de registro de
NCBI NP_003317 y que se une específicamente al receptor de
25 OX40. Véase, por ejemplo, Baum P.R., *et al. EMBO J. 13*:3992-
4001(1994)). El término OX40L incluye todo el ligando de
OX40, ligando de OX40 soluble, y proteínas de fusión que
comprenden una porción funcionalmente activa de ligando de
OX40 covalentemente unida a un segundo resto, p. ej., un
30 dominio proteico. También se incluyen dentro de la definición
de OX40L variantes que varían en la secuencia de aminoácidos

con respecto a OX4L que se produce de manera natural pero que conservan la capacidad para unirse específicamente al receptor de OX40. Se incluyen además dentro de la definición de OX40L variantes que potencian la actividad biológica de OX40. Se conocen en la técnica secuencias de ligando de OX40 y se proporcionan, por ejemplo, con los números de registro de GenBank: NP_003318.

A continuación se proporciona una secuencia de aminoácidos de ligando de OX40 humano a modo de ejemplo:

10 MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALQVSH
 RYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFFYLISLKG
 FSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDD
 FHVNGGELILIHQNPGEFCVL (SEQ ID NO: 53)

Tal como se usa en la presente, "agonista de OX40" significa un ligando de OX40 que interacciona específicamente con y aumenta la actividad biológica del receptor de OX40. De manera deseable, la actividad biológica aumenta en al menos aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 50%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o incluso el 100%. En determinados aspectos, los agonistas de OX40 divulgados en la presente incluyen polipéptidos de unión a OX40, tales como anticuerpos anti-OX40 (p. ej., anticuerpos agonistas de OX40), ligandos de OX40, o fragmentos o derivados de estas moléculas.

25 Tal como se usa en la presente, "anticuerpo frente a OX40" significa un anticuerpo que se une específicamente a OX40. Los anticuerpos frente a OX40 incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales que son específicos para OX40 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En determinados aspectos, anticuerpos anti-OX40 tal como se describen en la presente son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión

30

a antígeno de los mismos), p. ej., anticuerpos monoclonales murinos, humanizados o completamente humanos. En una realización particular, el anticuerpo frente a OX40 es un agonista del receptor de OX40, tal como el anticuerpo monoclonal de ratón anti-OX40 humano (9B12) descrito por Weinberg et al., J Immunother 29, 575-585 (2006). En otras realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a OX40, o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo de OX40 que el AcM 9B12. En otro aspecto, el anticuerpo es MEDI0562. Véase, por ejemplo, la publicación estadounidense N.º 2016/0137740.

Tal como se usa en la presente, "proteína de fusión de ligando de OX40 (FP de OX40L)" significa una proteína que se une específicamente al receptor de OX40 y aumenta una respuesta inmunitaria. En una realización, la unión de una proteína de fusión de ligando de OX40 al receptor de OX40 potencia una respuesta específica de antígeno tumoral reforzando el reconocimiento por células T. Se describen proteínas de fusión de ligando de OX40 a modo de ejemplo en la patente estadounidense 7,959,925, titulada, "Proteína de fusión de inmunoglobulina frente a OX40 trimérica y métodos de uso". Se describen otras proteínas de fusión de ligando de OX40, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6,312,700. En una realización, una proteína de fusión de ligando de OX40 potencia la inmunidad de células T específicas de tumor. En una realización, la proteína de fusión de ligando de OX40 es MEDI6383 (SEQ ID NO: 50). Véase, por ejemplo, la publicación estadounidense N.º 2016/0024176.

Un "dominio de trimerización" es una secuencia de aminoácidos en un polipéptido que promueve el ensamblaje del polipéptido en trímeros. Por ejemplo, un dominio de

trimerización puede promover el ensamblaje en trímeros por medio asociaciones con otros dominios de trimerización (de polipéptidos adicionales con una secuencia de aminoácidos igual o diferente). El término se utiliza también para referirse a un polinucleótido que codifica dicho péptido o polipéptido.

El término dominio de "Fc" se refiere a una parte de una región constante de un anticuerpo. Tradicionalmente, el término "dominio de Fc" se refiere a un producto de la escisión por acción de una peroxidasa (p. ej., la prolina) que abarca las regiones emparejada CH2, CH3 y las regiones bisagra de un anticuerpo. En el contexto de esta exposición, la expresión "dominio de Fc" o "Fc" se refiere a cualquier polipéptido (o ácido nucleico que codifique dicho polipéptido), independientemente del método de producción, que incluya toda o una porción de las regiones CH2, CH3 y la región de bisagra de un polipéptido inmunoglobulínico.

Tal como se usa en la presente, el término "dominio de Fc de IgG" se refiere a un dominio de Fc de una inmunoglobulina IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y variantes de tales dominios de Fc. Las variantes de un dominio de Fc de IgG4 incluyen, pero no se limitan a, un dominio de Fc de IgG4P.

Tal como se usa en la presente, el término "dominio CH2" incluye la parte del dominio de Fc de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el aminoácido 244 al aminoácido 360 de un anticuerpo que utilizas esquemas de numeración convencionales (aminoácidos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y aminoácidos 231-340, sistema de numeración de la UE). Está también bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio

CH2 al extremo C de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 aminoácidos.

Tal como se usa en la presente, el término "región de ligador" incluye cualquier péptido que se use para fusionar o unir dos dominios proteicos. Tales ligadores incluyen, pero no se limitan a, péptidos que comprenden motivo(s) de (Gly₄)_n, motivo(s) de (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 19) y motivo(s) de Ser(Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 22).

Tal como se usa en la presente, el término "región de bisagra de IgG" incluye la porción del dominio de Fc de una molécula de IgG de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 aminoácidos y es flexible, permitiendo de esta manera que las regiones de unión a antígeno del extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: Dominios bisagra superiores, intermedios, e inferiores (Roux *et al.*, *J. Immunol.* **161**:4083 (1998)).

Tal como se usa en la presente, la expresión "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En determinados aspectos proporcionados en esta memoria, un dominio de Fc de IgG4 humana puede mutarse en la región de bisagra para asegurar la formación del enlace disulfuro entre las dos regiones de bisagra, específicamente, una mutación de serina a prolina en la posición 228 (de acuerdo con la numeración de la UE). Los dominios Fc de IgG4 que comprenden la mutación S228P se denominan en esta memoria "dominios Fc de IgG4P".

Tal como se usa en la presente, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" pueden usarse de manera indistinta. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en fase" se refiere a la unión de dos o más fases abiertas de lectura (ORF) para formar una ORF continua más larga, de tal modo que mantiene la fase de lectura traduccional correcta de las ORF originales. Por tanto, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que no están normalmente así unidos en la naturaleza), p. ej., una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente. Aunque el marco de lectura se prepara de esta manera de forma continua a través de los segmentos fusionados, los segmentos pueden separarse física o especialmente mediante, por ejemplo, una secuencia enlazadora en marco.

En el contexto de los polipéptidos una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección terminal amino a carboxilo en donde los aminoácidos adyacentes entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria activada del polipéptido.

El término "expresión", tal como se usa en la presente, se refiere a un proceso mediante el cual un gen produce un agente bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen en la célula que incluye, sin carácter limitante, el silenciamiento génico así como también tanto la expresión transitoria como la expresión estable. Esto incluye, sin

limitación, la transcripción del gen en el ARN mensajero (ARNm) y la traducción de este ARNm en polipéptidos. Si el producto final deseado es un agente bioquímico, la expresión incluye la creación de ese agente bioquímico y cualquiera de sus precursores. La expresión de un gen produce un "producto génico". Tal como se usa en la presente, un producto génico, puede ser tanto un ácido nucleico, p. ej., un ARN mensajero producido mediante la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en la presente incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, p. ej., poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, p. ej., metilación, glicosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades proteicas, escisión proteolítica, y similares.

Tal como se usa en la presente los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de" cuando se usan en el contexto del tratamiento de cáncer (p. ej., en la frase "tratamiento de un paciente con cáncer") se refiere a reducir el potencial de la patología de la enfermedad, reducir la aparición de síntomas de la enfermedad, p. ej., hasta un punto que el sujeto tenga una tasa de supervivencia más larga o molestias reducidas. Por ejemplo, tratar puede referirse a la capacidad de un tratamiento cuando se administra a un sujeto, para reducir los síntomas, signos, o las causas de la enfermedad. Tratar también se refiere a la mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico y/o la inhibición o el retraso en la progresión de la dolencia y/o la prevención o el retraso de la aparición de una enfermedad o afección.

Tal como se usa en la presente los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de" cuando se usan en el contexto del tratamiento de una infección viral (p. ej., en la frase "tratamiento de una infección viral") se refiere a
5 reducir los estados patológicos y/o los síntomas asociados con la infección viral.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, al cual se desea aplicar
10 una diagnosis, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales de compañía, animales de granja, animales de competición y animales de zoológicos, incluyendo, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos,
15 ganado, osos y así sucesivamente.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma como para permitir que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contenga componentes adicionales que sean
20 inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administrará la composición. Dicha composición puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpos como se describe en el presente documento es una cantidad suficiente para
25 llevar a cabo un fin establecido específicamente. Puede determinarse una "cantidad eficaz" empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el fin establecido.

Subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL

La presente divulgación se refiere a una subunidad
30 polipeptídica de fusión de GITRL que puede ensamblarse para dar una proteína multimérica, p. ej., trimérica o hexamérica

con propiedades mejoradas que incluyen, pero no se limitan a, rendimiento mejorado cuando se expresa en cultivos celulares de mamífero transfectados; afinidad de unión mejorada por GITR; actividad mejorada en diversos ensayos biológicos y/u homogeneidad mejorada cuando se purifican o se purifican parcialmente en comparación con los polipéptidos divulgados anteriormente que contienen GITRL (Véase, p. ej., Wyzgol *et al.*, *J Immunol* 2009; 183:1851-1861). Las subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL proporcionadas en la presente pueden comprender un dominio de Fc de IgG, p. ej., un dominio de Fc de IgG humano, un dominio de trimerización y el dominio de unión a receptor de GITRL humano. En la figura 7 se ilustra esquemáticamente una realización a modo de ejemplo. Normalmente, el dominio de Fc de IgG, el dominio de trimerización y el dominio de unión a receptor de GITRL se disponen en una dirección de N-terminal a C-terminal. Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL IgG1 a modo de ejemplo se representa por SEQ ID NO: 6.

En determinadas realizaciones, el dominio de unión a receptor de GITRL es un dominio extracelular de un GITRL humano. La secuencia de un dominio de este tipo se representa por SEQ ID NO: 37.

En determinados aspectos, el dominio de unión a receptor de GITRL es un dominio extracelular variante de GITRL. Los dominios extracelulares variantes de GITRL que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 37. En determinados aspectos, el dominio extracelular variante de GITRL es un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos

el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 34. En determinados aspectos, el residuo de dominio extracelular variante de GITRL correspondiente a 161 de SEQ ID NO: 1 se sustituye por cualquier aminoácido o por un residuo de aspartilo. Los dominios extracelulares variantes de GITRL en donde el residuo correspondiente a asparagilo 161 de SEQ ID NO: 1 se sustituye por cualquier aminoácido o por un residuo de aspartilo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99%, a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 35, SEQ ID N°: 36, y SEQ ID NO: 37. Tales sustituciones pueden reducir o eliminar la glicosilación unida a N de este sitio en el dominio extracelular variante de GITRL. En determinados aspectos, el residuo de dominio extracelular variante de GITRL correspondiente a 106 de SEQ ID NO: 1 se sustituye por un residuo de alanilo. En determinados contextos, las sustituciones N106A de hGITRL pueden dar como resultado un aumento de la unión a GITR y una respuesta de proliferación de células T mejorada (Chattopadhyay et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 104(49):19452-19457). En determinados aspectos, residuos de dominio extracelular variante de GITRL correspondientes a Glu 52, Phe 62, Pro 66, Pro 67, Met 71, Pro 77, Val 79, Asn 92, Ser 83, Gly 99, Asn 104, Pro 112, Arg 116, Met 123, Asn 153, Val 158, Asn 161, Iso 167, Iso 168, y combinaciones de los mismos se sustituyen independientemente por un residuo de aminoácido que se produce de manera no natural o un residuo de aminoácido de una variante alélica. Un ejemplo no limitativo de un dominio extracelular variante de GITRL se

proporciona en SEQ ID NO: 35, en donde X₁= Glu o Ala, X₂= Ser o Phe, X₃=Thr o Pro, X₄=Leu o Ser, X₅=Thr o Met, X₆= Leu o Pro, X₇= Met o Val, X₈= Thr, Phe, o Ser, X₉= Ser o Gly, X₁₀= Arg o Pro, X₁₁= Trp o Arg, X₁₂= Leu o Met, X₁₃= Ser o Asn, X₁₄=Phe o Val, X₁₅=cualquier aminoácido distinto de Asn o Asp, X₁₆= Val o Ile, X₁₇=Leu o Ile, y en donde X₁-X₁₇ se seleccionan independientemente y pueden estar presentes en cualquier combinación.

Cualquier secuencia del polipéptido de GITRL que retenga la propiedad deseada de unión al receptor de GITR es adecuada en el polipéptido de fusión y los métodos descritos en el presente documento.

Adyacente al dominio de unión al receptor de GITRL está un dominio de trimerización. El término "adyacente" incluye, por ejemplo, contiguo con, o asociado por medio de una región de ligador o agente heterólogo. Tales dominios, cuando son contiguos entre sí, son dominios que están fusionados directamente entre sí. El dominio de trimerización sirve para promover el autoensamblaje de subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL individuales para dar una proteína trimérica o para dar una proteína hexamérica. En determinadas realizaciones, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL con un dominio de trimerización se autoensambla para dar una proteína de fusión de GITRL hexamérica. En una realización, el dominio de trimerización es un dominio de superhélice, p. ej., un dominio de cremallera de leucina. Un dominio de cremallera de leucina trimérico a modo de ejemplo es la variante GCN4 pII de levadura modificada por ingeniería genética descrita por Harbury *et al.* (1993) Science 262:1401-1407, cuya divulgación se incorpora en la presente para todos los fines.

Los dominios de trimerización a modo de ejemplo incluyen: Factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) (n.º de registro del GENBANK® Q12933 [gi:23503103]; aminoácidos 310-349); tromboespondina 1 (n.º de registro P07996 [gi:135717]; aminoácidos 291-314); matrilina-4 (n.º de registro O95460 [gi:14548117]; aminoácidos 594-618; proteína de matriz de cartílago (matrilina-1) (n.º de registro NP002370 [gi:4505111]; aminoácidos 463-496; factor de transcripción de choque térmico (HSF) (n.º de registro AAX42211 [gi:61362386]; aminoácidos 165-191; y cubilina (n.º de registro NP001072 [gi:4557503]; aminoácidos 104-138.

En determinados aspectos, el dominio de trimerización comprende un dominio de hélice alfa superenrollada. Los dominios de hélice alfa superenrollada incluyen, pero no se limitan a los derivados de matrilina 1, coronina 1a, cinasa de distrofia miotónica (DMPK), langerina, y combinaciones de los mismos. Tales derivados incluyen, pero no se limitan a, dominios de superhélice con secuencias de tipo natural así como variantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácido en la secuencia de tipo natural de dominio de superhélice. Las proteínas coronina 1a que contienen dominios de trimerización de coronina 1a también se denominan algunas veces como cualquiera de proteína A de tipo coronina, clipina-A, proteína p57 de tipo coronina, proteína de recubrimiento que contiene triptófano-aspartato y el nombre de HUGO CORO1A. Los ejemplos no limitativos de dominios de superhélice de tipo natural derivados de diversas proteínas que pueden usarse incluyen matrilina 1 (SEQ ID NO: 28), DMPK (SEQ ID NO: 30), langerina (SEQ ID NO: 32), y coronina 1a (SEQ ID NO: 11). Las variantes de los dominios de hélice alfa superenrollada pueden incluir variantes alélicas,

variantes modificadas por ingeniería genética, y combinaciones de las mismas. Los dominios de hélice alfa superenrollada se organizan normalmente en repeticiones de secuencia de héptada "hpphcpc" (o abcdefg) que pueden

5 sustituirse independientemente en una o más de las posiciones "h" (posiciones "a" y/o "d") en una o más de las repeticiones por residuos de alanina, leucina, isoleucina o valina. En tales repeticiones de héptada de "hpphcpc", h representa

10 residuos hidrófobos, c representa, normalmente, residuos cargados, y p representa residuos polares (y, por tanto, hidrófilos). Se proporcionan variantes de dominios de hélice alfa superenrollada de matrilina 1, coronina 1a, cinasa de distrofia miotónica (DMPK) y langerina en donde una o más de las posiciones "a" y/o "d" en una o más de las repeticiones

15 de héptada de esos dominios de trimerización se sustituyen por residuos de alanina, leucina, isoleucina o valina. Los ejemplos no limitativos de variantes de dominios de hélice alfa superenrollada que pueden usarse incluyen matrilina 1 (SEQ ID NO: 29), DMPK (SEQ ID NO: 31), langerina (SEQ ID NO:

20 32), y coronina 1a (SEQ ID NO: 12-18). En determinados aspectos, un dominio de trimerización de matrilina 1 variante usado en la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL puede incluir, pero no se limita a, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%,

25 el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 29. En determinados aspectos, un dominio de trimerización de DMPK variante usado en la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL puede incluir, pero no se limita a, un polipéptido que tiene una

30 identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a lo largo

de toda la longitud de SEQ ID NO: 31. En determinados aspectos, un dominio de trimerización de langerina variante usado en la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL puede incluir, pero no se limita a, un polipéptido que tiene una
5 identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 33. En determinados aspectos, un dominio de trimerización de coronina 1a usado en la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL puede
10 incluir, pero no se limita a, un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% a lo largo de toda la longitud de SEQ ID NO: 11. En determinados aspectos, se proporciona una secuencia consenso variante de
15 dominio de trimerización de coronina 1a en donde una o más de las posiciones "A" y/o "D" en una o más de las repeticiones de héptada de esos dominios de trimerización se sustituyen por residuos de alanina, leucina, isoleucina o valina que pueden usarse en las subunidades polipeptídicas de fusión de
20 GITRL como SEQ ID NO: 10. En la Tabla A se presentan secuencias variantes y de tn de coronina 1a a modo de ejemplo que pueden usarse en una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL.

**Tabla A Dominios de superhélice de coronina 1a y
25 variantes de los mismos**

	Dominio de trimerización	Secuencia	SEQ ID NO:	ProCoil Puntuación de predicción	Estado oligomérico predicho
5					
10		hpphcpc-hpphcpc-hpphcpc-hpphcpc-hpph; en donde h representa residuos hidrófobos, c representa, normalmente, residuos cargados, y p representa residuos polares (y, por tanto, hidrófilos). Las	NA		
15	Repetición de secuencia de	posiciones de la repetición de héptada también pueden indicarse mediante las letras			
20	héptada	minúsculas <i>abcdefg</i> .			
25	hCor1a consenso (X= Ala, Leu, Ile, o Val)	XSRXEEEXRKXQATXQELQKRXRLE ETVQAK	10		
	hCor1a tn	VSRLEEEEMRKLQATVQELQKRXRLE ETVQAK	11	0.10154 4216	TRÍM ERO
30	hCor1a variante 1	VSRLEEEIIRKLQATVQELQKRRLDRLE ETVQAK	12	0.20591 9088	TRÍM ERO

	Dominio de trimerización	Secuencia	SEQ ID NO:	ProCoil Puntuación de predicción	Estado oligomérico predicho
5					
10	hCor1a variante 2	VSRIEEEIRKLQATVQELQKRLDRLE ETVQAK	13	0.38636 3142	TRÍM ERO
	hCor1a variante 3	ISRIEEEIRKLQATVQELQKRLDRLE ETVQAK	14	0.43163 1235	TRÍM ERO
15	hCor1a variante 4	ISRIEEEIRKIQATVQELQKRLDRLE ETVQAK	15	0.50902 1117	TRÍM ERO
	hCor1a variante 5	ISRIEEEIRKIQATVQELQKRIDRLE ETVQAK	16	0.66808 0151	TRÍM ERO
20	hCor1a variante 6	ISRIEEEIRKINATVQELQKRIDRLE ETVQAK	17	0.78546 3418	TRÍM ERO
25	hCor1a variante 7	ISRIEEEIRKINATIQELQKRIDRLE ETVQAK	18	0.72942 1966	TRÍM ERO

Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL que tiene determinados dominios de trimerización proporcionados en la presente (p. ej. un dominio de trimerización de coronina 1a o variante del mismo) puede presentar propiedades mejoradas en comparación con otras subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL que tienen dominios de trimerización

distintos. Más específicamente, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL que tiene un dominio de trimerización de coronina 1a o variante del mismo puede presentar propiedades mejoradas que incluyen, pero no se limitan a, rendimiento mejorado cuando se expresan en cultivos celulares de mamífero transformados; p. ej. células CHO; afinidad de unión mejorada por GITR; actividad mejorada en diversos ensayos biológicos (p. ej. activación de la ruta de señalización de NF- κ B); y/u homogeneidad mejorada cuando se purifican o purifican parcialmente. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que tales propiedades mejoradas de una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL que tiene un dominio de trimerización de coronina 1a o variante del mismo puede facilitar la fabricación de subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL y/o mejorar la eficacia de proteínas de fusión de GITRL multiméricas en diversas aplicaciones terapéuticas.

Además del dominio de unión a receptor de GITRL y el dominio de trimerización, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente incluye un dominio de inmunoglobulina, tal como una región constante o dominio de "Fc". En determinados aspectos la presente divulgación proporciona un dominio de Fc de tanto IgG1 como IgG4 humano que incluye al menos la región de bisagra. En determinados aspectos el dominio de Fc de IgG1 o IgG4 humano incluye además el dominio CH2. En determinados aspectos el dominio de Fc de IgG1 o IgG4 humano incluye además el dominio CH3. En determinados aspectos, el dominio de Fc es un dominio de Fc de IgG1 humano o variante del mismo. Un dominio de Fc de IgG humano puede comprender un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 80%, el 85%,

el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con SEQ ID NO: 21. Las variantes de un dominio de Fc de IgG (p. ej. un dominio de Fc de IgG1) que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, el dominio de Fc de IgG que contiene
5 uno o más residuos de aminoácido independientemente seleccionados del grupo que consiste en 252Y, 254T, 256E, y combinaciones de los mismos, en los que los residuos se numeran según la numeración de la UE. En determinados aspectos la región de bisagra una región de Fc de IgG4 puede
10 comprender una mutación de serina a prolina en la posición 228 (según la numeración de la UE) que confiere formación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas completos. En determinados aspectos la región de bisagra de IgG4 comprende los aminoácidos 1 a 12 de SEQ ID NO: 40. En determinados
15 aspectos el dominio de Fc de IgG4 humano es un dominio de Fc de IgG4P con la mutación S228P de SEQ ID NO: 38.

En combinación con el dominio de trimerización que junta tres dominios de unión a receptor de GITRL, la formación de enlaces disulfuro entre dos dominios de Fc de IgG da como
20 resultado la formación de una proteína hexamérica (figura 7). Por tanto, el dominio de inmunoglobulina sirve como dominio de dimerización que promueve el ensamblaje entre dos proteínas de fusión de GITRL triméricas en un hexámero estable (que es un multímero que contiene seis subunidades
25 polipeptídicas de fusión de GITRL) por medio de interacciones entre dominios de inmunoglobulina desapareados. En determinados aspectos, un dominio de Fc de IgG4 humano proporciona estabilidad a la proteína hexamérica sin promover funciones efectoras tales como citotoxicidad
30 celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad celular dependiente del complemento. En otros aspectos, un

dominio de Fc de IgG1 humano proporciona estabilidad a la proteína hexamérica al tiempo que promueve funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad celular dependiente del
5 complemento.

En determinados aspectos, esta divulgación proporciona una subunidad polipeptídica de una sola cadena que se autoensambla para formar una proteína hexamérica que puede unirse específicamente a GITR. Una subunidad polipeptídica
10 a modo de ejemplo comprende un dominio de Fc de IgG humano, un dominio de trimerización funcional y un dominio de unión a receptor de GITRL. En aspectos específicos la subunidad polipeptídica puede autoensamblarse en una proteína hexamérica. En determinados aspectos, la subunidad
15 polipeptídica está dispuesta, desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal, tal como sigue: el dominio de Fc de IgG humano, seguido por el dominio de trimerización, seguido por el dominio de unión a receptor de GITRL. Los tres dominios pueden ser inmediatamente
20 adyacentes. Por ejemplo, en determinados aspectos el extremo carboxilo terminal del dominio de Fc de IgG humano se fusiona directamente al extremo amino terminal del dominio de trimerización, y el extremo carboxilo terminal del dominio de trimerización se fusiona directamente al extremo amino
25 terminal del dominio de unión a receptor de GITRL. Alternativamente, dos o tres dominios pueden estar separados por uno o más ligadores, espaciadores u otros polipéptidos heterólogos. Los ligadores útiles incluyen, pero no se limitan a, un motivo de (Gly₄)_n, un motivo de (Gly₄Ser)_n (SEQ
30 ID NO: 19), motivo de Ser(Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGSAL (SEQ ID NO: 23), o GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ

ID NO: 24), y combinaciones de los mismos, en donde n es un número entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En determinados aspectos, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente puede unirse específicamente a GITR humano. En determinados aspectos, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente puede unirse específicamente a un GITR de primate no humano, p. ej., GITR de mono cynomolgus o GITR de mono rhesus. En determinados aspectos, una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente no se une a GITR de ratón o a GITR de rata.

Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se proporciona en la presente puede contener uno o más cambios de aminoácidos conservativos, p. ej., hasta diez cambios conservativos (p. ej., dos aminoácidos sustituidos, tres aminoácidos sustituidos, cuatro aminoácidos sustituidos o cinco aminoácidos sustituidos, etc.), siempre que los cambios puedan hacerse en el polipéptido sin cambiar la función bioquímica de la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o FP de GITRL multimérica.

Por ejemplo, pueden hacerse uno o más cambios conservativos en un dominio de unión a receptor de GITRL sin cambiar su capacidad para unirse a GITR. De forma similar, se pueden realizar uno o más cambios conservadores en el dominio de trimerización sin alterar su capacidad de trimerizar.

Las subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL proporcionadas en la presente también pueden contener una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácido

que bloquean o reducen la glicosilación unida a N del residuo de asparagilo 161 de GITRL. En determinados aspectos, el residuo de asparagilo 161 de GITRL se sustituye por cualquier aminoácido distinto de un residuo de asparagilo para bloquear o reducir la glicosilación. En determinados aspectos, el residuo de asparagilo 161 de GITRL se sustituye por un residuo de aspartilo, p. ej., es una variante N161D de GITRL tal como se muestra en SEQ ID NO: 4. En determinados aspectos, la glicosilación unida a N del residuo de asparagilo 161 de GITRL se bloquea o se reduce mediante sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácido que alteran la secuencia del sitio de glicosilación unida a N NNT de los residuos de GITRL 161-163 de manera que esta secuencia ya no se adapta a la secuencia de sitio de glicosilación unida a N canónica NX(T, S o C). En determinadas realizaciones, la sustitución del residuo de treonilo 163 por un residuo de aminoácido distinto de serinilo o cisteinilo puede usarse para bloquear o reducir la glicosilación unida a N del residuo de asparagilo 161 de GITRL, siempre que los cambios puedan hacerse en el polipéptido sin cambiar la función bioquímica de la subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o proteína de fusión de GITRL multimérica.

De forma adicional, se puede eliminar parte de un dominio del polipéptido sin afectar negativamente o eliminar todas sus funciones. De forma similar, se pueden realizar inserciones o adiciones en la cadena polipeptídica, por ejemplo, añadiendo etiquetas de epítopos, sin afectar negativamente o eliminar sus funciones, como se describe a continuación. Otras modificaciones que se pueden realizar si, deteriorar materialmente una o más funciones de un

polipéptido incluyen, por ejemplo, modificaciones químicas y bioquímicas *in vivo* o *in vitro* que incorporan aminoácidos inusuales. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, glicosilación, marcado, p. ej., con radionucleidos, y diversas modificaciones enzimáticas, como apreciarán fácilmente las personas normalmente expertas en la técnica. Una variedad de métodos para marcar polipéptidos, y marcadores útiles para tales fines, se conocen bien en la técnica, e incluyen isótopos radioactivos tales como ^{32}P , fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y antiligandos.

La subunidad polipeptídica de fusión puede incluir además un agente heterólogo, por ejemplo, un agente estabilizante, un modificador de la respuesta inmunitaria, o un agente detectable. En determinados aspectos, el agente heterólogo comprende una o más secuencias polipeptídicas adicionales fusionadas con la subunidad polipeptídica mediante un enlace peptídico, tal como una secuencia señal (p. ej., una secuencia señal secretora), una secuencia de ligador, una etiqueta o marcador de aminoácido, o una secuencia peptídica o polipeptídica que facilita la purificación. En determinados aspectos, el polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N-terminal del dominio de Fc de IgG, el polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo C-terminal del dominio de unión a receptor de GITRL, el polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo C-terminal del dominio de Fc de IgG y al extremo N-terminal del dominio de trimerización, o el polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo C-terminal del dominio de trimerización y al extremo N-terminal del dominio de unión a receptor de GITRL. Alternativamente

el polipéptido heterólogo puede fusionarse internamente dentro de cualquiera del dominio de Fc de IgG, el dominio de trimerización o el dominio de unión a receptor de GITRL, siempre que se mantengan las características funcionales de los dominios.

En determinados aspectos, el agente heterólogo puede conjugarse químicamente a la subunidad polipeptídica. Los agentes heterólogos ilustrativos que se pueden conjugar con la subunidad polipeptídica incluyen, sin limitación, ligadores, fármacos, toxinas, agentes de diagnóstico por imágenes, compuestos radioactivo, polímeros orgánicos e inorgánicos, y cualquier otra composición que pueda proporcionar una actividad deseada que no está proporcionada por la propia subunidad polipeptídica. Los agentes específicos incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), un agente citotóxico, un radionucleido, un agente de diagnóstico por imágenes, biotina.

En determinados aspectos, las subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL así como cualquier trímero o proteína hexamérica que comprenda esas subunidades pueden usarse como controles, patrones de referencia para desarrollar o ejecutar ensayos de diagnóstico (p. ej. para determinaciones de dosificación), o herramientas de investigación. Por ejemplo, la divulgación proporciona una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se describió anteriormente, en donde el dominio de unión a receptor de GITRL comprende cualquiera de SEQ ID NO: 34, 35, 36 ó 37. En determinados aspectos, el control, patrón de referencia o herramienta puede comprender una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el

95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99.5% o el 100% con SEQ ID NO: 6. En otro ejemplo, la divulgación proporciona subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL que pueden formar una proteína multimérica tal como se describió anteriormente, pero en donde el dominio de unión a receptor de GITRL es un dominio de unión a receptor de GITRL de ratón o rata, y el dominio de Fc es un dominio de Fc de origen humano o murino, y el dominio de multimerización es, p. ej., un dominio de trimerización, p. ej., dominio de trimerización de coronina 1a. Esta proteína de fusión puede usarse para realizar experimentos *in vivo* en roedores. Sin querer limitarse a la teoría, las funciones efectoras de dominio de Fc de IgG conferidas por distintos isotipos de IgG en ratones difieren generalmente de las conferidas por el mismo isotipo de IgG en seres humanos. Sin embargo, se ha mostrado anteriormente que isotipos de IgG de ratón específicos se consideran análogos o comparables a isotipos de IgG alternativos en el ser humano, por ejemplo IgG2a de ratón se considera análogo a IgG1 humano e IgG1 de ratón se considera comparable a IgG4 humano. Como tales, los resultados obtenidos en ratones con un isotipo de dominio de Fc de IgG de ratón dado pueden usarse para predecir los resultados obtenidos en seres humanos con isotipos de IgG humano análogos o comparables.

25 Proteínas de fusión de GITRL multiméricas

Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL tal como se describió anteriormente puede autoensamblarse para dar una FP de GITRL hexamérica. De acuerdo con ello, la divulgación proporciona una proteína hexamérica que incluye seis subunidades polipeptídicas como se ha descrito anteriormente. Una subunidad polipeptídica a modo de ejemplo

descrita en los ejemplos se autoensambla en una proteína hexamérica designada en la presente como "FP de GITRL hexamérica." Un ejemplo no limitativo de una secuencia de aminoácidos de una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL que se autoensambla para dar una FP de GITRL hexamérica se proporciona en SEQ ID NO: 6. No obstante, un experto habitual en la técnica reconocerá en vista de la presente divulgación que otras numerosas secuencias también satisfacen los criterios expuestos en la presente para FP de GITRL hexaméricas. FP de GITRL hexaméricas que comprenden seis subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL con una identidad de secuencia de al menos el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99.5% o el 100% con SEQ ID NO: 6 también se proporcionan en la presente.

En determinados aspectos, determinadas subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL proporcionadas en la presente también se autoensamblan para dar una FP de GITRL trimérica que comprende tres subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL. Esto podría producirse, por ejemplo, cuando se usa un dominio de Fc que no puede dimerizarse en una FP de GITRL para generar una proteína trimérica. Los ejemplos de dominios de Fc que no pueden dimerizarse y son por tanto adecuados para la producción de FP de GITRL trimérica incluyen, pero no se limitan a, moléculas de Fc de IgG1 monoméricas (Ying et al. J Biol Chem. 1 de junio de 2012; 287(23): 19399-19408) y moléculas de IgG4 monovalentes (Wilkinson, et al. MAbs. 1 de mayo de 2013; 5(3): 406-417).

Una proteína de fusión de GITRL multimérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse específicamente a GITR tal como se

expresa en células T expuestas a antígeno primarias, p. ej., células T expuestas a antígeno primarias, de ser humano, mono cynomolgus, mono rhesus o cualquier combinación de las mismas.

5 Una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse específicamente a GITR recombinante. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse
10 a GITR humano recombinante con una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 120 nM, p. ej., de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM, p. ej., de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 100 nM, p. ej., de aproximadamente 60 nM a aproximadamente 100 nM, tal como se
15 mide mediante un ensayo de exclusión cinética. Por ejemplo, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse a GITR humano recombinante con una afinidad de unión de aproximadamente 0.1 nM, aproximadamente 0.5 nM,
20 aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM,
25 aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 60 nM, aproximadamente 70 nM, aproximadamente 80 nM, aproximadamente 90 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 120 nM, aproximadamente 250 nM o aproximadamente 500 nM, todas
30 medidas mediante un ensayo de exclusión cinética. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se

proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse a GITR humano recombinante con una afinidad de unión de cualquiera de aproximadamente 0.1 nM, aproximadamente 0.5 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 60 nM, o de aproximadamente 70 nM a cualquiera de aproximadamente 90 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 120 nM, aproximadamente 250 nM, o aproximadamente 500 nM, todas medidas mediante un ensayo de exclusión cinética. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una FP de GITRL hexamérica, puede unirse a GITR humano recombinante con una afinidad de unión de aproximadamente 82 nM tal como se mide mediante un ensayo de exclusión cinética. La afinidad de unión puede medirse por numerosos métodos y/o instrumentos diferentes, y las afinidades de unión relativas pueden variar dependiendo del método o instrumento, como entienden bien las personas normalmente expertas en la técnica.

En otro ejemplo, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede unirse a GITR de mono cynomolgus expresado en células T de mono cynomolgus expuestas a antígeno primarias, por ejemplo células T CD4⁺ o CD8⁺.

En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede inducir proliferación dependiente de la dosis de

células T CD3⁺ expuestas a antígeno en un ensayo basado en placa. Por ejemplo, en un ensayo *in vitro* usando una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., GITRL, puede lograrse una respuesta de proliferación máxima del 20% (CE₂₀) en células T CD3⁺ humanas expuestas a antígeno primarias a una concentración de proteína hexamérica de aproximadamente 0.03 nM a aproximadamente 0.2 nM, p. ej., aproximadamente 0.16 nM, puede lograrse una respuesta de proliferación máxima del 50% (CE₅₀) en células T CD3⁺ humanas expuestas a antígeno primarias a una concentración de proteína hexamérica de aproximadamente 0.2 nM a aproximadamente 1 nM, p. ej., aproximadamente 0.4 nM, y puede lograrse una respuesta de proliferación máxima del 90% (CE₉₀) en células T CD3⁺ humanas expuestas a antígeno primarias a una concentración de proteína hexamérica de aproximadamente 0.7 nM a aproximadamente 5 nM, p. ej., aproximadamente 1.8 nM, todas tal como se mide mediante incorporación de timidina.

En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., proteína de fusión de GITRL IgG, puede inducir liberación de citocinas dependiente de la dosis a partir de T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD3⁺ expuestas a antígeno primarias humanas. En determinados aspectos, la citocina liberada es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , o cualquier combinación de las mismas. En determinados aspectos, la citocina es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, o cualquier combinación de las mismas. De manera similar, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede potenciar la proliferación de células T y la liberación de citocinas en células T de mono cynomolgus

expuestas a antígeno primarias y en células T de mono rhesus expuestas a antígeno primarias.

En aspectos adicionales, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede
5 activar la ruta de NFκB en células T que expresan GATR. Por ejemplo, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede activar la ruta de NFκB en células indicadoras de NFκB-luciferasa Jurkat que expresan GATR que producen luciferasa en respuesta a la
10 estimulación de la ruta de señalización de NFκB, con una CE₅₀ de aproximadamente 20 pM a aproximadamente 300 pM, p. ej., aproximadamente 182 pM para FP de GITRL IgG1 hexamérica, y 289 pM para FP de GITRL IgG4 hexamérica. Alternativamente, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la
15 presente, p. ej., FP de GITRL puede activar la ruta de NFκB en células que expresan GATR humano, GATR de mono cynomolgus o GATR de mono rhesus.

En aún otro aspecto una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede
20 facilitar el tratamiento del cáncer, p. ej., ralentizando el crecimiento tumoral, deteniendo el crecimiento tumoral o reduciendo el tamaño de los tumores existentes, cuando se administran como una dosis eficaz a un sujeto que necesita tratamiento del cáncer. En determinados aspectos, la
25 facilitación del tratamiento del cáncer puede conseguirse en presencia de células T. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, cuando se administra como una dosis eficaz a un sujeto que necesita tratamiento, puede reducir
30 el crecimiento tumoral en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos

el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 100% en comparación con la administración de una molécula de control de isotipo coincidente.

5 En aún otro aspecto una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede facilitar el tratamiento de infecciones virales, p. ej., ralentizando la multiplicación viral, deteniendo la multiplicación viral o reduciendo la reaparición de la
10 infección o frecuencia de reaparición de la infección, cuando se administra como una dosis eficaz a un sujeto que necesita el tratamiento, p. ej. Un sujeto infectado con el virus. Tales sujetos pueden tener una infección viral o bien crónica o bien latente. En determinados aspectos, los tratamientos
15 son de sujetos que tienen infecciones virales latentes y reducen la reaparición de la infección o frecuencia de reaparición de la infección en comparación con sujetos tratados con un placebo. En determinados aspectos la facilitación del tratamiento de la infección viral puede
20 lograrse en presencia de células T. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, cuando se administra como una dosis eficaz a un sujeto que necesita tratamiento, puede reducir la carga viral en al menos el 10%, al menos el 20%,
25 al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 100% en comparación con la administración de una molécula de control de isotipo coincidente. En determinados aspectos, una
30 proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, cuando se administra como una dosis

eficaz a un sujeto que necesita tratamiento, puede reducir la reaparición de la infección viral en al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, o al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 100% en comparación con la administración de una molécula de control de isotipo coincidente.

En aún aspectos adicionales, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una proteína de fusión de GITRL IgG4, puede inducir proliferación de células T expuestas a antígeno, que expresan GITR a través de la unión a GITR, pero no desencadena sustancialmente citotoxicidad dependiente del complemento o dependiente de anticuerpos contra las células T expuestas a antígeno. Además en determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., una proteína de fusión de GITRL IgG1 multimérica, puede inducir proliferación de células T expuestas a antígeno, que expresan GITR a través de la unión a GITR, pero se une a C1q y desencadena citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por receptor de Fc o fagocitosis de células T CD4⁺ expuestas a antígeno, en particular células T reguladoras FOXP3⁺ CD4⁺.

Polinucleótidos que codifica para subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL IgG

La divulgación proporciona además un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL. Una secuencia de polinucleótido a modo de ejemplo que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL se representa por SEQ ID NO: 5. En determinados aspectos,

secuencias de ácido nucleico que codifican el dominio de Fc de IgG, el dominio de trimerización y los dominios de unión a receptor de GITRL se unen en una orientación de 5' a 3', p. ej., se unen de manera contigua en una orientación de 5' a 3'. En otros aspectos, el polinucleótido proporcionado puede comprender además una secuencia señal que codifica, por ejemplo, un péptido señal secretor o una secuencia de localización de membrana. Esta divulgación proporciona polinucleótidos que codifican todas y cada una de las subunidades polipeptídicas de fusión de GITRL o multiméricas, p. ej., proteínas hexaméricas que comprenden las subunidades.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL. En determinados aspectos, la secuencia de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 5.

Los polinucleótidos que codifican una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL incluyen secuencias de desoxirribonucleótidos (ADN, ADNc) o de ribodesoxinucleótidos (ARN), o formas modificadas de cualquier nucleótido, que codifican los polipéptidos de fusión descritos en la presente. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias del ADN y/o el ARN.

Se proporcionan también polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que comprenden uno o un número pequeño de deleciones, adiciones y/o sustituciones. Dichos cambios pueden ser contiguos o se pueden distribuir en diferentes posiciones en el ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica puede, por ejemplo,

tener 1, o 2, o 3, o 4 o incluso más deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. En determinados aspectos, las una o más deleciones, adiciones y/o sustituciones no alteran el marco de lectura codificado por la secuencia del polinucleótido, de tal manera que se produce un polipéptido modificado ("mutante") pero sustancialmente idéntico tras la expresión del ácido nucleico.

La similitud entre las secuencias de aminoácidos (y/o el ácido nucleico) se expresa en términos de similitud entre las secuencias, denominada de otra manera identidad de la secuencia. La identidad de la secuencia se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud), cuánto mayor sea el porcentaje, más similares son las estructuras primarias activadas de las dos secuencias. "Porcentaje (%) de identidad", se define en el presente documento como el porcentaje de restos aminoacídicos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos aminoacídicos en una secuencia seleccionada, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de la secuencia, y sin tener en cuenta cualesquiera sustituciones conservadoras de aminoácidos como parte de la identidad secuencial.

Por tanto, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede ser al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos el 96%, frecuentemente al

menos el 97%, el 98% o el 99% idénticas a SEQ ID NO: 5 o al menos una secuencia del anterior. La alineación a fines de determinar el porcentaje de homología (es decir, la similitud de la secuencia) o el porcentaje de identidad se puede conseguir de diversas manera que están comprendidas en los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, utilizando algoritmos disponibles públicamente o patentados. Por ejemplo, se puede determinar la similitud de la secuencia utilizando métodos de alineación emparejados, por ejemplo, BLAST, BLAST-2, ALIGN, o ALIGN-2 o métodos de alineación de múltiples secuencias tales como el software Megalign (DNASTAR), ClustalW o T-Coffee. Los expertos en la materia pueden determinar las funciones de puntuación adecuadas, por ejemplo, las penalizaciones por hueco, o las matrices de puntuación para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una calidad de alineación óptima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Además, se puede conseguir la alineación de secuencias utilizando métodos de alineación estructurales (por ejemplo, métodos que utilizan información de estructuras secundarias o terciarias para alinear dos o más secuencias), o métodos híbridos que combinan información de secuencias, estructural, y filogenética para identificar y alinear de manera óptima las secuencias de la proteína candidata

La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas del NCBI (BLAST) (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. (1990) 215:403) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD.) y en internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn,

blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de la secuencia usando este programa está disponible del sitio web de la NCBI en internet.

De esta manera, una secuencia de ácido nucleico que es
5 sustancialmente idéntica, o sustancialmente similar a la SEQ ID NO: 5 está abarcada en la presente divulgación. Una secuencia es sustancialmente idéntica a la SEQ ID NO: 5 si la secuencia es idéntica, sobre una base nucleótido a nucleótido, con al menos una subsecuencia de la secuencia de
10 referencia (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4). Dichos ácido nucleicos pueden incluir, por ejemplo, inserciones, deleciones, y sustituciones relativas a la SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, dichos ácidos nucleicos pueden ser al menos aproximadamente un 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o
15 incluso 99% idénticos a una referencia de ácido nucleico, o codifica un polipéptido al menos aproximadamente un 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso 99% idéntico a la secuencia del polipéptido de referencia, por ejemplo, la SEQ ID NO: 4.

20 Adicionalmente, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, también puede incluir secuencias de polinucleótido, tales como secuencias
25 reguladoras de la expresión y/o secuencias de vector que facilitan la expresión o replicación de los ácidos nucleicos. De manera similar, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona
30 en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede incluir secuencias codificantes adicionales que confieren atributos funcionales

al polipéptido codificado. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias de señal secretora y señales de localización en la membrana. Un ejemplo no limitativo de un ácido nucleico que codifica un péptido señal que está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL se proporciona en SEQ ID NO: 7.

Un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede introducirse en un vector, tal como un vector de expresión eucariota, por técnicas convencionales. De acuerdo con ellos, la divulgación proporciona un vector que comprende un polinucleótido como se proporciona en el presente documento. Un vector de expresión está diseñado para permitir la transcripción de la secuencia de polinucleótido que codifica una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL en células proporcionando secuencias reguladoras que inician y potencian la transcripción del ADNc y garantizan su corte y empalme y poliadenilación apropiados. Los expertos en la técnica conocen numerosos vectores de expresión, y están disponibles comercialmente, o se pueden ensamblar a partir de componentes individuales de acuerdo con los procedimientos de biología molecular.

La elección de la secuencia de control de la expresión y el vector de expresión dependerá de la elección de la célula huésped. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para huéspedes eucariotas

incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para huéspedes bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo PCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de gama de hospedadores más amplia, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Las células huésped adecuadas para la expresión de una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL incluyen células procariotas, de levadura, de insecto o eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Puede encontrarse información adicional referente a métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, p. ej., en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0187954, patentes estadounidenses n.ºs 6,413,746 y 6,660,501, y publicación de patente internacional n.º WO 2004/009823, cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

Se proporciona también una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector como se proporciona en el presente documento. Se pueden emplear de forma ventajosa sistemas de cultivo de células de mamífero o células de insectos para expresar las subunidades polipeptídicas o las proteínas

hexaméricas proporcionadas en el presente documento. Puede realizarse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero porque tales proteínas se pliegan generalmente de manera correcta, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares incluyendo, por ejemplo, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), NSO, HeLa y líneas celulares BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que va a expresarse, y otras secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3', y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de corte y empalme donadores y aceptores, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow & Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

La expresión y purificación de proteínas, tales como una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, pueden realizarse usando técnicas de laboratorio convencionales. Se discuten o se hace referencia a los ejemplos de dichos métodos en el presente documento. Tras la expresión, las proteínas purificadas tienen muchos usos, incluyendo por ejemplo análisis funcionales, producción de anticuerpo, y diagnósticos, así como los usos profilácticos y terapéuticos descritos a continuación. Por ejemplo, las

subunidades polipeptídicas o las proteínas hexaméricas proporcionadas en el presente documento pueden utilizarse para producir composiciones farmacéuticas, incluyendo composiciones de vacunas adecuadas para la administración
5 profiláctica y/o terapéutica.

Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL producida por un huésped transformado, puede purificarse según cualquier método adecuado. Dichos
10 métodos normalizados incluyen cromatografía (p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de
15 proteínas. Pueden unirse etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento gripal y glutatión-S-transferasa, a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad adecuada. También pueden
20 caracterizarse físicamente proteínas aisladas usando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, pueden concentrarse en primer lugar sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante
25 en medios de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon® o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se
30 puede emplear también una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos

dietilaminoetilo (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, p. ej., gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes y otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una molécula de unión al virus de la gripe B/Yamagata. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

Una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL, o una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL producida en un cultivo bacteriano, puede aislarse, por ejemplo, mediante extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguido por una o más etapas de concentración, precipitación con sales, cromatografía de exclusión molecular o intercambio iónico acuosa. Puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Se puede alterar la integridad física de las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante mediante cualquier método conveniente, incluidos ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica de la integridad física o el uso de agentes de lisado celular.

Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Métodos de preparación y administración de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL tal como se proporciona en la presente, a un
5 sujeto que lo necesita, p. ej., para potenciar una respuesta inmunitaria en un paciente con cáncer, p. ej., para inhibir o reducir el crecimiento tumoral, o un paciente que tiene una infección viral, p. ej., para reducir la carga viral o para reducir la reaparición de una infección viral, los
10 conocen bien o pueden determinarlos fácilmente los expertos en la técnica. La vía de administración de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, mediante inhalación o tópica. El término parenteral tal como
15 se usa en la presente incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contempla claramente que todas estas formas de administración son formas adecuadas, otro ejemplo de una forma para la administración
20 sería una disolución para inyección, en particular para el goteo o la inyección intraarterial o intravenosa. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada puede comprender, sin limitación, un tampón (p. ej. tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej. polisorbato), un
25 agente estabilizante (p. ej. albúmina humana), etc. En otros métodos compatibles con las enseñanzas en la presente, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL tal como se proporciona en la presente puede administrarse directamente al sitio de la población
30 celular adversa aumentando de ese modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Determinadas composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden administrarse por vía oral en una forma farmacéutica aceptable incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas.

5 Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse también mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para
10 potenciar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL que puede combinarse con materiales portadores para producir una única
15 forma de dosificación variará dependiendo del sujeto tratado y el modo de administración particular. La composición pueden administrarse como una única dosis, múltiples dosis o a lo largo de un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para
20 proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

Por "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" está previsto una cantidad de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej.,
25 FP de GITRL, que cuando se administra ocasiona una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad o estado que va a tratarse.

Kits

Esta divulgación proporciona además kits que comprenden
30 una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL descrita en la presente y que

pueden usarse para realizar los métodos descritos en la presente. En determinadas realizaciones, un kit comprende al menos una proteína hexamérica purificada tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, en uno o
5 más recipientes. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que la proteína hexamérica divulgada tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que se conocen bien en la técnica.

10 Inmunoensayos

Una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL puede someterse a ensayo para detectar unión específica y/o selectiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden
15 usarse incluyen pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), ensayo de centro fluorescente (FFA) ensayo de microneutralización, ensayo de
20 inhibición de la hemaglutinación HAI), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos,
25 inmunoensayos fluorescentes, por nombrar unos pocos. Tales ensayos son de rutina y se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., Ausubel *et al.*, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) vol. 1, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad).
30 FFA, el ensayo de microneutralización, y HAI, se discutirán en detalle en los Ejemplos siguientes.

Se conocen en la técnica métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de una proteína hexamérica como se proporciona en el presente documento y/o están comercialmente disponibles. Están
5 disponibles comercialmente equipo y software diseñados para tales ensayos cinéticos (p. ej., BIAcore®, BIAevaluation® software, GE Healthcare; KINEXA® Software, Sapidyne Instruments).

Métodos de inmunopotenciación y tratamiento

10 La potenciación de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto (p. ej., un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano) acoplado GITR en células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno durante o tras la activación con antígeno puede lograrse
15 usando una amplia variedad de métodos. El método de elección dependerá principalmente del tipo de antígeno frente al cual se desea potenciar la respuesta inmunitaria, y se discuten a continuación diversos métodos disponibles. Cualquiera que sea el método seleccionado, una proteína hexamérica tal como
20 se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede administrarse a un sujeto, p. ej., un paciente humano de manera que se presenta a células T del sujeto durante o poco después de la sensibilización de las células T mediante antígeno. Se presentan métodos a modo de ejemplo de
25 activación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, p. ej., un sujeto humano usando una proteína hexamérica de OX40, en la publicación estadounidense n.º 2016/0024176, que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad, y puede adaptarse para su uso con las FP de GITRL
30 proporcionadas en la presente.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona un método para promover la supervivencia o proliferación de células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno, que comprende poner en contacto las
5 células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno, con una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, en condiciones en las que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de las células T, p.
10 ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una dosis eficaz de la proteína hexamérica a un sujeto que necesita el
15 tratamiento. En determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse al mismo tiempo que la activación de las células T, p.ej., la activación con antígeno, en determinados aspectos, la puesta en contacto puede producirse tras la activación de las células T.

20 En aspectos adicionales, la divulgación proporciona un método de potenciación de la liberación de citocinas a partir de células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno, que comprende poner en contacto las células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o
25 CD8⁺ expuestas a antígeno, con una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, en el que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de las células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno.
30 En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*,

por ejemplo, mediante la administración de una dosis eficaz de la proteína hexamérica a un sujeto que necesita el tratamiento. En determinados aspectos la puesta en contacto puede producirse al mismo tiempo que la activación de células T, p. ej., activación con antígeno, en determinados aspectos la puesta en contacto puede producirse tras la activación de células T. En determinados aspectos la citocina puede ser IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-2, IL-4, IL-13, IL-8, IL-12 p70, IL-1 β , GM-CSF, o cualquier combinación de los mismos. En determinados aspectos la citocina es IFN γ , TNF α , IL-5, IL-10, IL-4, IL-13, GM-CSF, o cualquier combinación de los mismos.

En determinados aspectos, las células T expuestas a antígeno, p. ej., células T CD4⁺ o CD8⁺ expuestas a antígeno son células T CD4⁺ o CD8⁺ humanas, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono cynomolgus, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

La divulgación proporciona además un método de promoción de la activación de células T, que comprende poner en contacto células T con una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., proteína de fusión de GITRL, en el que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de las células T. En determinados aspectos, la puesta en contacto se produce en presencia del antígeno, p. ej., un antígeno tumoral. En determinados aspectos el método comprende además reticular la proteína de fusión de GITRL hexamérica a través de la interacción del dominio de Fc de IgG de la FP de GITRL con una célula que expresa Fc γ R, p. ej., una célula B, monocito, macrófago, célula mieloide o plamacitoide, célula dendrítica folicular, célula de Langerhans, célula endotelial, célula

NK, neutrófilo, eosinófilo, plaqueta, mastocito, una célula CD45⁺ de un tumor humano primario o ganglio linfático drenante o no drenante del tumor, una célula CD45⁺ de otras estructuras linfoides secundarias o terciarias, o una combinación de los mismos. En determinados aspectos, la activación de células T puede medirse como estimulación de la ruta de transducción de señales de NFκB. En determinados aspectos, la FP de GITRL que promueve la activación de células T es una FP de GITRL IgG1, una FP de GITRL IgG4, o variante de las mismas. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vitro*. En determinados aspectos, la puesta en contacto es *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una dosis eficaz de la proteína hexamérica a un sujeto que necesita el tratamiento.

También se proporcionan en la presente métodos para tratar cáncer, que comprende la administración de FP de GITRL, y un agonista de OX40 (p. ej., una proteína de fusión de ligando de OX40 o anticuerpo agonista de OX40). La administración de FP de GITRL y proteína de fusión de ligando de OX40 dio como resultado una reducción del volumen tumoral y un aumento de la supervivencia en un modelo de tumor de ratón. En determinados aspectos, a un paciente que presenta un tumor sólido se le administra FP de GITRL y una proteína de fusión de ligando de OX40 (p. ej., MEDI6383).

El tratamiento eficaz con una terapia contra el cáncer que incluye FP de GITRL y agonista de OX40 incluye, por ejemplo, reducir la velocidad de progresión del cáncer, el retardo o la estabilización del crecimiento tumoral o metastásico, el encogimiento del tumor, y/o regresión del tumor, o bien en el sitio de un tumor primario, o bien en una o más metástasis. En algunos aspectos la reducción o el

retardo del crecimiento tumoral puede ser estadísticamente significativo. Puede medirse una reducción en el crecimiento tumoral mediante comparación con el crecimiento inicial del tumor del paciente, frente a un crecimiento tumoral esperado, 5 contra un crecimiento tumoral esperado basándose en una gran población de pacientes o frente al crecimiento tumoral de una población de control. En otras realizaciones, los métodos de la invención aumentan la supervivencia.

La respuesta clínica a la administración de una terapia 10 contra el cáncer que incluye FP de GITRL y agonista de OX40 puede evaluarse usando técnicas de diagnóstico conocidas por los médicos, incluyendo sin carácter limitante exploración de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), obtención de imágenes radiográficas por rayos x, exploración 15 tomográfica computarizada (CT), análisis de clasificador celular activado por fluorescencia o (FACS) o citometría de flujo, histología, patología macroscópica y química sanguínea, incluyendo sin carácter limitante cambios detectables por ELISA, RIA y cromatografía.

La divulgación proporciona además métodos de tratamiento 20 de cáncer o infecciones virales en un sujeto, que comprenden administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad eficaz de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, o una composición o 25 formulación que comprende la proteína hexamérica. En determinados aspectos, el cáncer es un tumor sólido. De acuerdo con este método, la administración de la proteína o composición hexamérica puede inhibir el crecimiento del tumor, puede promover la reducción del tumor, o ambos. En 30 determinados aspectos, la inhibición del crecimiento del tumor se consigue en presencia de células T.

Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen pero no se limitan a, carcinoma incluyendo adenocarcinomas, linfomas, blastomas, melanomas, sarcomas y leucemias. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama mediado hormonalmente, véase, p. ej., Innes *et al.* (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065), cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer esofágico, cánceres hematológicos incluyendo, sin carácter limitante, leucemia mieloide aguda (AML) y mieloma múltiple (MM), diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello incluyendo, sin carácter limitante, cánceres de células escamosas, y cánceres de orígenes mucinosos, tales como, cáncer de ovarios mucinoso, colangiocarcinoma (hígado) y carcinoma papilar renal. En determinadas realizaciones, el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica y leucemia mielógena crónica.

Algunas realizaciones se refieren a un método de prevención o tratamiento de un cáncer o una infección viral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, una
5 composición o formulación que comprende la proteína hexamérica, o un polinucleótido, un vector, o una célula huésped tal como se describe en la presente.

También se proporcionan métodos de tratamiento de infecciones virales en sujetos que lo necesitan que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la proteína hexamérica o una composición que comprende la proteína hexamérica. En determinadas realizaciones, la infección viral puede ser una infección viral crónica o
15 latente. Tales infecciones virales crónicas son infecciones virales caracterizadas por semanas, meses, o años de infección viral en donde se produce multiplicación de viriones. Tales infecciones virales latentes son infecciones virales caracterizadas por un periodo en donde los viriones
20 no se multiplican. Los sujetos que lo necesitan pueden identificarse en determinadas realizaciones realizando un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia del virus en el sujeto o en una muestra obtenida del sujeto. En determinadas realizaciones, el tratamiento puede
25 proporcionar una disminución en la carga viral, una disminución en la reactivación viral, una mejora de síntomas asociados con dicha infección, o la combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, la disminución en la carga viral, reactivación o síntomas es en comparación con
30 un sujeto de control tratado con un placebo. En determinadas realizaciones de cualquiera de los métodos mencionados

anteriormente, la infección viral es mediante un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, sarampión, virus de Epstein-Barr
5 (VEB), citomegalovirus (CMV), adenovirus (AdV), virus del papiloma humano (VPH), virus del herpes simple (VHS), virus de la varicela zóster (VVZ), y combinaciones de los mismos.

Las composiciones de la descripción pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, p. ej., por vía
10 parenteral, intraventricular, oral, mediante inhalación de un pulverizador, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" tal como se usa en la presente incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular,
15 intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

La divulgación proporciona además un método de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que
20 comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, o una composición o formulación que comprende la proteína hexamérica.

25 El sujeto que va a tratarse puede ser cualquier animal, p. ej., mamífero, que necesita tratamiento, en determinados aspectos, el sujeto es un sujeto humano.

En su forma más sencilla, una preparación que va a administrarse a un sujeto es una proteína hexamérica tal
30 como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, administrada en forma de dosificación convencional, y

preferiblemente combinada con un excipiente, portador o diluyente farmacéutico tal como se describe en otra parte en la presente.

Una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede administrarse mediante cualquier método adecuado tal como se describe en otra parte en la presente, p. ej., por medio de infusión i.v. En determinados aspectos, una proteína hexamérica tal como se proporciona en la presente, p. ej., FP de GITRL, puede introducirse en un tumor, o en las proximidades de una célula tumoral.

Todos los tipos de tumores son especialmente adecuados al tratamiento mediante esta disolución incluyendo, sin limitación, carcinoma de mama, pulmón, páncreas, ovario, riñón, colon y vejiga, así como melanomas, sarcomas y linfomas.

Agentes de sensibilización de células T

También se proporcionan métodos de tratamiento de cáncer en sujetos que lo necesitan que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de la proteína hexamérica o una composición que comprende la proteína hexamérica en combinación con un agente de sensibilización de células T. En determinados aspectos, el agente de sensibilización de células T es una vacuna de ADN más un adyuvante. En aspectos específicos, esta combinación es, p. ej., péptido largo sintético (SLP) E7 y oligodesoxinucleótido de CpG. En aspectos adicionales, el agente de sensibilización de células T es un modificador epigenético, p. ej., 5-aza-2'-desoxicitidina o modificadores de histonas tales como inhibidores de HDAC. En aspectos adicionales, el agente de

sensibilización de células T es un virus, p. ej., virus vaccinia, de listeria o de la enfermedad de Newcastle.

Esta descripción emplea, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis *et al.* patente estadounidense n.º 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., Methods In Enzymology, vols. 154 y 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, Londres); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989)

Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, MD.).

Los principios generales de modificación por ingeniería de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2^a ed.; Oxford Univ. Press). Press). Los principios generales de modificación por ingeniería de proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2^a ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Adicionalmente, se siguen generalmente métodos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8^a ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman y Co., NY). Freeman and Co., NY).

Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Ámsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) Kuby

Immunology (4^a ed.; H. Freemond & Co.); Roitt *et al.* (2001)
Immunology (6^a ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005)
Cellular and Molecular Immunology (5^a ed.; Elsevier Health
Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody
5 Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow
y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring
Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold
10 Spring Harbor Press).

Todas las referencias citadas anteriormente, así como
todas las referencias citadas en la presente, se incorporan
por referencia a la presente en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de
15 ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

20

25

30

Tabla B: Lista de abreviaturas y definiciones de términos

Abreviatura o término	Definición
A	Alanina
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
°C	Grados Celsius
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CR	Respuesta completa
Cyno	cynomolgus
F	Fenilalanina
FACS	Clasificación celular activada por fluorescencia
FBS	Suero bovino fetal
EM de CL-QTOF	Espectrometría de masas de cromatografía de líquidos acoplada con tiempo de vuelo de cuadrupolo
M	Molaridad
AcM	Anticuerpo monoclonal
hGITRL	GITRL humano
µg	microgramos
IFM	Intensidad de fluorescencia media
min	Minutos
ml	Mililitro
FP de mGITRL multimérica	Una proteína de fusión de ligando de GITR de ratón-IgG de ratón multimérica

5	NIP228	Un anticuerpo monoclonal humano contra ácido 4-hidroxí-3-yodo-5-nitrofenilacético
	NK	Linfocito citolítico natural
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	pM	Picomolar
	RBD	Dominio de unión al receptor
10	Rh	Recombinante humano
	ROA	Ruta de administración
	rpm	Revoluciones por minuto
	TA	Temperatura ambiente
	SC	Subcutáneo
15	SD	Desviación estándar
	TCR	Receptor de células T
	TGI	Inhibición del crecimiento tumoral
	TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
20	Treg	Linfocito T regulador
	V	volumen

EJEMPLO 1: Creación por ingeniería genética de una proteína de fusión de GITRL-Fc de IgG

Identificación de un motivo de trimerización humano adecuado que podría utilizarse para generar una molécula de GITRL-FP humana multimérica

Los esfuerzos por generar una FP de GITRL hexamérica humana se habían centrado originalmente en el uso del motivo de trimerización GCN4 pII para estabilizar el trímero de GITRL y formar una proteína hexamérica. Sin embargo, este

motivo se deriva de una proteína de levadura y la administración de FP de GITRL que contiene un motivo no humano a seres humanos puede dar como resultado inmunogenicidad. Por tanto, se consideró deseable generar una FP de GITRL equivalente que contenía un motivo de trimerización derivado de una proteína humana. Se identificaron secuencias de aminoácidos de 51 proteínas que forman motivos de superhélice triméricos, tal como se demuestra por su estructura cristalina tridimensional las de ortólogos, por medio del Protein Data Bank (PDB; accesible a través de internet por medio del sitio web "wwpdb.org") y se seleccionaron un subconjunto de 4 motivos de superhélice para su incorporación en moléculas de FP de GITRL para pruebas experimentales empíricas.

Métodos

Las estructuras cristalinas tridimensionales de los motivos de superhélice de coronina-1A (código de PDB: 2akf), matrilina 1 (1aq5), langerina (3kqg) y cinasa de distrofia miotónica DMPK (código de PDB: 1wt6) se analizaron usando el software PyMol Visualisation Graphics.

Resultados

Tras una búsqueda en Protein Data Bank (PDB) de secuencias de proteínas de superhélice triméricas que identificó 51 secuencias candidatas, se seleccionaron cuatro secuencias para su uso en la generación de FP de GITRL multiméricas (tabla 1-1). Estas cuatro secuencias eran secuencias de superhélice de las proteínas humanas coronina 1a, matrilina 1, langerina y DMPK. La estructura del motivo de superhélice de coronina 1a de ratón (código de PDB: 2akf) se notifica que es un trímero estable en disolución (Kammerer, R.A. et al. PNAS, vol: 102, p13891-13896 (2005)).

La secuencia de superhélice de coronina 1a humana muestra una alta identidad de secuencia con la proteína de ratón (identidad de secuencia del 78.1%) de modo que se predijo que esta secuencia forma una estructura de superhélice trimérica. De manera similar, la estructura del motivo de superhélice de matrilina 1 de pollo (código de PDB: 1aq5) se notifica que es un trímero (Dames, S. A. et al. NAT. STRUCT. BIOL. 5:687-691 (1998); código de PDB: 1aq5). Se predijo que la secuencia de superhélice de matrilina 1 humana formaba una estructura de superhélice trimérica basándose en su alta identidad de secuencia (identidad de secuencia del 60.0%) con el ortólogo de pollo. Las secuencias de superhélice de langerina humana (código de PDB: 3kqg) y DMPK humana (código de PDB: 1wt6) también se notifica que son triméricas (Feinberg, H. et al., J. BIOL. CHEM. 285:13285-13293 (2010)) y se seleccionaron para su uso en la generación de proteínas de fusión de GITRL humanas.

Para proporcionar secuencias de superhélice adicionales para su uso en las proteínas de fusión de GITRL, se produjeron variantes de las secuencias de superhélice de tipo natural de coronina-1A, matrilina-1, langerina y DMPK humanas. Para generar estas secuencias variantes, se usó la implementación en línea del algoritmo ProCoil (accesible a través de internet por medio del sitio web "bioinf.jku.at/software/procoil/"). Este algoritmo predice las probabilidades de que secuencias dadas formen estructuras de superhélice diméricas y triméricas. Se predijo que varias variantes de las secuencias de superhélice de tipo natural mencionadas anteriormente tenían puntuaciones de probabilidad superiores para formar trímeros en comparación con las secuencias de tipo natural. La

secuencia variante con la probabilidad más alta de ser un trimero se seleccionó para su uso en la generación de FP de GITRL hexamérica.

Las secuencias de superhélice variantes elegidas para las cuatro proteínas humanas anteriores se muestran en la **Tabla 1-1**.

Tabla 1-1: Secuencias para su uso como motivos de superhélice triméricos en constructos de FP de GITRL

10	Motivo de trimerización	Secuencia y SEQ ID NO
	GCN4 pII	IKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL (SEQ ID NO: 27)
	Matrilina 1 tn	CACESLVKFQAKVEGLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV (SEQ ID NO: 28)
15	Matrilina 1 variante	CACESLVKFQAKVEGLIQALTRKLEAVSKRIAILENTVV (SEQ ID NO: 29)
	Coronina 1a tn	VSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK (SEQ ID NO: 11)
20	Coronina 1a variante	ISRIEEEIRKINATVQELQKRIDRLEETVQAK (SEQ ID NO: 17)
	DMPK tn	EAEAEVTLRELQEALEEEVLTRQSLSREMEAIRTDNQNFASQ LREAEARNRDLEAHVRQLQERMELLQAE (SEQ ID NO: 30)
25	DMPK variante	IAEIEVTIRELQEAIEEEVLTRQSLSREIEAIRTDIQNIASQ LREIEARIRDLEAHVRQLQERMELLQAE (SEQ ID NO: 31)
	Langerina tn	ASALNTKIRALQGSLENMSKLLKRQNDILQVVS (SEQ ID NO: 32)

30 Análisis *in silico* para clasificar los motivos de trimerización

Se realizaron predicciones *in silico* de motivos que generarían trímeros de GITRL más estables, y por tanto una FP de GITRL multimérica más estable, analizando las secuencias de la tabla 1-1 con el algoritmo (LOGICOIL) para predecir su estado oligomérico. Además, se compararon las puntuaciones obtenidas para la formación de un trímero paralelo con las de superhélices identificadas a partir del proteoma humano completo por medio de la combinación de dos algoritmos (MARCOIL y LOGICOIL).

10 Métodos

Se realizó la predicción en todo el genoma en el proteoma humano descargado del sitio ftp "ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/H_sapiens/mRNA_Prot/human.protein.faa.gz." Esta versión incluye un número total de 71861 secuencias de proteína. Se exploraron estas secuencias y se identificaron los motivos de superhélice ejecutando el software MARCOIL, descargado del sitio web "bcf.isb-sib.ch/Delorenzi/Marcoil/Marcoilcode.tar.gz". Todos los motivos que pasaban determinados umbrales específicos (es decir, 0.01, 0.10, 0.50, 0.90 y 0.99) se analizaron adicionalmente usando el algoritmo LOGICOIL, descargado de internet por medio del sitio web "coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL/LOGICOIL_Source.zip", para predecir el estado de oligomerización (dímero, trímero o tetramero paralelo o antiparalelo) de secuencias de superhélice. Se implementó este paquete en el lenguaje R (versión 3.0.2 - 25-09-2013). Se desarrolló una secuencia de comandos perl ad-hoc para convertir las salidas de MARCOIL en el formato de archivo esperado por LOGICOIL. Se representaron gráficamente los histogramas en R usando el paquete lattice (versión 0.20-23).

Resultados

Se predijeron motivos de superhélice en todas las secuencias humanas de Refseq (usando MARCOIL). El número de motivos de superhélice predichos por el algoritmo MARCOIL para diferentes umbrales se muestra en la **Tabla 1-2**. Entonces se predijeron los estados oligoméricos de todos los motivos a partir del umbral de 0.99, usando LOGICOIL, junto con los ocho dominios de superhélice triméricos seleccionados en la tabla 1-2.

La distribución de estas puntuaciones y la clasificación de los motivos usados en este estudio se muestran en la **Tabla 1-3**.

Tabla 1-2: El número de motivos de superhélice predichos por el algoritmo MARCOIL para diferentes umbrales

Umbral	Número de motivos
0.01	168583
0.10	68793
0.50	41762
0.90	34714
0.99	27240

Tabla 1-3: Clasificación de los ocho motivos de superhélice en el contexto del proteoma completo, incluyendo puntuaciones de LOGICOIL TRIM

CLASIFICACIÓN DEL PROTEOMA	CLASIFICACIÓN DE SUBCONJUNTOS	SECUENCIA	LOGICOIL TRIM
20	1	GCN4 pII	2.43
201	2	hDMPK-mutante	1.74
219	3	Langerina h-tn	1.71

	CLASIFICACIÓN DEL PROTEOMA	CLASIFICACIÓN DE SUBCONJUNTOS	SECUENCIA	LOGICOIL TRIM
	241	4	Langerina h-variante	1.68
5	427	5	hCorla-tn	1.58
	1065	6	hCorla- mutante	1.44
	3620	7	hDMPK-tn	1.18
10	12473	8	Matrilina h-variante	0.96
	18993	9	Matrilina h-tn	0.81

Generación de variantes de FP de GITRL que contienen diferentes motivos de trimerización humanos

Las secuencias para cada uno de los motivos de trimerización seleccionados, además de la secuencia de GCN4 pII, se clonaron en una configuración apropiada, en vectores de ADN que codificaban para los otros elementos de las FP de GITRL, es decir, entre un dominio de Fc humano y el dominio extracelular de GITRL humano, separados por secuencias de ligador de aminoácido flexibles cortas. Se usaron estos vectores para transfectar de manera transitoria células de mamífero, permitiendo la secreción y posterior purificación de las proteínas de FP de GITRL hexaméricas recombinantes.

Método

Se transfectaron de manera transitoria células CHO en suspensión, usando PEI, con vectores de ADN que codificaban para las diferentes FP de GITRL hexaméricas y se hicieron crecer durante ocho días a 37 °C, agitando a 140 rpm con una humedad del 80%. Se separaron de las células y los residuos celulares cuarenta mililitros de los medios condicionados

que contenían las proteínas secretadas mediante centrifugación a 1,600 x g y filtración. Se purificaron las proteínas usando resina de AcM SelectSure™ y se analizó su tamaño e integridad mediante SDS-PAGE reductora.

5 Posteriormente se adoptó expresión a mayor escala y un protocolo de purificación de dos etapas para FP de GITRL hexamérica (coronina 1a tn) y FP de GITRL hexamérica (matrilina 1 tn). En este caso, se sometió un volumen mayor de CHO condicionado (400 ml) a cromatografía de proteína G
10 seguido por una etapa de cromatografía de exclusión molecular (S200 16/60). Se usaron estas proteínas purificadas para análisis de SEC-MALLS.

Resultados

15 Todas las proteínas de FP de GITRL hexaméricas recombinantes se expresaban a niveles similares, pero la FP de GITRL hexamérica que contiene el motivo de coronina 1a tn parecía proporcionar un rendimiento superior a las otras proteínas (**Tabla 1-4:**, figura 1).

20 **Tabla 1-4: Rendimientos de proteína a partir de expresión transitoria en células CHO para las ocho proteínas de FP de GITRL**

FP de GITRL	Concentración (mg/ml)
Matrilina 1 tn	0.51
Matrilina 1 variante	0.57
Coronina 1a tn	0.9
Coronina 1a variante	0.63
DMPK tn	0.66
DMPK variante	0.34

Langerina tn	0.37
Langerina variante	0.48

5 Caracterización de variantes de FP de GITRL que contienen diferentes motivos de trimerización humanos

Unión de variantes de FP de GITRL a células que expresan GITR

10 Con el fin de determinar si las moléculas de FP de GITRL hexaméricas podrían unirse a GITR expresado en la superficie celular, se incubaron con células que sobreexpresaban GITR y se detectó su unión por medio de su dominio de Fc.

Método

15 Se añadieron una concentración fija de un tampón de anticuerpo anti-IgG humana conjugado con Dylight-649, seguido por una dilución de 2 veces de las proteínas de FP de GITRL hexaméricas purificadas descritas anteriormente en la sección 1.3 y un anticuerpo de control de isotipo (NIP228) en pocillos por duplicado a una placa de fondo claro con paredes negras de 384 pocillos. Se añadieron células CHO que expresaban de manera estable GITR a todos los pocillos y se incubó la placa a temperatura ambiente durante cuatro horas. Se determinó la unión a las células CHO-GITR usando el citómetro de placas Mirrorball™ con un láser de 640 nm y se midió la fluorescencia.

25 Resultados

Los resultados se presentan en las figuras 2A-D. El perfil de unión obtenido demuestra un "efecto de gancho" que se observa cuando la concentración de la FP de GITRL hexamérica excede la concentración del anticuerpo de 30 detección conjugado con Dylight-649, dando como resultado que se detecte menos unión a las concentraciones superiores de FP de GITRL hexamérica; por tanto se produce un perfil de

unión con forma de campana. A pesar de este fenómeno, las diferentes moléculas de FP de GITRL hexaméricas producen un perfil de unión muy similar.

Competición de GITRL. Competición de variantes de FP de
5 GITRL con ligando trimérico recombinante por la unión a GITR

Se determinó el efecto de las moléculas de FP de GITRL hexaméricas sobre la unión de GITRL humano a GITR humano usando un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF).

10 Método

Se titularon las moléculas de FP de GITRL hexaméricas en un ensayo de HTRF en el que se midió la unión de GITRL-HA (etiqueta de hemaglutinina) a GITR-Fc. Se conjugó el Fc de GITR humano con criptato de europio y se usó un anticuerpo
15 anti-HA conjugado con XL665 para detectar la proteína GITRL-HA. Se determinaron los valores de CI_{50} mediante ajuste de curva de los datos analizados a una ecuación logística de cuatro parámetros con el software Prism 5.01 (GraphPad).

Resultados

20 Los resultados se presentan en las figuras 3A-D y **Tabla 1-5**. Las moléculas de FP de GITRL hexaméricas con los diferentes motivos de trimerización son todas potentes inhibidores de la unión de GITRL-HA trimérica a GITR-Fc. La mayoría de las variantes de FP de GITRL producían perfiles
25 de inhibición y valores de CI_{50} similares con la excepción de FP de GITRL (langerina tn) que demostró una potencia 8 menor que FP de GITRL (GCN4). FP de GITRL (coronina 1a) tenía el valor de CI_{50} más bajo a 0.61 nM.

**Tabla 1-5: Valores de CI_{50} (nM) para proteínas de FP de
30 GITRL que compiten por la unión de GITRL trimérico a GITR-Fc**

	Muestra de prueba	CI₅₀ (nM)
	FP de GITRL (GCN4 pII)	1.06
	FP de GITRL (matrilina 1 tn)	1.36
5	FP de GITRL (matrilina 1 variante)	0.83
	FP de GITRL (coronina 1a tn)	0.61
	FP de GITRL (coronina 1a variante)	1.44
	FP de GITRL (DMPK tn)	2.73
10	FP de GITRL (DMPK variante)	2.43
	FP de GITRL (langerina tn)	8.05
	FP de GITRL (langerina variante)	2.0
15	NIP228 IgG-TM	Sin inhibición

Actividad de variantes de FP de GITRL en un ensayo de indicador

La actividad funcional de las diferentes moléculas de FP de GITRL (FP de GITRL IgG1 hexamérica (SEQ ID NO: 6) y FP de GITRL IgG4 hexamérica (SEQ ID NO: 40) se determinó en un ensayo usando células indicadoras de NFκB-luciferasa que expresaban de manera estable GTR. Se midió la luminiscencia, dirigida por el agonismo de GTR y la posterior activación de la ruta de NFκB.

25 Método

Se diluyeron en serie proteínas de FP de GITRL 4 veces para una curva de seis puntos de datos y se añadieron por triplicado a placas de 96 pocillos. Entonces se añadieron células indicadoras de NF-κB luciferasa Jurkat transfectadas con GTR humano a todos los pocillos de las placas de ensayo y se incubaron a 37 °C durante tres horas. Se detectó la

expresión de luciferasa añadiendo reactivo Steady-Glo a todos los pocillos de las placas de ensayo. Se incubaron las placas durante cinco minutos a temperatura ambiente y luego se midió la luminiscencia y se generaron valores de CE_{50} usando ajuste de curva no lineal de pendiente variable de respuesta frente a logarítmica (agonista) en GraphPad Prism 5.01 (GraphPad).

Resultados

Los resultados se presentan en las figuras 4A-D y la **Tabla 1-6**. Todas las proteínas de FP de GITRL hexaméricas desencadenan señalización de NF- κ B. Las proteínas generaron perfiles de potencia y valores de CE_{50} similares a FP de GITRL (GCN4).

Tabla 1-6: Valores de CE_{50} (nM) para variantes de FP de GITRL usando una línea celular indicadora de gen de luciferasa-NF- κ B transfectada con GITR humana

Muestra de prueba	CE_{50} (nM)
FP de GITRL (GCN4 pII)	1.02
FP de GITRL (matrilina 1 tn)	1.12
FP de GITRL (matrilina 1 variante)	0.90
FP de GITRL (coronina 1a tn)	0.95
FP de GITRL (coronina 1a variante)	0.74
FP de GITRL (DMPK tn)	1.37
FP de GITRL (DMPK variante)	1.39
FP de GITRL (langerina tn)	1.54
FP de GITRL (langerina variante)	0.75

Temperatura de fusión de variantes de FP de GITRL

Se determinó la temperatura de fusión de las proteínas de FP de GITRL usando un colorante fluorescente (Sypro Orange) cuyas propiedades de emisión cambian en presencia de una proteína desplegada.

5 Método

Se evaluó la termoestabilidad de variantes de FP de GITRL multiméricas usando un ensayo basado en Sypro Orange para calcular las temperaturas de fusión (T_m). En primer lugar se diluyeron las diferentes proteínas hasta 0.5 mg/ml en 2×PBS antes de dispensarlas en una placa de PCR de 96 pocillos. Se añadió Sypro Orange™ a cada pocillo en la placa, que entonces se selló. Se leyeron las placas en una máquina de PCR Real-Time™ usando un detector de fluorescencia continua Chromo4™. Se fijó que la temperatura aumentase desde 15 20 °C hasta 90 °C con una lectura cada 1 °C y un tiempo de espera de 1 s. Se determinaron las transiciones de desplegamiento representando gráficamente la intensidad de fluorescencia y la derivada de la fluorescencia como una función de la temperatura. Se analizó cada proteína de FP de GITRL multimérica por duplicado. 20

 Resultados

Los resultados se presentan en las figuras 5A-D. Las temperaturas de fusión para cada una de las nueve proteínas de FP de GITRL multiméricas se resumen en la **Tabla 1-7** a 25 continuación. Todas las variantes tenían un perfil similar con la excepción de FP de GITRL (DMPK tn) que presenta un único pico de transición a 59 °C en comparación con 62-64 °C para la mayoría de las demás, FP de GITRL (langerina tn) y FP de GITRL (langerina variante) que presentan un pico de 30 transición adicional a una temperatura baja (45-50 °C), lo que sugiere algo de inestabilidad estructural.

Tabla 1-7: Temperaturas de transición para las nueve proteínas de FP de GITRL

	Muestra de prueba	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
5	FP de GITRL (GCN4 pII)	/	63
	FP de GITRL (matrilina 1 tn)	/	62.5
10	FP de GITRL (matrilina 1 variante)	/	63
	FP de GITRL (coronina 1a tn)	/	63
15	FP de GITRL (coronina 1a variante)	/	63
	FP de GITRL (DMPK tn)	/	59
	FP de GITRL (DMPK variante)	/	63.5
20	FP de GITRL (langerina tn)	47.5	63
	FP de GITRL (langerina variante)	45-50	62

25 Análisis de inmunogenicidad *in silico* de variantes de FP de GITRL

Se determinó la inmunogenicidad predicha de los 8 dominios de superhélice y sus secuencias circundantes usando el algoritmo ProPred.

Método

30 Usando ProPred [Singh & Raghava (2001) Bioinformatics 17(12)], se evaluaron la puntuación T de los ocho motivos de trimerización humanos seleccionados, y GCN4 pII de levadura.

La puntuación T de una secuencia de aminoácidos arbitraria cuantifica el número de epítomos de CMH de clase II que se unen fuertemente en relación con la longitud total de la secuencia de aminoácidos. Una secuencia de nueve meros se considera un epítopo que se une fuertemente, si ProPred devuelve una puntuación de unión que se encuentra por encima del percentil 95 de las puntuaciones obtenidas evaluando un conjunto de 10.000 secuencias de nueve meros generadas aleatoriamente. Se calculó la puntuación de T para cada motivo, incluyendo la secuencia 2x[G4S] que precede al motivo y la secuencia [G4] y los primeros 4 aminoácidos del dominio de GITRL tras el motivo, para los ocho alelos humanos más comunes. Entonces se formó la puntuación T global como la suma de las puntuaciones T de alelos individuales.

Resultados

La puntuación T global para cada motivo de trimerización y su secuencia circundante se muestra en la **Tabla 1-8**. Obsérvese que la puntuación máxima es igual a ocho, lo que corresponde a un caso en el que cada nueve meros en la secuencia es un epítopo que se une fuertemente para los ocho alelos que se someten a prueba. De manera interesante, este análisis global predice que casi todos los candidatos, excepto DMPK tn tienen perfiles inmunogénicos ligeramente más fuertes que GCN4. Matrilina tn y variante tienen ambas las puntuación T global más alta.

Tabla 1-8: Puntuaciones T globales para los ocho motivos de trimerización humanos y GCN4 pII

n.º	Motivo de superhélice	Puntuación T
1	GCN4 pII	0.131579
2	Matrilina 1	0.270833

3	Matrilina 1 variante	0.270833
4	Coronina 1a tn	0.142857
5	Coronina 1a variante	0.166667
6	DMPK tn	0.0875
7	DMPK variante	0.175
8	Langerina tn	0.209302
9	Langerina variante	0.186047

Análisis de SEC-MALLS de variantes de FP de GITRL

Método

Se analizaron proteínas en un instrumento BioSep-Sec-S™ 4000 (volumen vacío, V0= 5.7 ml) y se realizaron todas las ejecuciones a la velocidad de flujo de 0.5 ml/min durante 30 min. Se monitorizó la elución con detectores de UV280, de índice de refracción y de dispersión de luz láser de múltiples ángulos. Se cargaron las muestras (a 1-2 mg/ml) en la columna y se calcularon entonces la masa molar y el diámetro de partícula.

Resultados

FP de GITRL multimérica (matrilina 1 tn)

FP de GITRL con el motivo de trimerización de matrilina-1 produjo tres picos distintos en la columna de filtración en gel: el pico 2 tiene la masa molar promedio en peso de 312 kDa de acuerdo con la masa molar esperada del hexámero glicosilado y constituye el 40.9% de masa total de la proteína, mientras que el pico 1 tiene una masa molar promedio en peso correspondiente al dímero de hexámeros (~610 kDa) y constituye el 41.3 % de la masa total inyectada. El pico 3 tiene una masa inferior a la esperada (~215 kDa) lo que podría ser o bien un resultado fragmentación o bien una

pérdida de un dímero del hexámero . Constituye el 17.7% de la masa total de la proteína. La composición de esta preparación de proteína es por tanto heterogénea, sin ninguna especie oligomérica dominante individual.

5 FP de GITRL multimérica (coronina 1a tn)

El análisis de la superposición de los perfiles de UV280, índice de refracción y dispersión de láser 900 muestra que el 93.9 % de esta proteína eluye a los 16.4 min como una especie monodispersa de 300 kDa. Esta masa observada
10 concuerda con la masa predicha del polipéptido de FP de GITRL hexamérico (274.95 kDa). La diferencia entre la masa calculada y observada de 25 kDa está provocada lo más probablemente por glicosilación. El pico minoritario a 14.7 min tiene la masa molar promedio en peso de 690 kDa, lo que
15 podría atribuirse al dímero de hexámeros.

 FP de GITRL multimérica (GCN4 pII)

De manera similar, el análisis de los cromatogramas de dispersión de láser y de índice de refracción de FP de GITRL con el motivo de trimerización de GCN4 pII demuestra que el
20 93.75% de esta proteína eluye como una especie monodispersa de 330 kDa, lo que concuerda con el hexámero glicosilado. El pico que eluye a los 15 minutos contiene sólo el 6.25% de la proteína total y tiene la masa molar promedio en peso de aproximadamente 700 kDa, lo que refleja probablemente la
25 presencia de un dímero de hexámeros.

 Perfiles de masa molar frente al tiempo

La figura 6 muestra la composición de masa molar de los picos eluidos para cada una de las tres proteínas de FP de GITRL multiméricas. Para las tres proteínas, la masa molar
30 a través de picos tempranos con un tiempo de retención de ~15 min es altamente variable, particularmente en el caso de

FP de GITRL (matrilina 1 tn) en donde la masa de las moléculas eluidas al comienzo y al final del mismo pico difiere en más de 100 kDa. Los picos que eluyen a ~17 minutos son menos heterogéneos en su composición molecular, con una variación de masa molar máxima en FP de GITRL (coronina 1a tn) de menos de 20 kDa. La variación en la masa molar promedio en peso está provocada lo más probablemente por diferencias en el contenido en glicanos de las glicoproteínas que se eluyen dentro del mismo pico.

Resumen de datos de caracterización

En el análisis de los datos recopilados mostrados en la **Tabla 1-9** que compara el rendimiento de diversos dominios de trimerización de superhélice en FP de GITRL multimérica, el dominio de superhélice de coronina 1a proporciona un rendimiento de expresión mejorado. La comparación de las puntuaciones de predicción del motivo de superhélice de coronina-1a y los motivos de secuencias humanas clasificadas como superhélice trimérica, sin embargo, muestra que la coronina-1a tn tenía una clasificación de LOGICOIL de 5.

Tabla 1-9: Resumen de datos de caracterización

Motivo de trimerización	Clasificación de LOGICOIL	Rendimiento de expresión (mg/ml)	Tm1 (Sypro Orange)	Inhibición de receptor/ligando o CI50 (HTRF)	Unión celular (Mirrorball)	CE ₅₀ de agonismo (Indicador de NFκB)	In silico Inmunogenicidad
GCN4	1		63	1.06	Buena	0.89	0.132
Matrilina 1 tn	9	0.51	62.5	1.36	Buena	0.92	0.271

5	Matrilina 1 variante	8	0.57	63	0.83	Buena	0.89	0.271
	Coronina 1a tn	5	0.9	63	0.61	Buena	0.75	0.143
	Coronina 1a variante	6	0.63	63	1.44	Buena	0.71	0.167
10	DMPK tn	7	0.66	59	2.73	Buena	0.96	0.088
	DMPK variante	2	0.34	63.5	2.43	Buena	1.38	0.175
	Langerina tn	3	0.37	47.5	8.05	Buena	1.17	0.209
15	Langerina variante	4	0.48	45- 50	2	Buena	0.57	0.186

EJEMPLO 2: Generación y caracterización de una proteína de fusión de GITRL, caracterización de la misma, y caracterización de proteínas de fusión de GITRL de ratón

Derivación y composición

20 Se construyó una proteína de fusión de GITRL IgG1 hexamérica que comprendía subunidades monoméricas que tenían la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Cada subunidad monomérica de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 comprende 3 dominios distintos: 1) un dominio de Fc de IgG1 humano; 2) un dominio de trimerización de hélice alfa superenrollada derivado de la proteína coronina 1A humana y 3) el ECD de GITRL humano, con una única mutación puntual (N161D) en el ECD de GITRL humano que elimina el único sitio de glicosilación ocupado. Cada dominio está separado por ligadores ricos en glicina y serina o ricos en glicina flexibles, p. ej., (Gly)₄ (figura 8). El dominio de ECD de GITRL humano en cada monómero forma trímeros no covalentes

débiles con dos monómeros adicionales en disolución, y esta asociación se fortalece a través de interacciones entre el dominios de trimerización de coronina 1A humana dando como resultado una estructura trimérica estabilizada. La interacción de los dominios de Fc de IgG1 presentes en cada trímero conduce a la formación posterior de un dímero de trímeros de GITRL dando como resultado la conformación hexamérica final.

La molécula de ADN expuesta en SEQ ID NO: 7, que codifica la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1 precursora que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, se sintetizó y se clonó, usando técnicas de biología molecular convencionales, en un vector de expresión que permitía una expresión de proteínas recombinantes transitoria eficaz.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas del monómero de subunidad de la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1 expuestas en SEQ ID NO: 6, se muestran en la figura 8.

Expresión y purificación de proteína recombinante

Se transfectaron células CHO que crecían en suspensión en un medio químicamente definido similar a CD-CHO™ (Life Technologies Ltd, Paisley, RN) en biorreactores Wavebag, con vectores de ADN que codificaban para las diferentes FP de GITRL hexaméricas. Se mantuvieron los cultivos como una alimentación discontinua, usando una alimentación de nutrientes similar a CHO CD- Efficient Feed A™ (Life Technologies Ltd, Paisley, RU), durante 10-12 días, momento en el que se recogieron usando filtración para la eliminación de células. Entonces se refrigeró el medio condicionado antes de la purificación.

Se purificó la proteína de los medios condicionados usando resina MabSelectSure™. Se neutralizó el pico eluido y se filtró antes de la purificación adicional en resina de tipo hidroxapatita 1. Se llevó a cabo la elución con un gradiente de sal. Se monitorizó la pureza mediante SEC HPLC a lo largo de todo el proceso.

Análisis de glicosilación de la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1

El estado de glicosilación de la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 se determinó usando espectrometría de masas de cromatografía de líquidos acoplada con tiempo de vuelo de cuadrupolo (QTOF) (EM de CL-QTOF), y mapeo de péptidos con espectrometría de masas. En la figura 9, se muestran los resultados.

La masa exacta de la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6, obtenida mediante análisis de EM de CL-QTOF de la subunidad polipeptídica reducida concuerda con la secuencia de aminoácidos esperada con la adición de un glicano biantenarico (predominantemente G0f) por cadena. El perfil de masa concuerda con la glicosilación de dominio de Fc sin ocupación de N-glicano en N129 en el ECD de GITRL (N369 en la proteína de fusión) de la subunidad polipeptídica de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 tal como se confirma mediante mapeo de péptidos. Estos datos también confirman que la mutación N161D en el ECD de GITRL (N401 en la proteína de fusión) da como resultado un ECO de GITRL aglicosilado, con N-glicosilación presente sólo en el sitio de glicosilación canónico en el dominio de Fc.

Caracterización *in vitro* de una FP de GITRL IgG1 hexamérica

Efecto de una FP de GITRL IgG1 hexamérica sobre la unión de ligando-receptor

El efecto de una FP de GITRL IgG1 hexamérica que tenía la secuencia de subunidad de FP de GITRL IgG1 monomérica de SEQ ID NO: 6 sobre la unión de GITRL humano a GITR humano se determinó usando un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF). Se tituló la FP de GITRL IgG1 en ensayo de HTRF en el que se midió la unión de GITRL-HA (etiqueta de hemaglutinina) a GITR-Fc. Se conjugó la GITR-Fc humana con criptato de europio y se usó un anticuerpo anti-HA conjugado con XL665 para detectar la proteína GITRL-HA. Se determinaron los valores de CI_{50} mediante ajuste de curva de los datos analizados a una ecuación logística de cuatro parámetros con el software Prism 6.0x (GraphPad). Los resultados representativos mostrados en la figura 10 demuestran que la FP de GITRL IgG1 inhibe la unión de GITRL-HA a GITR con una CI_{50} de 0.562 nM. No se observó inhibición con anticuerpo de control de isotipo NIP228.

Agonismo de GITR

El fin de este experimento era determinar la capacidad de una proteína de fusión (FP) de GITRL para suministrar señales por medio del receptor GITR.

Método

Se añadió FP de GITRL hexamérica en disolución a células Jurkat transfectadas con hGITR y un gen de indicador de luciferasa unido a un promotor de factor nuclear kappa B (NFκB). En este ensayo la activación del receptor GITR da como resultado señalización por medio de la ruta de NFκB, lo que a su vez da como resultado un aumento en la actividad luciferasa que puede medirse por medio de luminiscencia.

Resultados

La adición de FP de GITRL hexamérica al sistema de ensayo dio como resultado un aumento en la luminiscencia. El efecto observado era dependiente de la concentración con una CE₅₀ de aproximadamente 180 pM. En contraposición la adición de un anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto. En la figura 11 se muestran los resultados. Estos datos demuestran que FP de GITRL hexamérica es un potente agonista del receptor GITR.

Activación de células T primarias

Se realizó este experimento para evaluar el impacto del agonismo de GITR, mediado por FP de GITRL hexamérica, sobre la proliferación y función de células T humanas.

Método

Se aislaron células T humanas totales de sangre de seres humanos sanos y se expusieron a antígeno, mediante cultivo en presencia de anti-CD3 unido a placa durante 4 días, con el fin de regular por incremento la expresión de GITR. Se hicieron reposar las células expuestas a antígeno durante 2 días mediante cultivo en medio solo antes de reestimularse con una concentración subóptima de anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de FP de GITRL hexamérica. Se evaluó la proliferación de células cuantificando la incorporación de timidina en las células a lo largo de un periodo de 18 horas. Se cuantificó la liberación de interferón gamma (IFN- γ) usando descubrimiento de mesoescala.

Resultados

La adición de anti-CD3 junto con anti-CD28 dio como resultado un nivel de proliferación mínimo y una liberación de IFN- γ mínima. La adición de FP de GITRL hexamérica unida a placa junto con anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa dio como resultado un aumento dependiente de la concentración en

el nivel de proliferación así como la liberación de IFN- γ . Se muestran datos representativos en la figura 12 y la figura 13. Un anticuerpo de control de isotipo no tenía efecto sobre la proliferación o la liberación de citocinas.

5 ADCC

Se ha mostrado *in vivo* que una FP de GITRL IgG1 hexamérica de ratón agota células T positivas para CD4 intratumorales, incluyendo células T reguladoras positivas para FOXP3, dando como resultado un aumento de la razón de
10 células T CD8⁺ con respecto a CD4⁺ dentro del tumor. Este experimento se realizó para determinar la capacidad de FP de GITRL hexamérica para mediar en el agotamiento de células T humanas por medio de ADCC y para evaluar el cambio resultante en la razón CD8:CD4 en la población celular superviviente.

15 Método

Células T humanas primarias, aisladas de sangre de seres humanos sanos, se expusieron a antígeno con fitohemaglutinina (PHA) e IL-2 con el fin de regular por incremento la expresión de GITR. Se marcaron con un colorante
20 fluorescente y se incubaron durante 24 horas con células NK primarias, a la razón indicada junto con FP de GITRL hexamérica, a las concentraciones indicadas. Se usó citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células T vivas presentes al final del ensayo, y se usó esto para
25 calcular un porcentaje de lisis para pocillos tratados en relación con no tratados. La proporción de células CD4 y CD8 también se cuantificó mediante citometría de flujo.

Resultados

Las células NK solas mediaban en una pequeña cantidad
30 de lisis de las células T primarias, que se potenció significativamente mediante la adición de FP de GITRL

hexamérica que comprendía una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL expuesta en SEQ ID NO: 6 que contenía un dominio de Fc de IgG1 de una manera dependiente de la concentración. FP de GITRL hexamérica que comprende una subunidad polipeptídica de fusión de GITRL de SEQ ID NO: 40 que contiene un dominio de Fc de IgG4 que no puede unirse a los receptores de Fc gamma en células NK, se usó como control negativo y no tuvo efecto sobre el nivel de lisis medido (figura 14).

El análisis por citometría de flujo del porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ presentes al final del ensayo indicó que que la ADCC mediada por FP de GITRL hexamérica favorece la generación de una razón aumentada de células T CD8:CD4 (figura 15).

Ensayos de células T reguladoras

GITR se expresa a niveles aumentados en células T reguladoras (T-regs) y se ha sugerido que la señalización a través de GITR tiene un impacto en la capacidad de T-regs para suprimir otras células T. Se realizó este experimento con el fin de evaluar el impacto de FP de GITRL hexamérica sobre la función de T-reg.

Método

Se aislaron células T efectoras CD4⁺ CD25⁻ y T-regs CD4⁺ CD25⁺ de la sangre periférica de donantes humanos sanos. Se marcaron células T efectoras con CFSE antes del cultivo en presencia de anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD28, T-regs a la razón indicada y artículos de prueba. Se analizó el porcentaje de células T efectoras en proliferación mediante citometría de flujo.

Resultados

Se observó la proliferación de células T efectoras en respuesta a la adición de anti-CD3 y anti-CD28. La adición de números crecientes de T-reg dio como resultado una reducción en el porcentaje de células T efectoras que se han dividido durante el ensayo. La adición de control de isotipo unido a placa disminuyó adicionalmente el porcentaje de células divididas, mientras que la adición de FP de GITRL hexamérica unida a placa restauró el porcentaje de células divididas a lo observado en ausencia de T-regs. En la figura 16 se muestran los resultados.

Este estudio demostró la capacidad de FP de GITRL hexamérica para superar los efectos de la supresión mediada por células T reguladoras sobre otras células T.

Pruebas para la actividad biológica/funcional *in vivo*

Actividad antitumoral dependiente de isotipo

Debido a que GITRL humano no reacciona de manera cruzada con GITR de ratón la FP de GITRL humana no puede someterse a prueba en modelos de ratón inmunocompetente de cáncer. Para permitir estas pruebas, se generaron FP de mGITRL IgG1 de ratón y FP de mGITRL IgG2a sustitutos. Se realizó este estudio con el fin de evaluar la actividad antitumoral de FP de mGITRL en el modelo CT26 de cáncer, y para determinar el impacto del isotipo de Fc sobre la magnitud de esta actividad.

Método

Se les implantó a ratones Balb/c la línea celular de cáncer colorrectal de ratón CT26. El día 6 tras la implantación se les administró a los animales FP de mGITRL mediante inyección intraperitoneal (i.p.) o bien una vez o bien diariamente durante 17 días. Se sometieron a prueba dos versiones diferentes de la FP de mGITRL; una que contenía un

dominio de Fc de mIgG2a la otra que contenía un dominio de Fc de mIgG1. Se sometieron a prueba dos niveles de dosis diferentes de cada FP de mGITRL; 5 mg/kg y 10 mg/kg. Se empleó tratamiento con solución salina como control negativo.

Resultados

La mediana de supervivencia en el grupo tratado con solución salina era de 22 días y ninguno de los ratones en este grupo sobrevivió hasta el final del estudio. Tratamiento con la FP de mGITRL a 10 mg/kg prolongó la mediana de supervivencia hasta 32 días y dio como resultado una tasa de supervivencia del 50% al final del estudio. En el grupo tratado con la FP de mGITRL a 5 mg/kg 9 de 10 ratones estaban vivos al final del estudio y no pudo definirse una mediana del tiempo de supervivencia. El tratamiento con la FP de mGITRL mIgG1 a 5 ó 10 mg/kg prolongó la mediana de supervivencia hasta 28 y 22.5 días respectivamente y dio como resultado que 2 de 10 ratones sobrevivieran hasta el final del estudio. Los resultados se presentan en la figura 17.

Este estudio demuestra el potencial de la FP de mGITRL para mediar en la actividad antitumoral e indica que el isotipo de la FP puede tener un impacto en el nivel de actividad antitumoral observada.

Efectos farmacodinámicos

Se realizó este estudio para determinar el impacto de FP de mGITRL sobre el estado de activación y la proporción de células T en el bazo y el tumor de ratones que llevan tumor.

Método

Se trataron ratones hembra Balb/c que llevan tumor CT26 con edades de 7-9 semanas mediante inyección intraperitoneal con FP de mGITRL a o bien 0.2 o bien 1 mg/kg tal como se indicó. Se empleó tratamiento con solución salina como control negativo. Se sacrificaron los ratones 7 días tras el inicio del tratamiento y se usó citometría de flujo para evaluar la frecuencia y el fenotipo de células en el bazo y el tumor.

Resultados

El tratamiento con FP de mGITRL dio como resultado un aumento en la expresión del marcador de proliferación Ki67 en todos los subconjuntos de células T en el bazo, lo que sugiere un aumento en la proliferación de estas células. Véase la figura 18.

El tratamiento con FP de mGITRL dio como resultado un aumento en la expresión del marcador de activación ICOS en todos los subconjuntos de células T en el bazo, lo que sugiere un aumento en la activación de estas células. Véase la figura 19.

El tratamiento con FP de mGITRL dio como resultado una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4+ FOXP3+ y células auxiliares CD4+ FOXP3- dentro del tumor, pero no alteró la frecuencia de células T citotóxicas CD8+. El resultado global fue una razón de CD8:CD4 aumentada dentro del microentorno del tumor. Véase la figura 20.

Método

Líneas celulares y reactivos

Se obtuvo la línea tumoral TC-1 de la ATCC (n.º de cat. CRL 6475, Manassas, VA) y se mantuvo en DMEM + FBS al 10% + penicilina/estreptomicina al 1%. Se obtuvo la línea tumoral CT26 de la ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en medio RPMI

1640 complementado con suero bovino fetal al 10%. Se adquirieron los anticuerpos de isotipo y DTA-1 de Bio X Cell (West Lebanon, NH).

Modelos tumorales

5 Los experimentos con TC-1 usaron ratones C57BL/6 hembra (n.º de cat. 000664), ratones obtenidos de Jackson Labs (Bar Harbor, ME). Los experimentos con CT26 usaron ratones Balb/c hembra obtenidos de Envigo (Frederick, MD). Los ratones tenían entre 6 y 8 semanas de edad en el momento de la
10 implantación del tumor. Se realizaron todos los experimentos con animales según directrices establecidas por el Comité institucional de cuidado y uso de animales. Para la implantación del tumor TC-1, se implantaron por vía subcutánea 2×10^4 células TC-1 viable por vía subcutánea en
15 la almohadilla plantar trasera izquierda. Para la implantación del tumor CT26, se implantaron 5×10^5 células en el costado derecho. Se evaluó el crecimiento tumoral mediante medición directa con calibres. Se recogieron mediciones bidireccionales cada 2-4 días, y se calculó el
20 volumen tumoral usando $\text{volumen} = (\text{longitud} \cdot \text{anchura}^2)/2$. Se permitió que los tumores se desarrollaran durante 6-14 días y luego se aleatorizaron los ratones que llevaban tumor a grupos de tratamiento mediante el volumen tumoral. Se sacrificaron los ratones cuando el tumor primario excedió
25 1000 mm^3 para TC-1/almohadilla plantar y 2000 mm^3 para CT26/costado según el protocolo del IACUC. Para estudios PD, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tumores y los bazos, se trituraron a través de un filtro de $70 \mu\text{M}$ (Corning, Corning, NY), y se procesaron para dar una una
30 suspensión de células individuales.

Respuestas funcionales de células T y citometría de flujo

Para estimulaciones específicas de antígeno, se sembraron en placa 1-2x10⁶ células vivas por pocillo con 1
5 ug de secuencia peptídica de AH1 SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 56) (Anaspec, Fremont, CA). Para todas las tinciones el orden de tinción fue azul vivo/muerto (Life Tech), proteínas extracelulares, kit Fix/Perm de FOXP3 (Ebioscience), y seguido por citocinas intracelulares. Los anticuerpos
10 incluían GITR (clon DTA-1). Se ejecutaron todas las muestras en un instrumento o bien LSR-II o bien Fortessa (BD San Jose, CA). Se analizaron todos los datos usando FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

Resultados

15 FP de mGITRL es un agonista de GITR altamente eficaz y esto conduce al rechazo de tumores CT26.

Se ha mostrado anteriormente que el agonismo de GITR es eficaz para provocar la regresión y eliminación del tumor CT26 en ratones Bablc. Se implantaron ratones Balb/c con
20 células tumorales CT26 y tras 6 días se aleatorizaron por el volumen tumoral (grupo n=10) y se trataron con una única administración o administración repetida de FP de mGITRL IgG2a (Q2Dx9). El intervalo de dosis fue de desde 5 mg/kg de peso corporal hasta 0.04 mg/kg de peso corporal. Para la
25 administración individual, dosis hasta 1 mg/kg de FP de mGITRL eliminaron todos menos uno de los tumores de ratón CT26 hasta el día 30 (figura 40B). Las dosis más bajas produjeron 3 eliminaciones en el grupo de 0.2 mg/kg y 2 en el de 0.1 mg/kg. La adición de administraciones adicionales
30 de FP de mGITRL aumentó la eficacia y todos menos el grupo de dosis más baja de 0.04 mg/kg mostraron una tasa de

eliminación del 100% (figura 40C). El grupo de administración de repetición más baja mostró 4 eliminaciones.

Para la evaluación de la función de FP de mGITRL, se comparó con DTA-1, un agonista de GITR monoclonal conocido. El uso de una dosis que oscila entre 100 ug y 500 ug por ratón se ha descrito anteriormente. Se estimó que cada ratón pesaba aproximadamente 20 gramos, de modo que las dosis oscilaron entre 5 mg/kg y 25 mg/kg. Se les implantó a ratones Balb/c células tumorales CT26 y tras 10 días se aleatorizaron por el volumen tumoral (grupo n=10) y luego se trataron con una única administración de o bien FP de mGITRL IgG2a a 1 mg/kg o bien DTA-1 a 5 mg/kg o 25 mg/kg (figura 40D).

El aumento de la dosis de DTA-1 aumentó la eficacia, sin embargo 1 mg/kg de FP de mGITRL mostró una eficacia y cinética de crecimiento tumoral similares a las de DTA-1 a 5 mg/kg. Para determinar si eran necesarias células T CD8 para el efecto farmacológico, se evaluaron los mismos grupos pero se agotaron selectivamente las células T CD8 usando un anticuerpo de agotamiento monoclonal (figura 40E). Sin células T CD8, la capacidad de que o bien DTA-1 o bien FP de mGITRL eliminaran completamente el tumor CT26 disminuyó significativamente. Solo 1-2 ratones de cada grupo sobrevivieron libres de tumor.

Adicionalmente, sin células T CD8, FP de mGITRL era menos eficaz que DTA-1 en el aumento de la mediana de supervivencia global (figura 40F). Para entender cómo interacciona FP de mGITRL con CD8, se evaluó la expresión de GITR en poblaciones linfoides individuales. Tregs CD4+ expresan niveles superiores de GITR que las células T CD8; sin embargo, tanto las Tregs como las células T CD8 en el

tumor expresan niveles superiores de GITR que sus respectivas poblaciones en el bazo (figura 40G).

FP de mGITRL agota Tregs y aumenta las células T específicas de antígeno.

5 Se ha mostrado anteriormente que los agonistas de GITR disminuyen Tregs así como aumentan respuestas de alta avidéz de células T. Para entender en qué efectos farmacodinámicos era capaz de mediar GITRL-FP, se evaluó el modelo CT26 durante la regresión tumoral. Se trataron ratones Balb/c con
10 CT26 con FP de mGITRL IgG2a y 8 días tras comenzar la dosificación, se recogieron los bazos y el tumor. Se incluyeron dos ramas del estudio, un grupo de TGI (inhibición del crecimiento tumoral) (n=5) y un grupo de PD (farmacodinámica) (n=5). Todos menos un único ratón tratado
15 con FP de mGITRL se curaron de CT26 (figura 41A). El día 18, el grupo de PD grupo se sacrificó y se evaluaron ambos fenotipos de las células inmunitarias presentes en el bazo y el tumor. Entonces se evaluó la función de células T CD8 mediante reestimulación con AH1, el epítipo inmunodominante
20 de CT26. FP de mGITRL aumentó disminuyó significativamente el número de Tregs en el bazo y el tumor (figura 41B). Mientras que FP de mGITRL no cambió el porcentaje de CD8, aumentó significativamente el número de CD8s que son específicas de antígeno para AH1 (figuras 41C-D). En el bazo
25 el 5-10 % de las CD8 totales eran específicas de antígeno y podían producir IFN γ y TNF alfa. En el tumor, el número era del 5-15%. Esto es una expansión significativa de tanto linfocitos infiltrantes del tumor así como del reservorio periférico. Para evaluar si FP de mGITRL se había unido a
30 tanto Tregs CD4 como células T CD8, se tiñó GITR para usar el anticuerpo DTA-1 (figuras 41 E-F). Tregs mostraron una

reducción de más del 75% en MFI de GITR (intensidad de fluorescencia media). Se observó este mismo efecto en las células T CD8, mostrando que FP de mGITRL estaba alterando la unión de DTA-1 en las células T CD8. Basándose en estos
5 datos, se planteó la hipótesis de que las células T mostrarían una proliferación de KI-67 aumentada. Tras la evaluación el día 8 tras los tratamientos, las células T tanto CD4 como CD8 muestran significativamente más células positivas para KI-67 en tanto el tumor como el bazo (figuras
10 41G-H).

FP de mGITRL expande células T CD8 específicas de antígeno de una manera dependiente de la dosis.

Se investigó a continuación si ratones curados de CT26 estaban protegidos frente a la reexposición con el mismo
15 tumor. Para evaluar esto, se reexpusieron ratones curados de los grupos tratados con una única dosis de 1.0, 0.5 ó 0.2 mg/kg de FP de mGITRL IgG2a (figura 42A). Se muestran todos los ratones desde la dosis inicial, pero sólo se reexpusieron los ratones curados en D85. Todos los ratones originalmente
20 curados de CT26 estaban protegidos frente a la reexposición del tumor, aunque en los grupos de dosis más baja, se midió una pequeña masa pero se eliminó rápidamente. Para investigar adicionalmente este resultado, el día 120 se sacrificaron los ratones, se extrajeron esplenocitos y se reestimularon
25 frente a péptido AH1. Hubo un aumento dependiente de la dosis en los números de células T específicas de AH1 (figuras 42 B-C). En el grupo de FP de mGITRL 1 mg/kg, el 25% de las células T CD8 esplénicas son específicas para un único epítipo de CT26. Estos ratones no mostraron aumento en el
30 tamaño tumoral durante la reexposición. La dosis más baja, 0.2 mg/kg, tenía un 6% de CD8 específicas de antígeno y

mostró una pequeña masa en crecimiento tras la reexposición que se eliminó para el día 120.

Afinidad de unión de una FP de GITRL IgG1 hexamérica a GITR humano

5 La K_D de disolución (constante de disociación) de una FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 para GITR humano recombinante se determinó usando un ensayo de exclusión cinética (KinExA) usando un instrumento KinExA
10 3200 (Sapidyne Instruments, Boise Idaho).

Se titularon disoluciones 2 nM de la FP de GITRL IgG1 hexamérica en tampón D-PBS, sodio al 0.02% y albúmina sérica bovina 1 mg ml⁻¹ con GITR humano recombinante y se equilibraron durante la noche a 25 °C. Se transfectaron las
15 muestras con el instrumento KinExA 3200 que tenía una temperatura controlada a 25 °C. Se logró la toma de muestras de las mezclas equilibradas usando estreptadivina unida a perlas de azlactona que se había titulado con GITR humano biotinilado con amina mínimamente. El reactivo de detección
20 secundario usado fue el reactivo específico de Fc proteína G' marcada con Dylight 650 ' (un fragmento de proteína G disponible de Sigma). Se procesaron los datos y se interpretaron usando el software KinExAPro (versión 3.6.8.). Se obtuvo una K_D de 82 nM para la unión de la FP de GITRL
25 IgG1 hexamérica a GITR humano.

Unión de una FP de GITRL IgG1 hexamérica a GITR de mono Cynomolgus recombinante mediante KinExA

La K_D de disolución de una FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas de FP de GITRL IgG1 de
30 SEQ ID NO: 6 para GITR de cynomolgous recombinante se determinó usando un instrumento KinExA de la misma manera

que se describió en la sección 6.1 para GITR humano. Se obtuvo una K_D para la unión de la FP de GITRL IgG1 hexamérica a GTR de cynomolgus de 107 nM.

Unión de una FP de GITRL IgG1 hexamérica a GTR de mono
5 Cynomolgus recombinante mediante ELISA

La reactividad cruzada de una FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 a GTR de cynomolgus se determinó usando un ELISA. Se biotiniló la FP de GITRL IgG1 hexamérica
10 y se detectó la unión a GTR de cynomolgus-Fc inmovilizada usando estreptavidina-HRP y sustrato TMB. La figura 21 muestra que la unión de la FP de GITRL IgG1 hexamérica GTR de cynomolgus es muy similar a GTR humano, y que no se observa unión a la proteína CD137-Fc de control negativo.

15 EJEMPLO 3: Efecto farmacodinámico in vivo del tratamiento con FP de GITRL IgG1 FP intravenoso en mono Cynomolgus

Para determinar los parámetros farmacodinámicos de una proteína de fusión (FP) de GITRL IgG1 hexamérica en el mono
20 cynomolgus, se administró FP de GITRL IgG1 hexamérica que comprende subunidades monoméricas de FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO: 6 mediante inyección en bolo intravenosa (i.v.) a grupos (5/grupo) de monos Cynomologus macho.

Método

25 Se les inyectó a grupos de animales diferenciados el día 1, día 3 y día 5 1 ó 10 mg/kg de FP de GITRL IgG1 hexamérica. Los animales de control recibieron vehículo (fosfato de sodio 20 mM, sacarosa 230 mM, P80 al 0.02%, pH 7.5). Se tomaron muestras de sangre durante la fase predosis y los días 1,
30 3, 5, 9, 11, 15, 18, 22 y 29 para la medición de los puntos finales farmacodinámicos.

Usando métodos de citometría de flujo convencionales, se midieron las poblaciones de células T positivas para Ki67 de la sangre completa.

Resultados

5 Se observó un aumento en el % de subpoblaciones de células T positivas para Ki67 p. ej. (Células T CD3+CD4+CD95high CD28+/dim/- CD4+ de memoria totales y CD3+CD8+CD95high CD28+/dim/- CD8+ de memoria totales) indicativo de proliferación celular (figura 22). Esta observación alcanzó un máximo el día 11 ó 15 de la fase de dosificación y luego disminuyó hacia el final del estudio.

EJEMPLO 4: Mutación de aminoácidos dentro de FP de GITRL y su impacto sobre la unión al receptor, actividad agonista y estabilidad térmica

15 Generación de variantes de FP de hGITRL con mutaciones en el dominio de unión a receptor de GITRL

Se generaron variantes de FP de hGITRL y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para unirse a y producir agonismo de GITR. En algunos casos también se evaluó su estabilidad térmica.

Método

Usando técnicas de síntesis génica y de clonación de ADN convencionales, se generaron vectores de ADN que codificaban para variantes de FP de GITRL. Se transfectaron de manera transitoria células CHO en suspensión, usando PEI, con vectores de ADN que codifican las diferentes proteínas de fusión de hGITRL hexaméricas y se hicieron crecer durante ocho días a 37°C, agitación a 140 rpm con una humedad del 80%. Se separaron cuarenta mililitros de los medios condicionados que contenían las proteínas secretadas de las células y residuos celulares mediante centrifugación a 1,600

x g y filtración. Se purificaron las proteínas usando resina de AcM SelectSure™ y se analizaron su tamaño e integridad mediante SDS-PAGE reductora.

Competición de variantes de FP de GITRL ligando
5 trimérico recombinante por la unión a GITR

Se determinó el efecto de las moléculas de FP de GITRL sobre la unión de GITRL humano a GITR humano usando un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF).

Método

10 Se titularon las moléculas de FP de GITRL en un ensayo de HTRF en el que se midió la unión de GITRL-HA (etiqueta de hemaglutinina) a GITR-Fc. Se conjugó el Fc de GITR humano con criptato de europio y se usó un anticuerpo anti-HA conjugado con XL665 para detectar la proteína GITRL-HA. Se
15 determinaron los valores de CI_{50} mediante ajuste de curva de los datos analizados a una ecuación logística de cuatro parámetros con el software Prism 5.01 (GraphPad).

Resultados

Las moléculas de FP de GITRL hexaméricas mutadas
20 (hGITRL-FP tn, N92D, N104D y N161D) son todas potentes inhibidores de la unión de GITRL-HA trimérica a GITR-Fc y produjeron perfiles de inhibición y valores de CI_{50} similares (figura 23 A, B).

Unión de variantes de FP de GITRL a GITR-Fc recombinante

25 Se determinó la actividad funcional de las diferentes moléculas de FP de hGITRL en un ensayo usando células indicadoras de NFκB-luciferasa que expresan de manera estable hGITR. Se midió la luminiscencia, dirigida por el agonismo de hGITR y la posterior activación de la ruta de
30 NFκB.

Método

Se titularon las moléculas de FP de hGITRL en un ensayo de HTRF en el que se midió la unión de la FP de hGITRL a hGITR-Fc. Se conjugó la FC de hGITR humana con criptato de europio y se usó un anticuerpo anti-FLAG conjugado con XL665 para detectar la proteína de FP de hGITRL. Se determinaron los valores de KD mediante ajuste de curva de los datos analizados a una ecuación de unión de saturación de sitios con el software Prism 5.01 (GraphPad).

Resultados

Los perfiles de unión para FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D eran muy similares (KD de 1.225 nM y 1.079 nM, respectivamente), mientras que FP de hGITRL mutada en N129A mostró unión reducida a hGITRFc (KD = 3.774nM). Cuando se combinó la mutación N129A con la mutación N161D, la capacidad de unión de las moléculas de FP de hGITRL se vio impactada negativamente de manera adicional (KD = 11.85 nM) (véase la figura 24).

Actividad de variantes de FP de GITRL en un ensayo de indicador

Se determinó la actividad funcional de las diferentes moléculas de FP de hGITRL en un ensayo usando células indicadoras de NFκB-luciferasa que expresan de manera estable hGITR. Se midió la luminiscencia, dirigida por el agonismo de hGITR y la posterior activación de la ruta de NFκB.

Método

Se diluyeron en serie proteínas de FP de hGITRL 4 veces para una curva de 6 puntos de datos y se añadieron por triplicado a placas de 96 pocillos. Entonces se añadieron células indicadoras de NF-κB luciferasa Jurkat transfectadas con GITR humano a todos los pocillos de las placas de ensayo

y se incubaron a 37°C durante tres horas. Se detectó la expresión de luciferasa añadiendo reactivo Steady-Glo a todos los pocillos de las placas de ensayo. Se incubaron las placas durante cinco minutos a temperatura ambiente y luego se midió la luminiscencia y se generaron valores de CE₅₀ usando ajuste de curva no lineal de pendiente variable de respuesta frente a logarítmica (agonista) en GraphPad™ Prism 5.01 (Software GraphPad, Inc. La Jolla, CA EE.UU.).

Resultados

Todas las proteínas de FP de GITRL desencadenan señalización de NF-κB. Las proteínas de FP de hGITRL mutantes en N92D y N161D generaron perfiles de potencia y valores de CE₅₀ similares a FP de GITRL (tn). Las mutaciones N129A y N129A/N161D tuvieron un impacto negativo en la capacidad de la FP de hGITRL para producir agonismo de GITR en este ensayo (figuras 25 A-C).

Actividad de variantes de FP de GITRL en un ensayo de reestimulación de células T

Se determinó la actividad funcional de las diferentes moléculas de FP de hGITRL en un ensayo de coestimulación usando células T humanas primarias y una lectura de incorporación de timidina.

Métodos

Se estimularon células T CD3⁺ derivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por medio de incubación en placas tratadas con TC recubiertas con anticuerpo de ratón anti-CD3 humano durante cuatro días a 37°C. Se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en medio de ensayo, se añadieron a una placa tratada con TC y se incubaron a 37°C durante dos días (fase de reposo). Se diluyeron en serie moléculas de FP de hGITRL

en medio de ensayo 2 veces a lo largo de 10 puntos y se añadieron por triplicado a placas tratadas con TC recubiertas previamente con anticuerpo de ratón anti-CD3 humano. Tras dos horas se lavaron las placas de ensayo y se añadieron las células T CD3⁺ preparadas anteriormente a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante cuatro días. Tras cuatro días, se añadió timidina tritiada en medio de ensayo a cada pocillo y se incubaron las placas a 37°C durante 18 horas adicionales. Tras la incubación, se midió la incorporación de timidina usando un instrumento Topcount™.

Resultados

Todos los mutantes de FP de hGITRL sometidos a prueba demostraron una actividad equivalente a FP de hGITRL tn, con la excepción de N92D que tenía una actividad reducida en dos experimentos independientes (figura 26 A-C).

Temperatura de fusión de variantes de FP de GITRL

Se determinó la temperatura de fusión de las proteínas de FP de GITRL tn y N92D usando un colorante fluorescente (Sypro™ Orange), cuyas propiedades de emisión cambian en presencia de una proteína desplegada.

Método

Se evaluó la termoestabilidad de variantes de FP de GITRL tn y N92D usando un ensayo basado en Sypro Orange para calcular las temperaturas de fusión (T_m). En primer lugar se diluyeron las proteínas hasta 0.5 mg/ml en 2×PBS antes de dispensarlas en una placa de PCR de 96 pocillos. Se añadió Sypro™ a cada pocillo en la placa, que entonces se selló. Se leyeron las placas en una máquina de PCR en tiempo real usando un detector de fluorescencia continua Chromo4™. Se fijó que la temperatura aumentase desde 20 °C hasta 90 °C con una lectura cada 1 °C y un tiempo de espera de 1 s. Se

determinaron las transiciones de desplegamiento representando gráficamente la intensidad de fluorescencia y la derivada de la fluorescencia como una función de la temperatura. Se analizó cada proteína de FP de GITRL por
5 duplicado.

Resultados

Las temperaturas de fusión para las dos proteínas de FP de GITRL se resumen en la tabla 4-1 a continuación. Ambas
variantes tienen un pico de transición a 67°C, sin embargo,
10 FP de hGITRL N92D presenta un pico de transición ancho adicional a una baja temperatura (54°C), lo que sugiere inestabilidad estructural (figura 27).

Tabla 4-1: Temperaturas de transición para las 2 proteínas de FP de GITRL

15		Muestra de prueba	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
		FP de GITRL tn	/	67
		FP de GITRL N92D	54	67

Resumen de datos y conclusiones

La proteína de FP de GITRL N104D demostró una actividad
20 equivalente al homólogo de FP de hGITRL de tipo natural en el ensayo de unión de competencia de GITR/GITRL y el ensayo de reestimulación de células T primarias, lo que sugiere que N104 no desempeña un papel clave en la actividad de FP de hGITRL. La mutación de Asn161 a Asp representa la eliminación
25 de un sitio de glicosilación unido a N (véanse los datos en el ejemplo 4) y este mutante (FP de hGITRL N161D) conservó la actividad en todos los ensayos (ensayos de unión de competencia de GITR/GITRL, unión directa, reestimulación de células T primarias y de indicador), lo que sugiere que
30 Asn161, y los glicanos en este sitio no están implicados en

funciones importantes tales como la unión y el agonismo de GITR.

El mutante N129A demostró una unión reducida a hGITR y actividad reducida en el ensayo de indicador, lo que sugiere que desempeña un papel en la unión a hGITR y el posterior agonismo de hGITR. De manera interesante, cuando se combinó esta mutación con la mutación N161D (que sola no tuvo un impacto en la actividad) se redujo la unión y el agonismo de GITR incluso adicionalmente.

La mutación N92D no parecía tener un impacto en la actividad de FP de hGITRL cuando se sometió a prueba en el ensayo de indicador, sin embargo, se observó una actividad reducida de FP de hGITRL N92D en el ensayo de reestimulación de células T primarias. Cuando se investigó la estabilidad térmica del mutante N92D, se observó un pico de transición de temperatura de fusión inferior muy ancho adicional en comparación con FP de hGITRL, lo que sugiere algo de inestabilidad estructural a temperaturas inferiores (incluyendo 37°C). Debido al transcurso de tiempo más largo del ensayo de células T primarias (4 días), pudo preverse que la molécula de FP de hGITRL N92D se vuelve inestable y se despliega, conduciendo a una actividad reducida en este ensayo en comparación con el ensayo de indicador (3 horas). Por tanto, la mutación de Asn92 a Asp parece ser desfavorable en cuanto a estabilidad estructural.

EJEMPLO 5: Identificación de residuos de aminoácido dentro de FP de hGITRL que están glicosilados.

Hay dos posibles sitios consenso de N-glicosilación dentro del dominio de unión a GITR (N161 y N129). La presencia y estructura de los glicanos en estos sitios, así como el sitio de N-glicosilación canónico dentro del dominio

de Fc (N297 en el contexto de una IgG; N78 en la secuencia de FP de hGITRL madura), se determinaron mediante espectrometría de masas.

Métodos

5 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Se purificaron proteínas de FP de hGITRL tn y N161D recombinantes a partir de los medios condicionados de células CHO transfectadas de manera transitoria con vectores que codifican las proteínas relevantes usando cromatografía de
10 afinidad y cromatografía de exclusión molecular posterior.

Mapeo de péptidos tripticos

Se desnaturalizaron muestras de FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D, se redujeron y se alquilaron las cisteínas reducidas. Entonces se digirieron las muestras con tripsina.
15 Tras 4 horas a 37 C, se extinguió la digestión mediante la adición de ácido. Se separaron los péptidos mediante fase inversa en una UPLC y se midieron usando un detector UV y un espectrómetro de masas. Las secuencias de péptidos tripticos resultantes se proporcionan en la tabla 5-1.

20 Resultados:

Tabla 5-1

ID	Secuencia	Muestra
25 T7	EEQY N STYR (SEQ ID NO:43)	FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D
T40	DMIQTLT N K (SEQ ID NO:44)	FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D
30 T42-43	IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLK N NTY WGIILLANPQFIS (SEQ ID NO:45)	FP de hGITRL tn

ID	Secuencia	Muestra
T43'	<u>D</u> NTYWGIILLANPQFIS (SEQ ID NO:46)	FP de hGITRL N161D

5 N = Secuencia consenso de N-glicosilación de parte de asparagina.

D = Sustitución N161D en FP de hGITRL N161D

 En la figura 28 se proporciona un diagrama esquemático de los tipos de estructuras de oligosacáridos encontradas en las diversas FP de hGITRL. Se proporcionan datos de espectrometría de masas en las figuras 29 A, B y C.

Conclusión

 Se usó análisis de mapeo de péptidos para determinar la ocupación de sitios de N-glicosilación en los dominios de GITRL y Fc, así como la estructura de los oligosacáridos predominantes en cada sitio. En las proteínas tanto FP de hGITRL tn como FP de hGITRL N161D el sitio de N-glicosilación de Fc canónico (N78) estaba glicosilado y las estructuras de hidratos de carbono predominantes eran oligosacáridos de tipo complejo biantenarios, neutros; típicos de regiones Fc de IgG expresadas en células CHO. El sitio consenso de N-glicosilación en N129 dentro del RBD de GITRL no estaba ocupado con ninguna estructura de oligosacárido en o bien FP de hGITRL tn o bien FP de hGITRL N161D. El sitio consenso de N-glicosilación en N161 dentro del RBD de GITRL estaba ocupado en FP de hGITRL tn y se encontró que las estructuras de hidratos de carbono predominantes eran oligosacáridos de tipo complejo biantenarios, neutros y cargados. En la proteína FP de hGITRL N161D, el mapeo de péptidos confirmó la sustitución de aminoácido N161D, que elimina el sitio consenso de N-

glicosilación N161 del RBD de GITRL. Tal como se esperaba no se detectó N-glicosilación en D161.

EJEMPLO 6: Modelos murinos y estudios de combinación de OX40

5 Con el fin de comprender mejor la selección como diana de GITR, se compararon la actividad y los efectos farmacodinámicos de FP de GITRL murino con los de una FP de OX40L murino agonista que selecciona como diana OX40.

Materiales y métodos

10 Ensayo de indicador de NF- κ B

Se cultivaron células Jurkat mGITR o OX40 NF κ B humano a 37°C, el 5% de CO₂ y el 85% de humedad en placas de 96 pocillos a 50,000 células (Jurkat mGITR) o 200,000 células (Jurkat OX40 humano) / pocillo junto con anticuerpo anti-GITR DTA-1 (Biolegend), control de isotipo NIP rIgG2b, FP de mGITRL mIgG2a o control de isotipo o FP de mOX40L mIgG1 inmovilizado en placa (que comprende una mutación de un único aminoácido en una posición (Y182A) que hace que la proteína no pueda señalizar por medio de OX40) tal como se indica. Se
15 añadió reactivo Steady Glo® (Promega) que contenía sustrato de luciferina, a las placas tras 5 horas o tras 16 horas para ensayos que contenían FP de mOX40L mIgG1 y se incubaron las placas durante 30 min en la oscuridad en un agitador de placas. Se detectó la señal del ensayo usando un lector de
20 placas Envision (Perkin Elmer).

SDS PAGE

Se mezclaron cinco microgramos de proteína con tampón de carga y agente reductor, se desnaturalizaron a 80°C durante 10 min y se cargaron sobre un gel de SDS-PAGE con
30 Tris-Glicina al 4-20% (Thermo Fisher), junto con un marcador de peso molecular de proteína (Rainbow Marker, GE

Healthcare). Se sometieron a electroforesis las proteínas durante 45 min a 200 V y se tiñeron usando tinción de proteínas Instant Blue (Sigma).

Ratones y modelos tumorales

5 Se obtuvieron ratones hembra BALB/c o C57BL/6 de 8-10 semanas de edad de Charles River UK Ltd. o Harlan Laboratories Inc. Se inyectó por vía subcutánea una suspensión de 100 μ l de células CT26 o B16F10-Luc2 en PBS a una densidad celular de 5×10^6 células/ml o 5×10^4 células/ml
10 en el costado derecho de cada animal. La línea celular B16F10-Luc2 incorporaba un indicador de luciferasa bajo el control del promotor CAG y se implantaron las células en matrigel libre de rojo de fenol y reducido con el 50 % de PBS y el 50 % de factor de crecimiento (Corning). Se
15 aleatorizaron los tumores medibles basándose en el volumen tumoral. Se midió la longitud (mm) y anchura (mm) de cada tumor con un calibre electrónico 3 veces por semana. Se calcularon los volúmenes de tumores (mm^3) basándose en la fórmula $(\text{longitud [mm]} \times \text{anchura [mm]}^2) / 2$. Se clasificaron
20 las respuestas de crecimiento tumoral como una respuesta si no había tumor medible o una inhibición sostenida del crecimiento tumoral de manera que el volumen era menor de 200 mm^3 al final del estudio. El número de regresiones indicado en cada gráfico de araña es la proporción en
25 relación con el número total de tumores implantados. Se les dosificó a los ratones por vía i.p. o bien FP de mGITRL o bien FP de mOX40L el día 6 tras la implantación de tumores singénicos, o cuando alcanzaron un volumen de 200 mm^3 . La dosificación de FP de mGITRL 25 mg/kg en ratones que llevaban
30 B16F10-Luc2 se toleró sólo durante cuatro dosis.

Citometría de flujo

Se extirparon el tumor, el bazo o el ganglio linfático drenante del tumor y se colocaron en medio RPMI-1640 en hielo. Se disgregaron los tejidos haciéndolos pasar a través de un colador celular de nailon de 40 o 100 μ m (Falcon), y se sedimentaron las células mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma). Tras la incubación durante 2 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las células y se resuspendieron en tampón de citometría de flujo (Ebioscience). Se procesaron las muestras de tejido tumoral usando el disociador MACS suave y el kit de disociación tumoral (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se tiñeron las muestras para determinar la viabilidad usando azul fijable vivo-muerto (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se bloquearon con anti-CD16/32 (ebioscience) antes de la tinción anticuerpos conjugados con fluorocromo. Se adquirieron CD4 (Rm4.5), Foxp3 (FJK-16S), Ki67 (Sol A15), ICOS (7E.17G9), Eomes (Dan11mag), T-bet (Apr-46) y GITR (DTA-1) de ebioscience. Se adquirieron CD45 (30-F11), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), PD-1 (29F.1A12) y OX40 (OX86) de Biolegend. Se adquirió CD8 (53-6.7) de BD Pharmingen. Para la tinción de antígenos intracelulares, se usó el kit de tinción Foxp3 (ebioscience) según las instrucciones del fabricante. Se fijaron las muestras en formalina al 3.7% antes de la adquisición de muestras usando un instrumento Fortessa (Becton Dickinson). Se analizaron los datos con el software FlowJo (Ashland, OR).

Modelado farmacocinético

Se les administró a ratones Balb/c FP de mGITRL mIgG2a 5 ó 15 mg/kg una vez. Se sacrificaron tres ratones por grupo

5 minutos, 0.5, 1, 2, 6, 24, 72, 144 y 240 horas tras el tratamiento. Se recogieron muestras de suero y se evaluaron los niveles de FP de mGITRL mIgG2a circulantes presentes en un ELISA de tipo sándwich usando AcM anti-GITRL murino (R&D Systems) como tanto captura como detección.

Se agruparon los datos farmacocinéticos (PK) obtenidos de los 2 grupos de dosificación y se modelaron simultáneamente usando un enfoque de población. Se realizó el análisis de población usando un paquete de software farmacoestadístico NONMEM (versión 7.2, ICON Development Solutions, Ellicott City, Mariland). Se empleó el método FOCE con opción de interacción. Se describió la PK de FP de GITRL murino-mIgG2a adecuadamente mediante un modelo de dos compartimentos.

15 Líneas celulares

Se mantuvieron células HEK293T-17 (ATCC, CRL-11268) en DMEM (Invitrogen) más suero bovino fetal inactivado por calor al 10% v/v (HI FBS, HyClone) y aminoácidos no esenciales 1 X (NEAA, Invitrogen). Se mantuvieron células Jurkat (ATCC, TIB-152) en RPMI 1640 (Invitrogen) más FBS HI al 10% v/v. Se mantuvieron células Jurkat mGITR NFkB en RPMI 1640 complementado con FBS HI al 10%, blasticidina 5 µg/ml (Invitrogen) y puromicina 5 µg/ml (Invitrogen).

Generación de líneas celulares

25 Se generó la línea celular Jurkat mGITR NFkB mediante transducción lentiviral usando un sistema lentiviral de tercera generación (Systems Biosciences). Se clono el gen de GITR murino (NM_009400.2) en el plásmido de expresión bajo el control de un promotor de CAG y que contenía un gen de resistencia a puromicina. Se diseñó el plásmido de expresión de indicador de NFkB para expresar cinco copias del elemento

de respuesta a NFκB bajo un promotor mínimo y en el sentido de 5' de un indicador de luciferasa de luciérnaga (luc2, Promega), junto con un gen de resistencia a blasticidina. Cada plásmido de expresión junto con los plásmidos de empaquetamiento (System Biosciences) se cotransfectaron en HEK293T-17 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se recogió el sobrenadante que contenía partículas virales 48 h tras la transfección y se usó para transducir células Jurkat. Se cultivaron células Jurkat transducidas viralmente en medios de cultivo más antibióticos de selección, blasticidina 5 µg/ml y puomicina 5 µg/ml a partir de 48 h tras la transducción. Se generó la línea celular Jurkat OX40 humano NFκB usando procedimientos similares, excepto porque se transdujo un vector lentiviral diseñado para expresar de manera constitutiva OX40 humano . OX40L de ratón se une a OX40 humano; por tanto, puede usarse una línea celular Jurkat con indicador de NFκB luciferasa que expresa OX40 humano para evaluar la actividad de proteínas de fusión de OX40L murino.

20 ELISA

Se recubrieron con glicoproteínas de GITR-Fc y OX40-Fc de ratón (R&D Systems) durante la noche a 1 µg/ml en PBS placas de 96 pocillos (Greiner). Se lavaron las placas con PBST (PBS + Tween-20 al 0.01 %), se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía BSA al 1 % (p/v), y se lavaron en PBST de nuevo. Se añadieron a los pocillos veinticinco microlitros de GITRL de ratón 1 µg/ml o FP de OX40L diluidos en tampón de ensayo [PBS + albúmina sérica bovina (BSA) al 1 %], y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 3 lavados, se añadieron a cada pocillo 25 µl de anticuerpo anti-Fc de ratón

conjugado con peroxidasa del rábano 1 µg/ml (Sigma) diluido en tampón de ensayo, y se incubaron las placas durante 1 hora. Tras la incubación, se lavaron las placas 3 veces en PBST, se añadieron 25 µl de disolución de sustrato tetrametilbencidina (KPL) a cada pocillo, y se incubaron las placas durante 5 minutos. Tras la incubación se añadieron 15 µl de disolución de detención de ácido sulfúrico 0.5 M a todos los pocillos. Se midió la densidad óptica a 450 nm usando un lector de placas EnVision (PerkinElmer).

10 Estadística

Se llevó a cabo todo el análisis estadístico usando el software estadístico Prism versión 6.

Resultados

Potencia de FP de mGITRL *in vitro*

15 Con el fin de investigar los efectos de la señalización del receptor GITR sobre la activación de células inmunitarias y la actividad antitumoral *in vivo*, se generó una FP de mGITRL tetramérica. Se diseñó la FP de mGITRL para provocar unión ávida al receptor GITR y FcγR sobre células efectoras.

20 La molécula consistía, desde el extremo N- al C-terminal, en una región de fragmento cristalizable (Fc) de una inmunoglobulina G (IgG), un dominio de cremallera de isoleucina (ILZ) y el dominio extracelular (unión a GITR) (ECD) de ligando de GITR murino (figura 30A). Cuando se

25 visualizó la FP de mGITRL desnaturalizada purificada mediante SDS-PAGE (figura 30B), demostró un alto grado de homogeneidad y un peso molecular que era ligeramente superior al peso molecular esperado de 48 kDa debido presumiblemente a la glicosilación de los dominios de Fc y mGITRL. Tanto FP

30 de mGITRL mIgG2a como un anticuerpo anti-GITR (DTA-1) podían inducir señalización de NF-κB en un ensayo celular de gen

indicador de NF κ B dependiente de GITR, mientras que una FP de OX40L murino mIgG1 (FP de mOX40L mIgG1), y un control de isotipo carecían de cualquier señal detectable (figura 30C). De manera importante, la FP de mGITRL tetramérica demostró una CE₅₀ de 0.05 nM con respecto al agonismo de GITR en este ensayo, que era casi 50 veces más potente que DTA-1, que demostró una CE₅₀ de 2.31 nM.

Actividad antitumoral de FP de mGITRL modificada por ingeniería genética con un Fc de mIgG2a

Estudios previos han mostrado que se requieren Fc γ R activantes para la actividad antitumoral del anticuerpo DTA-1, y que la actividad antitumoral de este anticuerpo aumenta cuando porta una Fc de mIgG2a, en comparación con un Fc de rIgG2b o un Fc mutante N297A que carece de unión a Fc γ R. Para determinar el impacto del isotipo de Fc sobre la actividad antitumoral de FP de mGITRL, se trataron ratones que llevan tumor CT26 con FP de mGITRL con un isotipo de Fc de mIgG2a o mIgG1 Fc. El tratamiento de ratones con 5 ó 10 mg/kg de cualquier isotipo dio como resultado una notable actividad antitumoral en comparación con controles tratados con solución salina, tal como se evidencia por un volumen tumoral reducido (figura 31A). Sin embargo, la actividad antitumoral global era mayor tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a (11/20 regresiones totales), en contraposición a FP de mGITRL mIgG1 (7/20 regresiones totales, figura 31A).

Para determinar si esta diferencia en la actividad de las variantes de Fc se debía a una diferencia en su capacidad para mediar en la activación de células T y acontecimientos posteriores aguas abajo del agonismo de GITR, se evaluó la proliferación de poblaciones de células T esplénicas usando análisis de citometría de flujo de la expresión de Ki67 en

células CD4⁺ FoxP3⁻ (células T efectoras), CD8⁺ (células T efectoras) y CD4⁺ FoxP3⁺ (T-reg). Ambos isotipos de la FP de mGITRL provocaron un aumento significativo comparable en la proliferación de los tres subconjuntos de células T esplénicas en comparación con controles de solución salina (figura 31B). La población de células T-reg esplénicas presentó la expresión más alta de Ki67 tras el tratamiento (el 53.95 % $\pm$ 0.75 tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a y el 58.43 % $\pm$ 1.26 tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG1), seguido por células T CD4⁺ FoxP3⁻ (el 9.52 % $\pm$ 0.58 con FP de mGITRL mIgG1 y el 10.89 % $\pm$ 0.56 con FP de mGITRL mIgG2a y el 7.60 % $\pm$ 0.27 con FP de mGITRL mIgG1) y CD8⁺ (el 7.60 % $\pm$ 0.27 con FP de mGITRL mIgG2a y el 7.79 $\pm$ 0.43 con FP de mGITRL mIgG1). Estos datos sugirieron que la activación de células T sola no podía explicar las diferencias observadas en la inmunidad antitumoral entre los isotipos de Fc de mIgG1 y mIgG2a Fc de la FP de mGITRL.

Se investigó a continuación si cambios intratumorales en poblaciones de células T podrían explicar el aumento de la actividad antitumoral observado con las variantes mIgG2a frente a mIgG1 de FP de mGITRL. El tratamiento de ratones con FP de mGITRL mIgG2a indujo una disminución significativa en la frecuencia de T-reg intratumorales desde el 13.31 % $\pm$ 1.06 en animales tratados con solución salina hasta el 3.60 % $\pm$ 0.79 con un valor de significación de $p < 0.0001$ (figura 31C y figura. 32) y un aumento posterior en las razones de CD8:T-reg (figura. 31D) y CD4:T-reg (figura 32B) en comparación con animales tratados con control. En cambio, la disminución en T-reg intratumorales no era evidente para la variante de Fc de mIgG1 de FP de mGITRL (el 12.95 % $\pm$ 1.34). Tampoco hubo evidencia de una disminución

significativa en la proporción de células T CD4⁺ Foxp3⁻ intratumorales tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a (el 8.64 % $\pm$ 1.21) en comparación con animales de control (el 13.01 % $\pm$ 1.12), pero esto no era hasta el punto observado para T-regs. El agotamiento preferente de T-regs por FP de mGITRL mIgG2a puede atribuirse probablemente a la alta expresión de GITR en T-regs intratumorales (figura 31E) y la alta expresión de Fc γ R activantes en el microentorno tumoral de tumores CT26, y sugiere la eliminación por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). Conjuntamente estos datos sugieren que para una actividad antitumoral óptima tras el tratamiento con FP de mGITRL, se requiere la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ periféricas coincidente con una disminución en T-regs intratumorales.

Actividad antitumoral mediada por FP de mGITRL mIgG2a

Debido a que FP de mGITRL mIgG2a provocó un aumento de la actividad antitumoral en comparación con la FP de mGITRL mIgG1, se caracterizó a continuación cómo los niveles de exposición y el tiempo de exposición de la FP de mGITRL mIgG2a en la sangre se relacionada con respuestas antitumorales en ratones que llevan tumor CT26. En primer lugar, se midió el efecto de un nivel de dosis creciente sobre el crecimiento tumoral tratando ratones con una única dosis control de solución salina o FP de mGITRL mIgG2a 0.2, 1 ó 5 mg/kg . El tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a 0.2 mg/kg dio como resultado sólo 1/10 regresiones completas, sin embargo no hubo evidencia de un aumento dependiente de la dosis en la inmunidad antitumoral cuando la dosis se elevó desde 0.2 hasta 1 mg/kg o 5 mg/kg, lo que dio como resultado 6/10 y 9/10 regresiones respectivamente (figura 33A). Además,

la actividad antitumoral también pudo mejorarse aumentando la frecuencia de dosificación de 0.2 mg/kg hasta una vez al día (Q1D) o una vez a la semana (Q1W) (figura 33B). Estos resultados indican que había un nivel de exposición requerido de FP de mGITRL mIgG2a necesario para inducir una actividad antitumoral óptima, tal como se definió mediante una regresión tumoral completa y un volumen tumoral residual mínimo, que se alcanzó sólo cuando se usó el programa de Q1D. Para determinar este umbral se midió la concentración de FP de mGITRL mIgG2a en la sangre de ratones tratados con 2 niveles de dosis alternativos de FP de mGITRL y luego se incorporaron estos resultados en un modelo PK. Basándose en este modelo, se calculó que la concentración en sangre de FP de mGITRL mIgG2a sostenida mediante el programa de Q1D, y que se consideraba que se requería para mantener una actividad antitumoral óptima, era igual a o mayor de 1 µg/ml (figura 33C).

A continuación se investigaron biomarcadores PD de la actividad antitumoral tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a. Se usó la expresión de Ki67 para evaluar la proliferación, mientras que también se analizaron ICOS, PD-1 y OX40, que se sabe que se expresan todos en células T tras la activación. El aumento de la exposición de FP de mGITRL mIgG2a, o bien aumentando el nivel de dosis o bien aumentando la frecuencia de administración, dio como resultado aumentos progresivamente mayores en la frecuencia de células T CD4⁺ periféricas que expresan Ki67, ICOS, PD-1 y OX40 (figura 34A-D).

Análisis comparativos de la actividad antitumoral de FP de mGITRL y FP de mOX40L

Con el fin de comprender el mecanismo relativo de GITR, en contraposición a la selección como diana de OX40, se compararon directamente las actividades antitumorales de la FP de mGITRL con FP de mOX40L, que comprende una estructura proteica similar, no reacciona de manera cruzada con el receptor GITR y puede incluir expresión de NFκB en un ensayo celular de indicador de OX40 (figuras 35A y B).

Se trataron ratones que llevan tumor CT26 dos veces a la semana con FP de mGITRL o FP de mOX40L 5 mg/kg de los isotipos de Fc de o bien mIgG1 o bien mIgG2a y se midió el crecimiento tumoral. Tal como se observa con FP de mGITRL, la actividad antitumoral observada con FP de mOX40L era mayor tras el tratamiento con el isotipo de mIgG2a (9/10 regresiones) que con el de mIgG1 (1/10 regresiones); figura. 36A). Sin embargo, el tratamiento con la FP de mGITRL mIgG1 (6/10 regresiones) provocó un aumento de la actividad antitumoral en relación con la observada tras el tratamiento con FP de mOX40L mIgG1 y era marginalmente mejor con un isotipo de mIgG2a (10/10) en comparación con FP de mOX40L mIgG2a (figura 36A). Se observó un agotamiento similar en Tregs intratumorales tras el tratamiento con tanto FP de mGITRL como FP de mOX40L con isotipos de Fc de mIgG2a, pero esto no era evidente para isotipos de Fc de mIgG1 de cualquier molécula (figura 5B). Estos datos indican que el isotipo de mIgG2a es superior al de mIgG1 para inducir actividad antitumoral de agonistas de tanto GITR como OX40 en ratones que llevan tumor CT26.

Estudios de combinación de FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1

Dada la regulación por incremento del receptor de OX40 en células T CD4⁺ tras el tratamiento con FP de mGITRL mIgG2a

(figura 34D), se investigó adicionalmente el potencial para maximizar la activación de células T. Se usaron FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1 para evaluar los posibles beneficios de combinar agentes que seleccionan como diana las rutas de GITR y OX40.

El tratamiento bisemanal con la combinación de FP de mGITRL mIgG2a y FP de mOX40L mIgG1 dio como resultado una expresión significativamente aumentada de Ki67 en células T CD4⁺ (el 29.16 % $\pm$ 1.51) y CD8⁺ esplénicas (el 24.4 % $\pm$ 0.87) en comparación con controles de solución salina (el 7.82 % $\pm$ 0.30 y el 9.22 % $\pm$ 0.31) o tratamiento con cualquier monoterapia (el 14.2 % $\pm$ 0.45 y el 15.52 % $\pm$ 0.66 para células T CD4 y CD8 tratadas con FP de mGITRL y el 17.02 % $\pm$ 0.49 y el 16.22 % $\pm$ 1.22 para células T CD4 y CD8 tratadas con FP de mOX40L; figura 37A), mostrando un efecto aditivo de la combinación de ambas moléculas. Análisis adicionales de las poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ esplénicas mostraron que el tratamiento de combinación aumentó la frecuencia de tanto el compartimento de memoria efectos CD4⁺ y CD8⁺, definido como CD44⁺ y CD62^{lo} (figura 37B) como la población de memoria central CD4⁺, definida como CD44⁺ y CD62⁺ (figura 37C) por encima del tratamiento de monoterapia. La expresión de los factores de transcripción T-bet (figura 37D) y Eomes (figura 37E) que han mostrado redundancia en la producción de IFN γ y citotoxicidad en célula T CD8⁺ y tienen también papeles en la diferenciación de Th1, también aumentó en un mayor grado en células T CD4⁺ y CD8⁺ durante la combinación que con cualquier monoterapia. Una diferencia mecanística entre las rutas de GITR y OX40 era la expresión significativamente superior de T-bet y Eomes en células T

CD4⁺ en animales tratados con FP de mOX40L mIgG1 en comparación con animales tratados con FP de mGITRL mIgG2a.

Basándose en estos hallazgos, se determinó el efecto de combinar FP de mGITRL mIgG2a con FP de mOX40L mIgG1 sobre el crecimiento tumoral. Se investigó a continuación si el tratamiento de ratones con FP de mOX40L mIgG1 podría mejorarse adicionalmente mediante combinación con una única dosis subóptima de FP de mGITRL mIgG2a. El tratamiento con monoterapia de FP de mOX40L mIgG1 indujo 5/10 regresiones, el tratamiento con monoterapia de FP de mGITRL mIgG2a indujo 3/10 regresiones, pero la combinación de tanto FP de mGITRL mIgG2a como FP de mOX40L mIgG1 dio como resultado una actividad antitumoral potenciada mostrando 8/10 regresiones (figura 38A).

Dado que el tratamiento de monoterapia con FP de mGITRL mIgG2a al altas dosis indujo regresión tumoral completa en la mayoría de los ratones en el modelo de CT26, se investigó la combinación de altas dosis de FP de mOX40L mIgG1 y FP de mGITRL mIgG2a para lograr un beneficio aumentado en un modelo de B16F10-Luc 2. La dosificación con cualquier monoterapia no indujo ninguna regresión tumoral en este modelo, sin embargo la combinación de ambas moléculas dio como resultado una actividad antitumoral mejorada; un retraso en el crecimiento tumoral y la supervivencia aumentó en comparación con el tratamiento de monoterapia (figura 38B y figura 39).

EJEMPLO 7: Agente de sensibilización de células T en combinación con FP de mGITRL

Materiales y métodos

Líneas celulares y reactivos

Se obtuvo la línea tumoral TC-1 de la ATCC (n.º de cat. CRL 6475, Manassas, VA) y se mantuvo en DMEM + FBS al 10% + penicilina/estreptomicina al 1%. Se obtuvo la línea tumoral CT26 de la ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%. Se adquirieron los anticuerpos de isotipo y DTA-1 de Bio X Cell (West Lebanon, NH).

SLP E7 y vacunación

Se sintetizó el péptido largo sintético (SLP) E7 que consiste en la secuencia de HPV16-E7 de 45 meros SSEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVD (SEQ ID NO: 57) por New England Peptide (Gardner, MA). Se dosificó SLP E7 a 10 ó 3.3 µg y se formuló con 20 µg de CpG ODN 2395 (TriLink, San Diego, CA) en Addavax (Life Technologies, Carlsbad, CA) y PBS en un volumen total de 50 µl. Se administraron vacunaciones por vía subcutánea en la superficie dorsal de la base de la cola.

Modelos tumorales

Los experimentos con TC-1 usaron ratones C57BL/6 hembra (n.º de cat. 000664), ratones obtenidos de Jackson Labs (Bar Harbor, ME). Los experimentos con CT26 usaron ratones Balb/c hembra obtenidos de Envigo (Frederick, MD). Los ratones tenían entre 6 y 8 semanas de edad en el momento de la implantación del tumor. Se realizaron todos los experimentos con animales según directrices establecidas por el Comité institucional de cuidado y uso de animales. Para la implantación del tumor TC-1, se implantaron por vía subcutánea 2×10^4 células TC-1 viable por vía subcutánea en la almohadilla plantar trasera izquierda. Para la implantación del tumor CT26, se implantaron 5×10^5 células en el costado derecho. Se evaluó el crecimiento tumoral

mediante medición directa con calibres. Se recogieron mediciones bidireccionales cada 2-4 días, y se calculó el volumen tumoral usando $\text{volumen} = (\text{longitud} \cdot \text{anchura}^2)/2$. Se permitió que los tumores se desarrollaran durante 6-14 días y luego se aleatorizaron los ratones que llevaban tumor a grupos de tratamiento mediante el volumen tumoral. Se sacrificaron los ratones cuando el tumor primario excedió 1000 mm³ para TC-1/almohadilla plantar y 2000mm³ para CT26/costado según el protocolo del IACUC. Para estudios PD, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tumores y los bazos, se tritularon a través de un filtro de 70 µm (Corning™, Corning, NY), y se procesaron para dar una suspensión de células individuales.

Respuestas funcionales de células T y citometría de flujo

Para estimulaciones específicas de antígeno, se sembraron en placa 1-2x10⁶ células vivas por pocillo con 1 µg de secuencia peptídica de AH1 SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 56) (Anaspec, Fremont, CA) o 10 µg de de secuencia de péptido E7 RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 58) (Anaspec) e inhibidor del transporte de proteínas (Ebioscience, Santa Clara, CA). Tras 5 horas, se tiñeron las células. Para todas las tinciones el orden de tinción fue azul vivo/muerto (Life Tech), proteínas extracelulares, kit Fix/Perm de FOXP3 (Ebioscience), y seguido por citocinas intracelulares. Los anticuerpos incluían CD45 (clon 30-F11), CD4 (clon RM4-5) CD8 (clon 53-6.7), GITR (clon DTA-1), IFNgamma (clon XMG 1.2), TNFalpha (clon MP6-XT22), FOXP3 (clon FJK-16s), KI-67 (clon SolA15). Se adquirió el dextrámero H2-Db E7 cargado con RAHYNIVTF se adquirió de Immudex (Fairfax, VA) y se siguió su protocolo para la tinción. Se ejecutaron todas las muestras en un

instrumento o bien LSR-II o bien Fortessa (BD San Jose, CA). Se analizaron todos los datos usando FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

FP de mGITRL requiere células específicas de antígeno

5 CT26 es un modelo tumoral muy inmunogénico con altos niveles de CTL basales y CD45 intratumorales. Se ha mostrado que CT26 autosensibiliza bajos niveles de células T específicas de AH1. Para evaluar si FP de mGITRL podría conducir a la generación *de novo* de respuestas específicas

10 de antígeno se usó el modelo tumoral TC-1 transformado con E6/E7. Este modelo tiene epítomos de células T CD8 conocidos esa respuesta inmunitaria específica de E7 puede conducir a protección frente a tumores que portan E7. Se implantaron células tumorales TC-1 en la almohadilla plantar de ratones

15 C57/b6. Se midieron los ratones en el día 14, se aleatorizaron basándose en su tamaño tumoral y se trataron con FP de mGITRL IgG2a a 1 mg/kg, 5 mg/kg y 20 mg/kg (figura 43A). Hubo un retraso o una inhibición del crecimiento tumoral a cualquier dosis sometida a prueba (figura 43B). El

20 día 24, se sacrificaron subconjuntos de ratones no tratados y tratados con 1 mg/kg y se recogieron los bazo y tumores. Se evaluaron poblaciones de células T y respuestas específicas de antígeno E7. Estaban presentes niveles de GITR en las células T CD4 y CD8, y eran significativamente

25 superiores en el tumor (figura 43C). Sin sensibilización con E7, FP de mGITRL no pudo retrasar el crecimiento tumoral de TC-1 o generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

FP de mGITRL expande células T CD8 específicas de antígeno sensibilizadas

30 Se ha mostrado que la vacunación con vacunas de ADN es eficaz en la generación de respuestas específicas de E7 que

conducen a la prevención e inhibición del crecimiento tumoral del modelo tumoral TC-1. Este estudio plantea la hipótesis de que FP de mGITRL puede necesitar células T específicas de antígeno sensibilizada para dirigir una respuesta antitumoral. Para generar esta respuesta, se vacunaron ratones C57/b6 sin tratamiento previo con 10 ug de un péptido largo sintético (SLP) E7 con CpG (addavax) en la base de la cola. Durante este tiempo se trataron los ratones con 3 dosis de FP de mGITRL IgG2a. Tras 7 días, se extrajeron esplenocitos y se evaluaron las células T para determinar su especificidad de antígeno con un dextrámero de E7 (figura 44A). No se observaron diferencias en los porcentajes de CD4 y CD8, pero se observó un gran aumento en células específicas de antígeno cuando se trataron con FP de mGITRL (figura 44 B-D). Adicionalmente, se evaluaron los niveles de GITR en ratones vacunados solos, las células Dex+ específicas de antígeno tenían una MFI de GITR superior a las células T Dex- CD8 (figura 44E-F). Se planteó la hipótesis de que esta diferencia sería incluso superior en ratones con tumor, ya que los niveles de GITR parecen ser los más altos en el microentorno tumoral. Se les implantó a ratones C57/b6 tumores TC-1 y se vacunaron con SLP E7/CpG (Addavax) (figura 44G). Se observó la sensibilización de células E7 específicas de antígeno tal como se mide mediante dextrámero tanto en bazo como en el tumor (figura 44H-I). Las células que se teñían de manera positiva con el dextrámero eran también superiores para GITR tanto en bazo como en el tumor (figura 44J-K). SLP E7 podría sensibiliza satisfactoriamente una respuesta específica de E7 con o sin la presencia de tumor y las células específicas de antígeno que se sensibilizaron

expresaban niveles superiores de GITR que otras células T CD8.

5 FP de mGITRL puede expandir células específicas de antígeno sensibilizadas mediante SLP E7 y generar una respuesta inmunitaria protectora frente a tumores TC-1

Para evaluar si FP de mGITRL podría expandir una respuesta específica de E7 a células tumorales TC-1, se implantaron células tumorales TC-1 en la almohadilla plantar y se aleatorizaron los ratones por el volumen tumoral el día 10 14. Una única dosis de SLP E7 administrada con CpG (Addavax) en la base de la cola con FP de mGITRL IgG2a durante cuatro dosis comenzando el día de la vacunación (figura 45A). Se incluyeron dos ramas del estudio, un grupo de TGI (inhibición del crecimiento tumoral) (n=10) y un grupo de PD 15 (farmacodinámica) (n=5). Los tumores de ratones control crecieron rápidamente y todos los ratones murieron con una mediana de supervivencia de 27 días. SLP E7 solo proporcionó una ventaja de supervivencia a ratones con tumores TC-1 con 1 de 10 ratones vivos y libres de tumor el día 85 y una 20 mediana de supervivencia de 46.5 días (figura 45B). SLP E7 + FP de mGITRL retrasó significativamente el crecimiento tumoral con 3/10 ratones libres de tumor y 5/10 vivos el día 85 y una mediana de supervivencia de 80.5 días (figura 45C-D). La vacunación sola también proporcionó un retraso en la 25 progresión tumoral y la adición de FP de mGITRL encima retrasa adicionalmente la progresión. Se planteó la hipótesis de que esto se produjo debido a la expansión por selección de CD8 específicas de tumor. El día 21, se sacrificó el grupo de ratones PD y se recogió el bazo y el 30 tumor para análisis de farmacodinámica. Se agruparon los tumores de la almohadilla plantar debido a la cantidad de

tejido recogido (figura 45E). La vacunación sola o en combinación con FP de mGITRL dio como resultado un aumento significativo en células CD45+ en el tumor (figura 45F). Para evaluar la función específica de antígeno, se reestimularon suspensiones de células individuales de tumor o bazo con 1 ug/ml de péptido E7. La vacunación proporcionó un aumento basal en células específicas de antígeno y la adición de FP de mGITRL reforzó adicionalmente esto hasta niveles superiores tanto en el bazo como en el tumor (figura 45G). FP de mGITRL parecía no agotar Tregs en el bazo y sólo podía agotar Tregs en el tumor cuando estaba presente la vacuna de SLP E7 (figura 45G).

EJEMPLO 8: Secuencias de nucleótidos y proteína.

En la tabla 6-1 se proporcionan versiones anotadas de secuencias de nucleótidos y proteína divulgadas en la presente.

Tabla 6-1.

SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de GITRL TN de longitud completa	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSI V MLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLP SKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG QVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKS K IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYW GIILLANPQFIS
2	Secuencia de aminoácidos de variante de GITRL de longitud completa	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSI X ₁ X ₂ LLFLCSFSWLIFIFLQLX ₃ TAKEPCMAKX ₄ GP LX ₅ X ₆ KWQX ₇ ASSEPX ₈ CX ₉ NKVX ₁₀ DWKLEILQNG LYLIYX ₁₁ QVAPNANYNDVAX ₁₂ FEVX ₁₃ LYKNKD X ₁₄ IQTLTNKS KIQNVGGTYELHVGDTIDLIFX ₁₅ SEHQX ₁₆ LKX ₁₇ NTYWGX ₁₈ X ₁₉ LLANPQFIS

5			X ₁ = Gly o Val, X ₂ = Thr, Met, o Val; X ₃ = Glu o Ala, X ₄ = Ser o Phe, X ₅ =Thr o Pro, X ₆ =Leu o Ser, X ₇ =Thr o Met, X ₈ = Leu o Pro, X ₉ = Met o Val, X ₁₀ = Thr, Phe, o Ser, X ₁₁ = Ser o Gly, X ₁₂ = Arg o Pro, X ₁₃ = Trp o Arg, X ₁₄ = Leu o Met, X ₁₅ = Ser o Asn, X ₁₆ =Phe o Val, X ₁₇ =cualquier aminoácido distinto de Asn, X ₁₈ = Val o Ile, y X ₁₉ =Leu o Ile
10	3	Secuencia de aminoácidos de variante de GITRL N161X de longitud completa	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIV MLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLP SKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG QVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSK IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLK X NTYW GIILLANPQFIS X es cualquier aminoácido excepto Asn.
15	4	Secuencia de aminoácidos de variante de GITRL N161D de longitud completa	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIV MLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLP SKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG QVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSK IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLK D NTYW GIILLANPQFIS
20	5	Secuencia de ácido nucleico que codifica una subunidad de FP de GITRL IgG1 madura	CTGGACAAGACCCATACCTGTCCTCCATGCCCT GCCCCGAACTGCTGGGAGGCCCTTCTGTGTTC CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATG ATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAG TTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAC
25			
30			

	(sin región codificante de péptido señal)	AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTAC AACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT 5 GCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTG CCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTAC CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAAC 10 GGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTG TACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGG CAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG 15 TCCCTGTCCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGGCGGA GGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGA TCTGGGGGCGGAGGTAGCGGAGGTGGTGGCTCT GTGTCTCGGCTGGAAGAGGAAATGCGGAAGCTG CAGGCCACCGTGCAGGAACTGCAGAAGCGGCTG 20 GACAGACTGGAAGAGACAGTGCAGGCTAAGGGC GGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCAAAGAACCC TGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCCAAG TGGCAGATGGCCTCTTCCGAGCCCCCTGCGTG AACAAAGTGTCCGACTGGAAGCTGGAATCCTG 25 CAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAGGTG GCCCCAACGCCAACTACAACGATGTGGCCCCC TTCGAAGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATG ATCCAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATCCAG AACGTGGGCGGCACCTACGAGCTGCACGTGGGC 30 GATACCATCGACCTGATCTTCAACTCCGAGCAC
--	---	---

		CAGGTGCTGAAGGACAACACCTACTGGGGCATC ATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCATCTCC
5	6	Secuencia de aminoácidos de una subunidad de FP de GITRL IgG1 madura (el ligador 1 y el ligador 2 están subrayados)
10		LDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVSRLEEEMRKL QATVQELQKRLDRLEETVQAKGGGQLETAKEP CMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEIL QNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDM IQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEH QVLK D NTYWGIILLANPQFIS
20	7	Ácido nucleico que codifica una subunidad de FP de GITRL IgG1 precursora (incluyendo la región codificante de péptido señal)
25		ATGGCCATCATCTACCTGATCCTGCTGTTCAACC GCCGTGCGGGGCCTGGACAAGACCCATACCTGT CCTCCATGCCCTGCCCCGAAGTCTGGGAGGC CCTTCTGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATC TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAG GTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTG
30		

5			AAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTAC AAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGC TCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGAC AAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCC TGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGA AAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTCT GGTGGTGGCGGATCTGGGGGCGGAGGTAGCGGA GGTGGTGGCTCTGTGTCTCGGCTGGAAGAGGAA ATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGTGCAGGAAGTG CAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACAGTG CAGGCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACA GCCAAAGAACCCTGCATGGCCAAGTTCCGCCCC CTGCCTTCCAAGTGGCAGATGGCCTCTTCCGAG CCCCCTGCGTGAACAAAGTGTCCGACTGGAAG CTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGATC TACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTACAAC GATGTGGCCCCCTTCGAAGTGCGGCTGTACAAG AACAAGGACATGATCCAGACCCTGACCAACAAG AGCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTACGAG CTGCACGTGGGCGATACCATCGACCTGATCTTC AACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAACACC TACTGGGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAG TTCATCTCC
30	8	Secuencia de aminoácidos de una subunidad de FP de GITRL IgG1 FP precursora	MAIIYLILLFTAVRGLDKHTHCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

5	(incluyendo la región codificante de péptido señal; el ligador 1 y ligador 2 están subrayados)	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSVSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETV QAKGGGQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSE PPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYN DVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSQIQNVGGETYE LHVGDITIDLIFNSEHQVLKDNTYWGIIILLANPQ FIS
10	9 Secuencia de aminoácidos de coronina 1a humana (hCor1a)	MSRQVVRSSKFRHVFGQPAKADQCYEDVRVSQT TWDSGFC AVNPKFVALICEASGGGAFLVLPLGKTGRVDKN APTVCGHTAPVLDIAWCPHNDNVIASGSEDCTV MVWEIPDGGMLPLREPVTLEGHTKRVGIVAW HTTAQNVLLSAGCDNVIMVWDVGTGAAMLTGPG EVHPDTIYSVDWSRDGGICTSCRDKRVRIIEP RKGTVVAEKDRPHEGTRPVRAVFVSEGKILTTG FSRMSEKQVALWDTKHLEEPLSLQELDTSSGVL LPFFDPDTNIVYLCGKGDSIRYFEITSEAPFL HYLSMFSSKESQRMGYMPKRGLEVNKCEIARF YKLHERRCEPIAMTVPRKSDLFQEDLYPPTAGP DPALTAEEWLGGRDAGPLLISLKDGYVPPKSRE LRVNRGLDTGRRRAAPEASGTPSSDAVSRLEEE MRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
25	10 Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCor1a consenso	XSRXEEEXRXXQATXQELQKRXRDRLEETVQAK X= Ala, Leu, Ile o Val
30	11 Secuencia de aminoácidos de	VSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK

		dominio de trimerización de hCorla tn	
5	12	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 1	VSRLEEEIIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
10	13	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 2	VSRIEEIIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
15	14	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 3	ISRIEEIIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
20	15	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 4	ISRIEEIIRKIQATVQELQKRLDRLEETVQAK
25	16	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización	ISRIEEIIRKIQATVQELQKRIDRLEETVQAK
30			

	de hCorla variante 5	
5	17	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 6
		ISRIEEEIRKINATVQELQKRIDRLEETVQAK
10	18	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de hCorla variante 7
		ISRIEEEIRKINATIQELQKRIDRLEETVQAK
15	19	Secuencia de aminoácidos de motivo de Gly(4)Ser en donde n=1
		GGGGS
20	20	Secuencia de aminoácidos del ligador 1
		GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
25	21	Secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 usada en la FP de GITRL IgG1 de SEQ ID NO:6
		LDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	22	Secuencia de aminoácidos de
		SGGGGS

		motivo de Ser (Gly ₄ Ser) _n en donde n=1	
5	23	Secuencia de aminoácidos de región de ligador	GGGSGGGSGGGGSAL
10	24	Secuencia de aminoácidos de región de ligador	GGGSGGGSGGGGSA
15	25	Secuencia de aminoácidos de motivo de Gly(4)Ser en donde n=3	GGGSGGGSGGGGS
20	26	Secuencia de aminoácidos de región de ligador	GGGSGGGSGGGG
25	27	Secuencia de aminoácidos de GCN4 pII de levadura	IKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL
30	28	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de matrilina 1 tn	CACESLVKFKQAKVEGLLQALTRKLEAVSKRLAI LENTVV

5	29	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de matrilina 1 variante	CACESLVKFQAKVEGLIQALTRKLEAVSKRIAI LENTVV
10	30	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de DMPK tn	EAEAEVTLRELQEALEEEVLTRQSLSREMEAIR TDNQNFASQLREAEARNRDLEAHVRQLQERMEL LQAE
15	31	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de DMPK variante	IAEIEVTIRELQEAIIEEEVLTRQSLSREIEAIR TDIQNIASQLREIEARIRDLEAHVRQLQERMEL LQAE
20	32	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de langerina tn	ASALNTKIRALQGSLENMSKLLKRQNDILQVVS
25	33	Secuencia de aminoácidos de dominio de trimerización de langerina variante	ISALNTKIRAIQGSLENMSKLIKQNDIIQVVS
30	34	Secuencia de aminoácidos de	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKV SDWKLEILQNGLLILIYGQVAPNANYNDVAPFEV

		dominio extracelular de GITRL TN maduro	RLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTI DLIFNSEHQVLKNNTYWGIILLANPQFIS
5	35	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de variante de GITRL maduro	QL X ₁ TAKEPCMAK X ₂ GPL X ₃ X ₄ KWQ X ₅ ASSE PX ₆ C X ₇ NKV X ₈ DWKLEILQNGLYLIY X ₉ QVAPNANYND V X ₁₀ FEV X ₁₁ LYKNKD X ₁₂ IQTLTNKSKIQNVGG TYELHVGDTIDLIF X ₁₃ SEHQ X ₁₄ LK X ₁₅ NTYW GX ₁ 6X ₁₇ LLANPQFIS X ₁ = Glu o Ala, X ₂ = Ser o Phe, X ₃ =Thr o Pro, X ₄ =Leu o Ser, X ₅ =Thr o Met, X ₆ = Leu o Pro, X ₇ = Met o Val, X ₈ = Thr, Phe o Ser, X ₉ = Ser o Gly, X ₁₀ = Arg o Pro, X ₁₁ = Trp o Arg, X ₁₂ = Leu o Met, X ₁₃ = Ser o Asn, X ₁₄ =Phe o Val, X ₁₅ =cualquier aminoácido distinto de Asn, X ₁₆ = Val o Ile, y X ₁₇ =Leu o Ile
10			
15			
20	36	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de variante de GITRL N161X maduro	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKV SDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEV RLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTI DLIFNSEHQVLK X NTYWGIILLANPQFIS X ES CUALQUIER AMINOÁCIDO EXCEPTO Asn.
25			
30	37	Secuencia de aminoácidos de dominio extracelular de variante de	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKV SDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEV RLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTI DLIFNSEHQVLK D NTYWGIILLANPQFIS

	GITRL N161D maduro	
5	38	Secuencia de aminoácidos de región Fc de IgG1 usada en la FP de GITRL IgG4P (mutación S228P subrayada)
10		ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPSPQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
15	39	Ácido nucleico que codifica una subunidad de FP de GITRL IgG4P madura (sin región codificante de péptido señal)
20		GAGTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCTTGC CCTGCCCCCTGAGTTTCTGGGCGGACCTTCCGTG TTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCAGAGTG CAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAG TTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAA GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCC AAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACA CTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAAC 25 CAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTC TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC AACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTGTACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCAGA 30 TGGCAGGAAGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG

5		AAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCAAGGGCGGC GGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGT GGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGGGGAGGGGGA TCTGTGTCTCGGCTGGAAGAGGAAATGCGGAAG CTGCAGGCCACCGTGCAGGAAGTGCAGAAGCGG CTGGACAGACTGGAAGAGACAGTGCAGGCTAAG GGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCAAAGAA CCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCC AAGTGGCAGATGGCCTCTTCCGAGCCCCCTGC 10 GTGAACAAAGTGTCCGACTGGAAGCTGGAATC CTGCAGAACGGCCTGTACCTGATCTACGGCCAG GTGGCCCCCAACGCCAACTACAACGATGTGGCC CCCTTCGAAGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGAC ATGATCCAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATC 15 CAGAACGTGGGCGGCACCTACGAGCTGCACGTG GGCGATAACCATCGACCTGATCTTCAACTCCGAG CACCAGGTGCTGAAGGACAACACCTACTGGGGC ATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCATCTCC	
20	40	Secuencia de aminoácidos de una subunidad de FP de GITRL IgG4P madura	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 25 NGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGGSVSRLEEEMRK LQATVQELQKRLDRLEETVQAKGGGQLETAKE PCMAKFGLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEI LQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKD 30 MIQTLTNKSKIQNVGTTYELHVGDTIDLIFNSE HQVLKDNTYWGIILLANPQFIS

41	Ácido nucleico que codifica una subunidad de FP de GITRL IgG4P precursora (incluyendo la región codificante de péptido señal)	ATGGCCATCATCTACCTGATCCTGCTGTTTACC GCCGTGCGGGGCGAGTCTAAGTACGGCCCTCCT TGTCTCCTTGCCCTGCCCCTGAGTTTCTGGGC GGACCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAA GATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCC CAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTC GTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTGTACTCCCGCCTGACCGTG GACAAGTCCAGATGGCAGGAAGGCAACGTGTTC TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTG GGCAAGGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGT TCTGGTGGTGGTGGATCTGGTGGCGGAGGAAGT GGGGGAGGGGGATCTGTGTCTCGGCTGGAAGAG GAAATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGTGCAGGAA CTGCAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACA GTGCAGGCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAG ACAGCCAAAGAACCCTGCATGGCCAAGTTCGGC CCCCTGCCTTCCAAGTGGCAGATGGCCTCTTCC GAGCCCCCTGCGTGAACAAAGTGTCCGACTGG
----	--	--

5			AAGCTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTG ATCTACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTAC AACGATGTGGCCCCCTTCGAAGTGCGGCTGTAC AAGAACAAGGACATGATCCAGACCCTGACCAAC AAGAGCAAGATCCAGAACGTGGGCGGCACCTAC GAGCTGCACGTGGGCGATAACCATCGACCTGATC TTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAAC ACCTACTGGGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCC CAGTTCATCTCC
10	42	Secuencia de aminoácidos de una subunidad de FP de GITRL IgG4P precursora (con región codificante de péptido señal)	MAIIYLILLFTAVRGESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSVSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEET VQAKGGGGQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASS EPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANY NDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTY ELHVGDITDLIFNSEHQVLKDNTYWGIILLANP QFIS
25	43	Fragmento triptico de subunidad de polipéptido de FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D	EEQY N STYR
30			

5	44	Fragmento tríptico de subunidad de polipéptido de FP de hGITRL tn y FP de hGITRL N161D	DMIQTLT <u>N</u> K
10	45	Fragmento tríptico de subunidad polipeptídica de FP de hGITRL tn	IQNVGGTYELHVGDITDLIFNSEHQVLK <u>N</u> NTYW GIILLANPQFIS
15	46	Fragmento tríptico de subunidad polipeptídica de FP de hGITRL N161D	<u>D</u> NTYWGIILLANPQFIS
20	47	hGITR (GITR humano)	MAQHGMGAFRALCGLALLCALSIGQRPTGGPG CGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEEC CSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQG VQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT DCTQFGFLTVFPGNKTHNAVCPGSPPAEPLGW LTVVLLAVAACVLLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMW PRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEERGERSAE EKGR LGDLWV
25			
30	48	FP de mGITRL	MAIIYLILLFTAVRGIKPCPPCKCPAPNLLGGP SVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS ALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTIS

5			KPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH TTKSFSRTPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLGG GGIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDG KLKILQSGTYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFVVQ IYKKNDVLQTLMNDFQILPIGGVYELHAGDNIY LKFN SKDHIQKTNTYWGII LMPDLPFIS
10	49	FP de mOX40L	VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFDDVEVHT AQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG 15 QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGKRLDQ DKIEALSNKVQQLERSIGLKDLAMADLEQKVSE LEVSTSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISS YKNEYQTMEVQNN SVVIKCDGLYIIYLKGSFFQ 20 EVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVAS LAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQL TPGYCAPEGSYHSTVNQVPL
25	50	MEDI6383	LATDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKE 30 LLGGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKK LIGERGHGGGSNSQVSHRYPRFQSIKVQFTEYK

		KEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVN SLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGE LILIHQNPGEFCVL
5	51	MEDI0562 VH
10		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGY WNWIRKHPGKLEYIGYISYNGITYHNPSLKSR ITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYK YDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK 15
		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	52	MEDI0562 VL
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL NWKYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH 25
		QGLSSPVTKSFNRGEC
30	53	OX40 humana
		MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQNTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCTATQDTCRCR AGTQPLDSYK

5			PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQGPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI
10	54	Ligando de OX40 humana	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQG LGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQF TEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDG FYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKV RSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHV NGGELILIHQNPGEFCVL
15	55	FP de mOX40L Y182A	VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHT AQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWE AGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGKRLDQ DKIEALS NKVQQLERSIGLKD LAMADLEQKVSE LEVSTSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISS YKNEYQTM EVQNN SVVIKCDGLYIIYLKGSFFQ EVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVAS LAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQL TPGACAPEGSYHSTVNQVPL
20			
25	56	Péptido de AH1	SPSYVYHQF
30	57	Péptido largo sintético (SLP) E7	SSEEEDEIDGPAGQAE PDRAHYNIVTFCKCDS TLRLCVQSTHVD
	58	Péptido de E7	RAHYNIVTF

La amplitud y el alcance de la presente divulgación no deben estar limitadas por ninguna de las realizaciones ilustrativas descritas anteriormente, sino que se deben
5 definir únicamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente
10 descripción de la invención.

15

20

25

30