

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

- 5 1. Subunidad polipeptídica de una sola cadena aislada que comprende: 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 la que la subunidad
- 10 polipeptídica puede autoensamblarse para dar una proteína trimérica o una hexamérica.
2. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 1, en la que el dominio de multimerización es un dominio de trimerización.
- 15 3. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 1 ó 2 que comprende, desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal, el dominio de Fc de IgG, seguido por el dominio de multimerización o de trimerización, seguido por el dominio de unión a receptor de GITRL.
- 20 4. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el extremo carboxilo terminal del dominio de Fc de IgG se fusiona con el extremo amino terminal del dominio de multimerización o de trimerización por medio de una primera región de ligador.
- 25 5. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el extremo carboxilo terminal del dominio de multimerización o de trimerización se fusiona con el extremo amino terminal del dominio de unión a receptor de GITRL por medio de una segunda región de
- 30 ligador.

6. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el extremo carboxilo terminal del dominio de Fc de IgG se fusiona directamente con el extremo amino terminal del dominio de multimerización o de trimerización.

7. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 5 ó 6, en la que el dominio de Fc de IgG incluye una región de bisagra de IgG en su extremo amino terminal.

8. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 5 ó 6, en la que la región de bisagra de IgG comprende una mutación que confiere formación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas completos.

9. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 7 u 8, en la que la región de bisagra de IgG comprende una región de bisagra de IgG1, una región de bisagra de IgG4, o variantes de las mismas.

10. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 9, en la que la región de bisagra de IgG4 tiene una mutación de serina a prolina en la posición 228 (S228P) según la numeración EU (IgG4P).

11. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el dominio de Fc de IgG es un dominio de Fc de IgG humano.

12. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o a 6 a 10, en la que el extremo carboxilo terminal del dominio de multimerización o de trimerización se fusiona directamente al extremo amino terminal del dominio de unión a receptor de GITRL.

13. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en la que la primera región de ligador, la segunda región de ligador, o las regiones de

ligador primera y segunda, cuando están presentes, se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en una región de ligador que contiene un motivo (Gly₄)_n, un motivo (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 19), un motivo Ser(Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGSAL (SEQ ID NO: 23), GGGGSGGGGSGGGGSA (SEQ ID NO: 24), y combinaciones de los mismos, en los que n es un número entero positivo seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

10 14. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 13, en la que las regiones de ligador primera y segunda se seleccionan independientemente de un grupo que consiste en GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 25), y GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 26).

15 15. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que la primera región de ligador es GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 20) y la segunda región de ligador es un motivo (Gly₄).

20 16. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el dominio de Fc de IgG comprende un dominio de Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IG4P, o variantes de los mismos.

25 17. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el dominio de Fc de IgG contiene una o más sustituciones de residuos de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en 252Y, 254T, 256E, y combinaciones de las mismas, en la que los residuos se numeran según la numeración EU.

30 18. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que el dominio de Fc de IgG comprende una región CH2.

19. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 18, en la que el dominio de Fc de IgG comprende además una región CH3.

5 20. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 19, en la que el dominio de Fc de IgG comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 21.

10 21. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 19, en la que el dominio de Fc de IgG comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

15 22. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio de una hélice alfa superenrollada, un dominio en cremallera de leucina, o una combinación de los mismos.

20 23. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 22, en la que el dominio de trimerización se deriva de matrilina 1, coronina 1a, cinasa de distrofia miotónica (DMPK), langerina, o una combinación de las mismas.

24. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 23, en la que el dominio de trimerización se deriva de matrilina 1 o coronina 1a.

25 25. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 24, en la que el dominio de trimerización se deriva de coronina 1a.

30 26. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 25, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio de trimerización de coronina 1a que tiene una identidad de secuencia de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 11.

27. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 26, en la que el dominio de trimerización de coronina la comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

5 28. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 26, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio de trimerización de coronina la de SEQ ID NO: 10.

29. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 26, en la que el dominio de trimerización de coronina la comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, SEQ
10 ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, o cualquier combinación o variante de las mismas.

30. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 24, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio
15 de trimerización de matrilina 1 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 28.

31. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 23, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio
20 de trimerización de DMPK que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 30.

32. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 23, en la que el dominio de trimerización comprende un dominio
25 de trimerización de langerina que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 32.

33. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 23, en la que el dominio de trimerización comprende la secuencia
30 de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, SEQ ID N°: 29, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 31, SEQ ID N°: 32 o SEQ ID N°: 33.

34. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 34.

35. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 37 en donde el residuo 161 no es un residuo de asparagilo.

36. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 35, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

37. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 en la que el residuo 161 es un residuo de aspartilo.

38. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 37, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

39. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 38, en la que el dominio de unión a receptor de GITRL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

40. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en la que una proteína hexamérica ensamblada a partir de seis de las subunidades polipeptídicas puede unirse específicamente a GITS humano.

41. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en la que la proteína no está glicosilada.

5 42. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% con SEQ ID NO: 6.

10 43. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 42, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

44. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, en la que la subunidad tiene actividad agonista.

15 45. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, que comprende además un agente heterólogo asociado.

20 46. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 45, en la que el agente heterólogo es un polipéptido heterólogo y se fusiona a la subunidad polipeptídica mediante un enlace peptídico.

25 47. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 46, en la que el polipéptido heterólogo se fusiona con el extremo N-terminal del dominio de Fc de IgG, se fusiona con el extremo C-terminal del dominio de unión a receptor de GITRL, se fusiona con el extremo C-terminal del dominio de Fc de IgG y con el extremo N-terminal del dominio de trimerización, o se fusiona con el extremo C-terminal del dominio de trimerización y con el extremo N-terminal del dominio de unión a receptor de GITRL.

48. Subunidad polipeptídica según la reivindicación 45, en la que el agente heterólogo está químicamente conjugado a la subunidad polipeptídica.

5 49. Subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 45 a 48, en la que el agente heterólogo comprende una molécula citotóxica, un agente estabilizante, un modificador de la respuesta inmunitaria o un agente detectable.

10 50. Proteína trimérica que comprende tres subunidades polipeptídicas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49.

51. Proteína hexamérica que comprende seis subunidades polipeptídicas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49.

15 52. Proteína hexamérica según la reivindicación 51, que puede unirse específicamente a receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) tal como se expresa en células T CD4⁺ o CD8⁺, células B o células NK, en la que las células B o células T CD4⁺ o CD8⁺ se exponen opcionalmente a antígeno, o
20 las células NK se activan opcionalmente, a partir de ser humano, o un primate no humano, opcionalmente un mono cynomolgus, un mono rhesus, o cualquier combinación de los mismos.

25 53. Proteína hexamérica según la reivindicación 52, que puede unirse específicamente a GITR tal como se expresa en células T CD4⁺ o CD8⁺ primarias de ser humano, o un primate no humano, opcionalmente, un mono cynomolgus, un mono rhesus, o cualquier combinación de los mismos.

30 54. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 52 ó 53, en la que las células T CD4⁺ o CD8⁺ se exponen a antígeno.

55. Proteína hexamérica según la reivindicación 51 o la reivindicación 54, en la que la afinidad de unión por GITR humano es de aproximadamente 54 nM a aproximadamente 111 nM tal como se mide mediante ensayo de exclusión cinética.

5 56. Proteína hexamérica según la reivindicación 55, en la que la afinidad de unión es de aproximadamente 82 nM tal como se mide en un ensayo de exclusión cinética (KinExA).

57. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 56, que puede inducir proliferación
10 dependiente de la dosis y liberación de citocinas dependiente de la dosis a partir de células inmunitarias positivas para GITR.

58. Proteína hexamérica según la reivindicación 57, en la que las células inmunitarias positivas para GITR son
15 células T en un ensayo basado en placa.

59. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 52 a 58, en la que las células son células CD4⁺, CD8⁺, NK o B.

60. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59, en la que las células inmunitarias
20 positivas para GITR, células T, CD4⁺, CD8⁺ o células B se exponen a antígeno y/o las células NK se activan.

61. Proteína hexamérica según la reivindicación 60, que puede estimular la proliferación de células T humanas
25 expuestas a antígeno primarias con una CE₅₀ de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.7 nM, tal como se mide mediante incorporación de timidina.

62. Proteína hexamérica según la reivindicación 61, en la que la CE₅₀ es de aproximadamente 0.5 nM.

30 63. Proteína hexamérica según la reivindicación 57, en la que la citocina 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.

5 64. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 63, que puede activar rutas de señalización aguas abajo en células que expresan GITR, opcionalmente en la que la ruta de señalización aguas abajo es la ruta de NF κ B o la ruta de MAPK.

65. Proteína hexamérica según la reivindicación 64, en la que las células que expresan GITR son células T.

10 66. Proteína hexamérica según la reivindicación 64, en la que las células T que expresan GITR son células indicadoras de NF κ B-luciferasa Jurkat que expresan GITR que producen luciferasa en respuesta a la estimulación de la ruta de señalización de NF κ B.

15 67. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 66, en la que la administración de una dosis eficaz a un sujeto que necesita tratamiento del cáncer puede inhibir el crecimiento del tumor en el sujeto.

20 68. Proteína hexamérica según la reivindicación 67, en la que la inhibición del crecimiento tumoral se logra en presencia de células inmunitarias positivas para GITR, opcionalmente células T o células NK.

25 69. Proteína hexamérica según la reivindicación 67 ó 68, en la que el crecimiento tumoral se inhibe 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 un control de isotipo coincidente.

30 70. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 69, en la que la subunidad

polipeptídica comprende un dominio de Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgG4P y puede inducir activación de citocinas y proliferación de células T CD4⁺ o CD8⁺ que expresan GITR a través de unión a GITR, pero no desencadena sustancialmente
5 citotoxicidad dependiente del complemento o dependiente de anticuerpos contra las células T CD4⁺ o CD8⁺.

71. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 69, en la que la subunidad polipeptídica comprende un dominio de Fc de IgG1 y
10 desencadena citotoxicidad dependiente de receptor de Fc contra células que expresan altos niveles de GITR.

72. Proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 69, en la que la subunidad polipeptídica comprende un dominio de Fc de IgG2, IgG3, IgG4
15 o IG4P y puede inducir proliferación de células que expresan GITR a través de unión a GITR.

73. Proteína hexamérica según la reivindicación 71, en la que la citotoxicidad dependiente de receptor de Fc es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o
20 fagocitosis dependiente de anticuerpos.

74. Proteína hexamérica según la reivindicación 71, en la que las células que expresan altos niveles de GITR son células tumorales.

75. Proteína hexamérica según la reivindicación 71, en la que las células que expresan altos niveles de GITR son
25 células T CD4⁺ FOXP3⁺ o células T CD4⁺ FOXP3⁻ expuestas a antígeno.

76. Proteína hexamérica según la reivindicación 71, en la que la proteína hexamérica proporciona una disminución en
30 la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ en comparación con un control.

77. Proteína hexamérica según la reivindicación 71, en la que la proteína hexamérica proporciona una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ dentro de un tumor en comparación con un control.

5 78. Composición que comprende la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77, y un transportador.

79. Polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica la subunidad polipeptídica según una cualquiera de
10 las reivindicaciones 1 a 49, o la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 78.

80. Polinucleótido según la reivindicación 79, en el que el polinucleótido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal que está
15 operativamente unido a la subunidad polipeptídica.

81. Polinucleótido según la reivindicación 80, en el que el ácido nucleico que codifica el péptido señal está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica el extremo amino-terminal del dominio de Fc de IgG de la
20 subunidad polipeptídica.

82. Polinucleótido según la reivindicación 79, que comprende SEQ ID NO: 5.

83. Vector que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 82.

25 84. Célula huésped que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 79 a la reivindicación 82 o el vector según la reivindicación 83.

85. Método de producción de la subunidad polipeptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 49 o la
30 proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77, que comprende cultivar la célula

huésped según la reivindicación 84 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 la proteína hexamérica.

86. Método para promover la supervivencia o proliferación de células NK y/o células T expuestas a antígeno, que comprende poner en contacto las células NK y/o células T expuestas a antígeno con la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77 o la composición según la reivindicación 78, en el que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de las células T y/o células NK.

87. Método de inducción de la liberación de citocinas a partir de células inmunitarias que expresan GITR activado, que comprende poner en contacto estas células con la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77 o la composición según la reivindicación 78, en el que la proteína hexamérica puede unirse específicamente a GITR en la superficie de estas células.

88. Método según la reivindicación 87, en el que la citocina es IFN γ , TNF α , IL-10, GM-CSF, o cualquier combinación de los mismos.

89. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 87 u 88, en el que las células inmunitarias que expresan GITR son células T CD4⁺ expuestas a antígeno, células T CD8⁺ expuestas a antígeno, células NK activadas o una combinación de las mismas.

90. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 86 a 89, en el que las células NK activadas, células T CD4⁺ expuestas a antígeno o CD8⁺ expuestas a antígeno son células

NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ humanas, células NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono cynomolgus, células NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

91. Método de promoción de la activación de células T o
5 células NK, que comprende poner en contacto células T o
células NK con la proteína hexamérica según una cualquiera
de las reivindicaciones 51 a 77 o la composición según la
reivindicación 78 en el que la proteína hexamérica puede
unirse específicamente a GITR en la superficie de las células
10 T o células NK.

92. Método según la reivindicación 91, que comprende
además la reticulación de la proteína hexamérica a través de
la interacción del dominio de Fc con una célula que expresa
FcγR.

93. Método según la reivindicación 92, en el que la
15 célula que expresa FcγR es una células B, un monocito, un
macrófago, una célula mielóide o una célula dendrítica
plasmacitoide, una célula dendrítica folicular, una célula
de Langerhans, una célula endotelial, una célula NK, un
20 neutrófilo, un eosinófilo, una plaqueta, un mastocito, una
célula CD45⁺ procedente de un tumor humano primario o un
ganglio drenante o no drenante de tumor, una célula CD45⁺
procedente de otras estructuras linfoides secundarias o
terciarias, o una combinación de los mismos.

94. Método según una cualquiera de las reivindicaciones
25 91 a 93, en el que la activación de células NK o células T
puede medirse a través de la estimulación de la ruta de
transducción de señales de NFκB o MAPK.

95. Método según una cualquiera de las reivindicaciones
30 91 a 94, en el que las células NK o T son células NK, células

T CD4⁺ expuestas a antígeno, células T CD8⁺ expuestas a antígeno activadas, o una combinación de las mismas.

96. Método según la reivindicación 95, en el que las células NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ son células NK, células T
5 CD4⁺ o CD8⁺ humanas pirmarias, células NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono cynomolgus, células NK, células T CD4⁺ o CD8⁺ de mono rhesus, o una combinación de las mismas.

97. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 86 a 96, en el que la puesta en contacto comprende
10 administrar una cantidad eficaz de la proteína hexamérica o una composición que comprende la proteína hexamérica a un sujeto.

98. Método de tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento
15 una cantidad eficaz de la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77, o la composición según la reivindicación 78.

99. Método según la reivindicación 98, en el que el sujeto es un sujeto humano o un sujeto canino.

20 100. Método según la reivindicación 98, en el que el cáncer es un tumor sólido.

101. Método según la reivindicación 100, en el que el tumor sólido está asociado con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón de células no
25 pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático, melanoma, melanoma uveal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de próstata y cáncer
30 esofágico.

102. Método según la reivindicación 98, en el que el cáncer es un cáncer hematológico.

103. Método según la reivindicación 102, en el que el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en
5 linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica y leucemia mielógena crónica.

104. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 103, en el que la administración de la proteína
10 hexamérica o composición puede inhibir el crecimiento tumoral, puede promover la reducción tumoral, o ambos.

105. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 104, en el que la inhibición del crecimiento tumoral se logra en presencia de células NK o células T.

15 106. Método según la reivindicación 104 o la reivindicación 105, en el que crecimiento tumoral se inhibe 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
20 menos el 98% o el 100% en comparación con la administración de un control de isotipo coincidente que carece de un dominio de unión a receptor de GITRL.

107. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 106, en el que la proteína hexamérica comprende un
25 dominio de Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgG4P y puede inducir proliferación de células inmunitarias que expresan GITR, expuestas a antígeno a través de la unión a GITR, pero no desencadena sustancialmente citotoxicidad dependiente del complemento o dependiente de anticuerpos contra las células
30 inmunitarias activadas.

108. Método según la reivindicación 107, en el que las células inmunitarias que expresan GITR son células T CD4⁺, células NK o células T CD8⁺.

5 109. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 98 a 106, en el que la proteína hexamérica comprende un dominio de Fc de IgG1 y desencadena citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK y/o macrófagos o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos de células que expresan altos niveles de GITR.

10 110. Método según la reivindicación 109, en el que las células que expresan altos niveles de GITR son células tumorales.

15 111. Método según la reivindicación 109, en el que las células que expresan altos niveles de GITR son células T CD4⁺ FOXP3⁺.

112. Método según la reivindicación 111, en el que la proteína hexamérica proporciona una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ en comparación con un control.

20 113. Método según la reivindicación 111, en el que la proteína hexamérica proporciona una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ dentro de un tumor en comparación con un control.

25 114. Método de potenciación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77 o la composición según la reivindicación 78.

30 115. Método según la reivindicación 114, en el que el sujeto es un sujeto humano o un sujeto canino.

116. Método según la reivindicación 115, en el que el sujeto que lo necesita tiene cáncer.

117. Método según la reivindicación 116, en el que el cáncer es un tumor sólido.

5 118. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 114 a 117, en el que el sujeto tiene cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
10 gástrico, cáncer pancreático, melanoma, melanoma uveal, cáncer renal, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (SCCHN), cáncer
15 colorrectal (CRC), cáncer hematológico, o una combinación de los mismos.

119. Método según la reivindicación 118, en el que el cáncer es un cáncer hematológico.

20 120. Método según la reivindicación 119, en el que 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.

25 121. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 114 a 120, en el que la administración de la proteína hexamérica o composición puede inhibir el crecimiento tumoral, puede promover la reducción tumoral, o ambos.

30 122. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 114 a 121, en el que la inhibición del crecimiento tumoral se logra en presencia de células NK o células T.

123. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 121 o 122, en el que crecimiento tumoral se inhibe 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 el 100% en comparación con la administración de un control de isotipo coincidente que carece de un dominio de unión a receptor de GITRL.

124. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 114 a 123, en el que la proteína hexamérica comprende un dominio de Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgG4P y puede inducir proliferación de células inmunitarias activadas, 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 inmunitarias activadas.

125. Método según la reivindicación 124, en el que las células inmunitarias que expresan GITR son células T CD4⁺, células NK o células T CD8⁺.

126. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 114 a 123, en el que la proteína hexamérica comprende un dominio de Fc de IgG1 y desencadena citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK y/o macrófagos o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos de células que expresan altos niveles de GITR.

127. Método según la reivindicación 126, en el que las células que expresan altos niveles de GITR son células tumorales.

128. Método según la reivindicación 126, en el que las células que expresan altos niveles de GITR son células T CD4⁺ FOXP3⁺.

129. Método según la reivindicación 126, en el que la proteína hexamérica proporciona una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ en comparación con un control.

5 130. Método según la reivindicación 126, en el que la proteína hexamérica proporciona una disminución en la frecuencia de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3⁺ dentro de un tumor en comparación con un control.

10 131. Método de tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, que comprende administrar la subunidad polipeptídica de una sola cadena aislada según la reivindicación 1 y un agonista de OX40 al sujeto.

132. Método según la reivindicación 131, en el que el agonista de OX40 es uno o más de una proteína de fusión de 15 ligando de OX40 o anticuerpo anti-OX40.

133. Método según la reivindicación 132, en el que la proteína de fusión de ligando de OX40 es MEDI6383.

134. Método según la reivindicación 132, en el que el anticuerpo anti-OX40 es MEDI0562.

20 135. Método de tratamiento de cáncer en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento una cantidad eficaz de la proteína hexamérica según una cualquiera de las reivindicaciones 51 a 77, o la composición según la reivindicación 78 en combinación con un agente de 25 sensibilización de células T.

136. Método según la reivindicación 136, en el que el agente de sensibilización de células T es el péptido largo sintético (SLP) E7 y más el oligodesoxinucleótido CpG.