

REIVINDICACIONES

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

5 1. Una proteína de fusión que comprende:

 (a) una fusión monocatenaria que comprende tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L), o sus fragmentos, (scCD40L) ligadas covalentemente entre sí mediante conectores peptídicos; y

10 (b) un monómero de Fc,

 donde el scCD40L está ligado covalentemente al monómero de Fc mediante un conector peptídico.

 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, donde las subunidades de CD40L comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de la
15 secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 3.

 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, donde una o más subunidades de CD40L comprenden un residuo de Trp en la posición 74.

20 4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde el residuo de Trp en la posición 74 es una sustitución C→W.

 5. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde una o más subunidades de CD40L comprenden una secuencia de CD40L humano.

25 6. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el scCD40L está ligado al extremo N o al extremo C del monómero de Fc.

 7. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el monómero de Fc comprende una
30 región bisagra.

8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el monómero de Fc comprende una secuencia de Fc humana.

5 9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el monómero de Fc comprende una secuencia de aminoácidos de IgG4 humana.

10 10. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde los conectores peptídicos que ligan covalentemente las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, comprenden de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 aminoácidos.

15 11. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde los conectores peptídicos que ligan covalentemente las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, comprenden de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 aminoácidos.

20 12. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde los conectores peptídicos que ligan covalentemente las subunidades de CD40L, o sus fragmentos, comprenden 9 aminoácidos.

13. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde los conectores peptídicos comprenden uno o más residuos de glicina (Gly) o serina (Ser).

25 14. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el conector es $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 5), donde n es un número entero positivo seleccionado entre 2, 3 y 4; $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 6), donde n se selecciona entre 3, 4 y 5; $\text{Gly}(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 7),
30 donde n se selecciona entre 2, 3 y 4; o $\text{Gly}(\text{Gly}_2\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 8), donde n se selecciona entre 3, 4, 5 y 6.

15. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el conector es la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 2.

5 16. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el scCD40L se pliega en un homotrímero de CD40L.

17. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la proporción de subunidades de CD40L respecto al monómero de Fc es de 3:1.

10 18. Una proteína de fusión que comprende:

una fusión monocatenaria que comprende, del extremo N al extremo C, una primera subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que se liga covalentemente a un primer conector peptídico que tiene la
15 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que se liga covalentemente a una segunda subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que se liga covalentemente a un segundo conector peptídico que tiene la
20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que se liga covalentemente a una tercera subunidad de CD40L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, que se liga covalentemente a un tercer conector peptídico que tiene la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y que se liga covalentemente a un polipéptido de Fc.

25 19. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; la SEQ ID NO: 10; o la SEQ ID NO: 11.

30 20. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde la proteína de fusión aislada

tiene menos de aproximadamente un 10% de agregación durante al menos 3 días a aproximadamente 21 °C o más.

21. La proteína de fusión de la reivindicación 20, donde la proteína de fusión aislada tiene menos de aproximadamente
5 un 1% de agregación durante al menos 7 días o más a aproximadamente 21 °C.

22. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde la proteína de fusión aislada tiene menos de aproximadamente un 10% de agregación durante
10 al menos 3 días o más a aproximadamente 45 °C.

23. Un dímero que comprende dos proteínas de fusión, comprendiendo cada proteína de fusión:

(a) una fusión monocatenaria que comprende tres subunidades de ligandos de CD40 (CD40L), o sus fragmentos,
15 (scCD40L) ligadas covalentemente entre sí mediante conectores peptídicos; y

(b) un monómero de Fc,

donde el scCD40L está ligado covalentemente al monómero de Fc mediante un conector peptídico y donde el dímero se
20 forma mediante una interacción de los monómeros de Fc.

24. Un dímero que comprende dos proteínas de fusión seleccionadas entre las proteínas de fusión de las reivindicaciones 1-22, donde el dímero se forma mediante la interacción de los monómeros de Fc.

25. Un método de activación de un polipéptido de CD40, que comprende poner en contacto el polipéptido CD40 con la proteína de fusión o dímero de cualquiera de las reivindicaciones 1-24.

26. El método de la reivindicación 25, donde la proteína
30 de fusión o dímero se une a hasta seis polipéptidos de CD40.

27. El método de la reivindicación 26, donde el polipéptido de CD40 está en una célula.

28. El método de la reivindicación 27, donde la célula está en un sujeto.

5 29. El método de la reivindicación 28, donde la célula expresa un polipéptido de CD40.

30. El método de la reivindicación 29, donde la célula es una célula presentadora de antígenos, macrófago, linfocito B o célula dendrítica.

10 31. Un método para potenciar una respuesta autoinmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión o dímero aislados de cualquiera de las reivindicaciones 1-24.

15 32. El método de la reivindicación 31, en donde el sujeto padece cáncer.

33. Un método para tratar a un sujeto que padece cáncer que comprende administrar al sujeto la proteína de fusión o dímero aislados de cualquiera de las reivindicaciones 1-24 y uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario.

20 34. El método de la reivindicación 33, donde el uno o más inhibidores de puntos de control inmunitario comprenden un antagonista de PD-L1 o CTLA-4.

35. El método de la reivindicación 34, donde el antagonista de PD-L1 o CTLA-4 es un anticuerpo.

25 36. El método de la reivindicación 35, donde el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab y el anticuerpo anti-CTLA-4 es tremelimumab.

30 37. El método de la reivindicación 35, donde el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una CDR1 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; una CDR2 de la cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; una CDR3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; una CDR1 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; una CDR2 de la cadena ligera
5 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y una CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23.

38. El método de la reivindicación 35, donde el anticuerpo anti-PD-L1 comprende una cadena ligera que tiene
10 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

39. El método de la reivindicación 35, donde el anticuerpo anti-CTLA-4 comprende una CDR1 de la cadena pesada
15 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; una CDR2 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; una CDR3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; una CDR1 de la cadena ligera que tiene la secuencia de
20 aminoácidos de la SEQ ID NO: 31; una CDR2 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; y una CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33.

40. El método de la reivindicación 35, donde el anticuerpo anti-CTLA-4 comprende una cadena ligera que tiene
25 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 25-
30 40, donde el método potencia una o más de una respuesta inmunitaria y una respuesta anticancerosa.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 25-40, en donde el método reduce la inmunosupresión de un microentorno tumoral.

5 43. Un polinucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

44. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 43.

10 45. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 44.

46. La célula hospedadora de la reivindicación 45, donde la célula hospedadora expresa la proteína de fusión aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

15 47. Un método para generar la proteína de fusión o dímero de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que comprende (a) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 46; y (b) aislar la proteína de fusión o dímero.

20 48. Un kit que comprende la proteína de fusión aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, el polinucleótido de la reivindicación 43, el vector de la reivindicación 44, o la célula hospedadora de la reivindicación 45 o 46.

25

30