



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 197**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00916264 .5**

(86) Fecha de presentación : **20.03.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1165781**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

(54) Título: **Análogos de FLINT resistentes a proteasas.**

(30) Prioridad: **30.03.1999 US 126839 P**  
**21.06.1999 US 140073 P**  
**04.08.1999 US 147071 P**  
**20.10.1999 US 160524 P**  
**21.10.1999 US 160669 P**  
**20.12.1999 US 172744 P**  
**26.01.2000 US 178184 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2008**

(73) Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**  
**Lilly Corporate Center**  
**Indianapolis, Indiana 46285, US**

(72) Inventor/es: **Micanovic, Radmila;**  
**Rathnachalam, Radhakrishnan y**  
**Witcher, Derrick, Ryan**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Análogos de FLINT resistentes a proteasas.

## 5 Antecedentes de la invención

En los últimos años se han aislado varias proteínas receptoras del factor de necrosis tumoral (“proteínas TNFR”). Se ha implicado actividad aberrante de estas proteínas en varios estados de enfermedad.

10 Uno de estos homólogos de TNFR, al que se hace referencia en esta memoria como “proteína inhibidora del ligando de FAS” o “FLINT”, se une al Ligando de FAS (FAS L), previniendo así la interacción de FAS L con FAS (véanse las solicitudes provisionales n<sup>os</sup>. Seriales 60/112.577, 60/112.933 y 60/113.407, presentadas, respectivamente, el 17, 18 y 22 de diciembre de 1998).

15 La actividad intensificada de la ruta de transducción de la señal de FAS-Ligando de FAS está implicada en varias afecciones patológicas, incluidas apoptosis de raptó (Kondo y otros, Nature Medicine 3(4):409-513 (1997); Galle y otros, J. Exp. Med. 182:1223-1230 (1995)), y enfermedad inflamatoria resultante de activación neutrofílica (Miwa y otros, Nature Medicine 4:1287 (1998)).

20 La “apoptosis de raptó” está a un nivel de apoptosis mayor que normal, o la apoptosis que se presenta en un momento inapropiado. Entre las afecciones patológicas causadas por la apoptosis de raptó está incluidas, por ejemplo, fallo de órgano en el hígado, riñones y páncreas. Entre las enfermedades inflamatorias asociadas con una activación excesiva de neutrófilos están incluidas sepsis, ARDS, SIRS y MODS.

25 Para tratar o prevenir enfermedades o afecciones que se pueden asociar con estas interacciones de unión se pueden usar compuestos tales como FLINT que inhiben la unión de receptores de FAS a FAS L y LIGHT a LT<sup>®</sup>R, y/o TR2/HVEM. La utilidad terapéutica de FLINT podría incrementarse por análogos de FLINT que exhibieran propiedades farmacológicas modificadas (por ejemplo, una potencia incrementada y/o semividas más largas *in vivo*, y/o mayor afinidad a FASL), propiedades farmacológicas modificadas (por ejemplo, agregación y adsorción superficial aminoradas, solubilidad y facilidad de formulación mayores) y/o propiedades físicas modificadas tales como susceptibilidad a la proteólisis.

## Sumario de la invención

35 El polipéptido de FLINT experimenta proteólisis *in vivo* para producir al menos dos fragmentos peptídicos mayores. Uno de los fragmentos está constituido por los restos 1 a 218 de la SEQ. ID n<sup>o</sup>. 1 (alternativamente, restos 1 a 247 de la SEQ. ID n<sup>o</sup>. 3), denominado en esta memoria “metabolito de FLINT”; el otro está constituido por los restos 219 a 271 de SEQ. ID n<sup>o</sup>. 1 (alternativamente, restos 248 a 300 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 3). La escisión en la posición 218 *in vitro* se puede lograr cuando la FLINT nativa (SEQ ID n<sup>o</sup>. 3) o FLINT madura (SEQ ID n<sup>o</sup>. 1) se trata con una enzima del tipo de la lisina, por ejemplo, tripsina, tripsina u otra proteína de serina. Así es probable que una proteasa de serina sea responsable de la proteólisis *in vivo* de FLINT.

40 Estudios *in vitro* sugieren que el metabolito de FLINT se une a FasL con una afinidad aparente menor que FLINT. Por tanto, la utilidad farmacéutica de FLINT podría intensificarse por un análogo que fuera resistente a la proteólisis en la posición 218 o una próxima a ella. La invención que se describe en esta memoria proporciona tales análogos.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un análogo de FLINT que es resistente a la proteólisis por una proteasa del tipo de tripsina entre las posiciones 218 y 219 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 y/o entre las posiciones 247 y 248 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 3, y activa en la unión del ligando de Fas (FastL) y/o LIGHT, en el que Arg en la posición 218 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 o la posición 247 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 3 está reemplazado por Gln, análogo que comprende un polipéptido que tiene una identidad de como mínimo 97%; alternativamente, de como mínimo 98%; aún alternativamente, de como mínimo 99% con la SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 y/o SEQ ID n<sup>o</sup>. 3.

55 En otra realización, la presente invención se refiere a un análogo de FLINT de acuerdo con la realización anterior en el que Arg de la posición 34 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 o la posición 63 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 3 está reemplazado por Asn, Asp en la posición 36 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 1, o el de la posición 65 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 3 está reemplazado por Thr.

60 Una realización de la presente invención se refiere a un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Asp de la posición 194 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 o la posición 223 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 3 está reemplazado por Asn, Ser en la posición 196 de la SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 o la posición 65 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 3, está reemplazado por Thr.

En otra realización, la presente invención se refiere a un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que Thr de la posición 216 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 1 o la posición 245 de SEQ ID n<sup>o</sup>. 3 está reemplazado por Pro.

Otra realización se refiere a un ácido nucleico que codifica un análogo de FLINT resistente a proteasas de la presente invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un análogo de FLINT resistente a proteasas de la presente invención. La presente invención se refiere también a una célula recombinante hospedante que comprende el mencionado vector.

5 En otra realización, la presente invención se refiere a usos terapéuticos y clínicos de un análogo de FLINT de la presente invención resistente a proteasas para prevenir o tratar una enfermedad o afección de un mamífero que necesita tal prevención o tratamiento.

10 En otra realización, la invención se refiere a usos terapéuticos y clínicos de un análogo de FLINT de la presente invención resistente a proteasas para prevenir o tratar una lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de distensión respiratoria aguda (ARDS) o colitis ulcerosa.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un análogo de FLINT de la presente invención resistente a proteasas.

15

### Descripción detallada de la invención

SEQ ID nº. 1- FLINT humana madura, esto es, FLINT nativa menos la secuencia líder.

20

SEQ ID nº. 2- Ácido nucleico/cDNA que codifica FLINT humana madura

SEQ ID nº. 3- FLINT humana nativa

25

SEQ ID nº. 4- Secuencia líder de FLINT humana

SEQ ID nº. 5- Cebador A de oligonucleótido, CF107

SEQ ID nº. 6- Cebador B de oligonucleótido, CF 111

30

SEQ ID nº. 7- Cebador C de oligonucleótido, CF112

SEQ ID nº. 8- Cebador D de oligonucleótido, CF110

35

SEQ ID nº. 9- Ácido nucleico/cDNA que codifica FLINT humana nativa

Fig. 1.- Escisión con el tiempo de trombina de FLINT nativa y análogo R218Q

40

Fig. 2.- El análogo de FLINT R218Q inhibe la apoptosis inducida por FastL en células de Jurkat. Muestras de FLINT purificadas de células AV12

Fig. 3 - El análogo de FLINT R218Q purificado de células 293 EBNA inhibe la apoptosis inducida por FastL en células de Jurkat.

45

Fig. 4 - El análogo de FLINT RDDSR inhibe la apoptosis inducida por FastL en células de Jurkat

Fig. 5 - Perfil de radiactividad por RP-HPLC después de incubación *in vitro* de <sup>135</sup>I-FLINT y <sup>125</sup>I-FLINT (R218Q) con sangre de ratón de ICR.

50

Los artículos de ensayo se incubaron durante 1 h a 37°C. Se

Preparó suero y se fraccionó por RPHPLC. Los datos se expresan como porcentaje de radiactividad por fracción aplicada a la columna.

55

Fig. 6 - Perfil de RP-HPLC de inmunorreactividad de fLINT en plasma 15 min después de administración intravenosa de FLINT, o FLINT (R218Q) a ratones ICR. Se recogieron las fracciones y se analizaron por ELISA. Los datos son representativos de lo encontrado en cada animal individual.

Fig. 7 - Respuesta a dosis de FLINT y análogo de FLINT en el modelo de fallo agudo de hígado (ALF).

60

El término “análogo” o “análogo de FLINT” significa una FLINT variante, o fragmento de ella, resistente a la proteólisis entre las posiciones 218 y 219 de la SEQ ID nº. 1 (posiciones 247 y 248 de SEQ ID nº. 3) y que preferiblemente tiene una actividad biológica sustancialmente igual a la de FLINT.

65

El término “grupo cargado negativamente” o “aminoácido cargado negativamente” se refiere a Asp o Glu.

El término “grupo cargado positivamente” o “aminoácido cargado positivamente” se refiere a His, Arg o Lys.

## ES 2 291 197 T3

El término “no cargado polar” o “aminoácido no cargado polar” se refiere a Cys, Thr, Ser, Gly, Asn, Gln y Tyr.

El término “no polar” o “aminoácido no polar” se refiere a Ala, Pro, Met, Leu, Ile, Val, Phe o Trp.

5 El término “aminoácido natural” se refiere a cualquiera de los 20 aminoácidos que se encuentran en proteínas. El término “FLINT nativa” se refiere a la SEQ ID n°. 3.

El término “FLINT madura” se refiere a la SEQ ID n°. 1.

10 El término “FLINT” se refiere a FLINT nativa y madura de seres humanos, otros primates y otros mamíferos y de fuentes de no mamíferos.

15 El término “semivida” se refiere al tiempo requerido para que aproximadamente 50% de las moléculas de FLINT o análogo de FLINT sean escindidas proteolíticamente entre las posiciones 218 y 219 de la SEQ ID n°. 1, *in vitro* y/o *in vivo*, según se determina por cualquier medio adecuado.

20 El término “resistente a proteasas” o “resistente” se refiere a un análogo de FLINT que, cuando se compara con FLINT o fragmento de FLINT, es más resistente a la proteólisis entre los restos 218 y 219 de SEQ ID n°. 1. Los análogos resistentes a proteasas difieren de FLINT en una o más sustituciones, supresiones, inversiones, adiciones de aminoácidos y/o cambios en los sitios de glicosilación, o patrones, en comparación con o frente a FLINT nativa, o FLINT madura u otro fragmento de FLINT. Preferiblemente estos cambios se producen en la región de aproximadamente la posición 214 a la posición 222 de la SEQ ID n°. 1.

25 El término “resistente a proteasas” contempla grados de resistencia a la proteólisis en la posición 218, desde resistencia completa a resistencia parcial. Así, un análogo “sustancialmente resistente” presenta un grado de resistencia a la proteólisis en la posición 218, por ejemplo, con una semivida que como mínimo es aproximadamente 25% mayor que la de FLINT nativa cuando se trata o expone a una proteasa adecuada. Preferiblemente, un análogo de FLINT sustancialmente resistente tiene una semivida de resistencia a proteasas que como mínimo es aproximadamente 2 veces mayor que la de FLINT nativa.

30 La susceptibilidad a la proteólisis dependerá de factores tales como la secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión, o próximo a él, y/o el sitio de reconocimiento de la enzima proteolítica particular implicada, y del medio físico y químico del análogo particular en consideración. Tales factores pueden afectar a la  $K_M$  y/o la velocidad de proteólisis por una enzima proteolítica.

35 Se han investigado los sitios de reconocimiento de proteasas de serina, incluida trombina. La trombina escindirá en múltiples sitios, incluido LVPR/ y sitios relacionados con LVPR, por ejemplo, VDPR/ así como otros. La densidad de carga y las propiedades estéricas operativas en un sitio activo de la enzima determinarán el gardo en que se produce la proteólisis. Así, la presente invención contempla análogos de FLINT resistentes a proteasas que comprenden una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos dentro de una ventana delimitada por los residuos 215 a 218 de la SEQ ID n°. 1. Tales análogos los construye fácilmente un experto en la técnica usando técnicas recombinantes conocidas y ensayables *in vitro* en cuanto a resistencia a la proteólisis en la posición 218. Se pretende que todas estas realizaciones estén en el ámbito de la presente invención.

45 Resistencia a proteasas, tal como se contempla en este contexto, se refiere a la sensibilidad de un análogo de FLINT a la proteólisis en la posición 218, *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, la resistencia de un análogo a una proteasa de tipo tripsina, tal como trombina o tripsina, u otra proteasa de serina, se compara con la resistencia que presenta FLINT en las mismas condiciones. Se prefiere que un análogo de FLINT presente una semivida de como mínimo 5% mayor que FLINT, alternativamente como mínimo 10%, 20%, 30%, 40% o entre 50% a 100% mayor que el tipo salvaje de FLINT, determinada por la cantidad relativa de moléculas de longitud entera a productos de digestión menores (por ejemplo, fragmentos 1-218 y 219-271 de SEQ ID n°. 1). Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para hacer una estimación cualitativa y/o cuantitativa de las mencionadas cantidades relativas, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida. Muy preferiblemente, un análogo resistente tiene una semivida que es de aproximadamente 1 a 2-veces mayor que la de FLINT a aproximadamente 100 veces o más que la de FLINT.

55 “Fragmento de ella” se refiere a un fragmento, pieza o subregión de un ácido nucleico de FLINT o una molécula de proteína, o análogo de la presente invención, tal que el fragmento comprende 5 o más aminoácidos, o 10 o más nucleótidos, que son contiguos en la proteína madre o la molécula de ácido nucleico.

60 El término “proteína de fusión” denota una molécula de proteína híbrida no encontrada en la naturaleza que comprende una fusión translacional o fusión enzimática en la que dos o más proteínas diferentes o fragmentos de ellas están unidas covalentemente en una cadena individual de polipéptido.

65 “Fragmento funcional” o “fragmento funcionalmente equivalente”, tal como se usa en esta memoria, se refiere a una región o fragmento de una proteína de longitud entera de la presente invención que es capaz de proporcionar una actividad biológica sustancialmente similar a la actividad biológica de una proteína de longitud entera de la presente invención, *in vivo* y/o *in vitro*, esto es, la capacidad de inhibir apoptosis. Se pueden producir fragmentos funcionales por tecnología de clonación, o como los productos naturales de mecanismos de ajuste alternativos.

“Célula hospedante” se refiere a cualquier célula eucariótica o procariótica que es adecuada para propagar y/o expresar un gen clonado o un ácido nucleico contenido en un vector que se introduce en la mencionada célula hospedante mediante, por ejemplo, transformación o transfección o similarmente.

5 El término “hibridación”, tal como se usa en este contexto, se refiere a un proceso en el que una molécula de ácido nucleico de cadena simple se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento con una base nucleotídica. “Hibridación selectiva” se refiere a hibridación en condiciones de alta rigurosidad. El grado de hibridación depende del grado de homología, la rigurosidad de hibridación y la longitud de las cadenas de hibridación.

10 “Compuesto de ácido nucleico aislado” se refiere a cualquier secuencia de RNA o DNA, construida o sintetizada, que está situada en sitio diferente de su situación natural.

15 El término “rigurosidad” ase refiere a las condiciones de hibridación. Las condiciones de alta rigurosidad desfavorecen el emparejamiento de base no homólogo. Las condiciones de baja rigurosidad tienen el efecto opuesto. La rigurosidad se puede alterar, por ejemplo, con la temperatura y la concentración salina.

20 Las condiciones de “baja rigurosidad” comprenden por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 37°C o menos, una concentración de formamida de menos de aproximadamente 50% y una concentración de sal de moderada a baja (SSC); o, alternatively, una temperatura de aproximadamente 50°C o menos y una concentración de sal de moderada a alta (SSPE), por ejemplo, NaCl 1M.

25 Las condiciones de “alta rigurosidad” son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden comprender, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 42°C o menos, una concentración de formamida de menos de aproximadamente 20%, y una concentración baja de sal (SSC); o, alternatively, una temperatura de aproximadamente 65°C o menos y una concentración baja de sal (SSPE). Por ejemplo, las condiciones de hibridación de alta rigurosidad comprenden hibridación en NaHPO<sub>4</sub> 0,5M, 7% de dodecilsulfato sódico (SDS), EDTA 1 mM a 65°C (Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, 1989; Green Inc., New York, a 2.10.3).

30 “SSC” comprende una solución de hibridación y lavado. Una solución de acopio 20X SSC contiene cloruro sódico 3M, citrato sódico 0,3M, pH 7,0.

35 “SSPE” comprende una solución de hibridación y lavado. Una solución 1X SSPE contiene NaCl 180 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,9 mM y EDTA 1 mM, pH 7,4.

La expresión “sustancialmente pura” usada en referencia a un péptido o proteína significa que el mencionado péptido o proteína se separa de una fracción grande de todas las otras moléculas celulares o no celulares, incluidas otras moléculas de proteína. Una preparación sustancialmente pura tendría como mínimo una pureza de aproximadamente 85%; preferiblemente de como mínimo aproximadamente 95%. Por ejemplo, una proteína “sustancialmente pura” como se describe en este contexto podría prepararse por el procedimiento IMAC de preparación de proteínas.

40 El término “vector”, usado en este contexto, se refiere a un compuesto de ácido nucleico usado para introducir DNA exógeno o endógeno en células hospedantes. Un vector comprende una secuencia nucleotídica que puede codificar una o más moléculas de proteína. Los plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos, en el estado natural o que han sido sometidos a ingeniería recombinante, son ejemplos de vectores comúnmente usados.

Las abreviaturas de nucleótidos y aminoácidos empleadas en esta memoria son las aceptadas en la técnica y por la Oficina de Patentes y Marcas de EE. UU, como se expone en 37 C.F.R. 1.822 (b) (2).

50 Las descripciones que se refieren a proteólisis de FLINT y análogos de FLINT entre las posiciones 218 y 219 de SEQ ID n°. 1 (FLINT madura) se emplean como relacionadas también con SEQ ID n°. 3 (FLINT nativa con líder), estando las regiones comparables entre las posiciones 247 y 248.

55 Los solicitantes han descubierto que los polipéptidos de FLINT se escinden entre el resto de arginina en la posición 218 y el resto de alanina en la posición 219 de SEQ ID n°. 1, probablemente por una proteasa de tipo tripsina. Un producto de escisión de esta reacción comprende los restos 1-218 de SEQ ID n°.1, denominado “metabolito de FLINT”. El metabolito de FLINT se puede producir *in vitro* tratando un polipéptido de FLINT con una proteasa de tipo tripsina, por ejemplo, trombina, tripsina u otra proteasa de serina.

60 Un procedimiento para producir análogos de un polipéptido de FLINT que son resistentes a la proteólisis entre las posiciones 218 y 219 de SEQ ID n°. 1 y que retienen actividad biológica se describe en este documento. La actividad biológica se refiere a la capacidad de un análogo para unirse a FasL y/o LIGHT y puede incluir una inhibición de la apoptosis *in vivo* y/o *in vitro*.

65 Otra realización de la presente invención se refiere a análogos de un polipéptido de FLINT que son resistentes a la proteólisis entre las posiciones 218 y 219 de SEQ ID n°. 1 y que retienen actividad biológica. La actividad biológica se refiere a la capacidad de un análogo para unirse a FasL y/o LIGHT y puede incluir una inhibición de la apoptosis *in vivo* y/o *in vitro*.

Los análogos de FLINT preferidos proporcionan una semivida de como mínimo 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, o entre 50% y 100% mayor que FLINT, determinada por la relación con el tiempo de FLINT de longitud entera a productos de digestión que comprenden metabolito de FLINT y el fragmento de carboxilo (esto des, restos 219-271 de SEQ ID nº. 1); muy preferiblemente un análogo de FLINT tiene una semivida de como mínimo 2 a 100 veces o más la de FLINT.

Los análogos de FLINT comprenden uno o varios cambios estructurales primarios o secundarios, por ejemplo, sustituciones, supresiones, inversiones, adiciones o cambios de los sitios de glicosilación o patrones y/o combinaciones de ellos que previenen o disminuyen la proteólisis y/o la velocidad a la que transcurre, entre las posiciones 217 y 218 de SEQ ID nº. 1. Como lo comprende un experto en la técnica, los restos en un sitio de reconocimiento o en su proximidad pueden afectar también a la susceptibilidad de la proteína sustrato a la proteólisis por alterar el medio de carga en el sitio activo y/o crear alteraciones por impedimento estérico en la región del sitio activo.

Por tanto, la invención contempla análogos de FLINT que comprenden cambios de aminoácidos en FLINT, preferiblemente en la región desde aproximadamente la posición 214 a la posición 222 de SEQ ID nº. 1 o la región comparable de SEQ ID nº. 3, siendo los mencionados análogos resistentes a la proteólisis en la posición 218 de SEQ ID nº. 1.

También se contemplan los análogos de FLINT resistentes a proteasas que contemplan sustituciones, supresiones, inserciones, inversiones, adiciones o cambios en los sitios o patrones de glicosilación que se producen fuera de la ventana preferida que comprende restos desde 214 a 222 de la SEQ ID nº. 1. Como lo entiende el experto en la técnica, muchas sustituciones y/u otros cambios en la secuencia o estructura de una proteína pueden hacerse sin afectar sustancialmente a la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, haciendo sustituciones conservadoras de aminoácidos o cambiando un aminoácido por otro de la misma clase de aminoácidos, por ejemplo, restos cargados negativamente, restos cargados positivamente, restos polares no cargados y restos no polares, o cualquier otra clasificación aceptable en la técnica, frecuentemente no se afecta la función. Tales cambios quedan dentro del ámbito de la presente invención.

En una realización, dentro de esta región se hace un cambio de un aminoácido; alternatively, dentro de esta región se hacen al menos dos cambios; alternatively, dentro de esta región se hacen al menos tres cambios; alternatively, dentro de esta región se hacen al menos cuatro cambios.

En una realización, la invención se refiere a polipéptidos de análogos de FLINT y ácidos nucleicos que se definen con referencia a una similitud porcentual de analogía con las SEQ ID nº. 1, SEQ ID nº. 2 y/o SEQ ID nº. 3. Identidad de secuencia se refiere a una comparación entre dos moléculas usando algoritmos estándar bien conocidos en la técnica. Aunque para este fin se puede usar un algoritmo de comparación de cualquier secuencia adecuada, esta ilustración se describirá, a fines ilustrativos, con referencia al algoritmo de Smith-Waterman, bien conocido, usando la SEQ ID nº. 1 como secuencia de referencia para definir la identidad porcentual con una secuencia de comparación. Cuando se usa identidad de secuencia con referencia a un polipéptido, en la comparación se puede usar el polipéptido entero o una subregión de él bien definida.

La elección de los valores de los parámetros para ajustes, desajustes e inserciones o supresiones es arbitraria. Un conjunto de valores preferido para uso con el algoritmo de Smith-Waterman se presenta en el enfoque de "segmentos de similitud máxima", que usa valores de 1 para un resto ajustado y de -1/3 para un resto no ajustado. (Véase Waterman, Bulletin of Mathematical Biology, 46, 473-500, 1984). Las inserciones y supresiones se ponderan como sigue:

$$X_k = 1 + k/3$$

en la que k es el número de restos en una inserción o supresión dada.

Por ejemplo, una secuencia comparativa que tiene 20 sustituciones y 3 inserciones en relación a una secuencia de proteína de referencia que tiene 250 restos tendría una identidad de:

$$[(1 \times 250) - (1/3 \times 20) - (1 + 3/3)] \approx 96\% \text{ de identidad.}$$

Los análogos de FLINT de la presente invención se pueden ensayar fácilmente en cuanto a la actividad biológica y/o sensibilidad a la proteólisis como se ha descrito en esta memoria; véanse por ejemplo los Ejemplos 11 y 12. La actividad biológica se puede estimar usando modelos *in vitro* (véase el Ejemplo 6) o *in vivo* (véase el Ejemplo 9) según se ha descrito.

Los análogos de FLINT son activos en la unión de FasL y/o LIGHT. LIGHT, un miembro de la familia de FNT, es un ligando unido a membrana que desencadena respuestas biológicas distintas. LIGHT puede desempeñar un papel en la modulación inmune y parece que está implicado en la entrada del virus de herpes (véase Zhai y otros, J. Clin. Invest. 102, 1142-1151, 1988; Montgomery y otros, Cell, 87, 427-436, 1996). LIGHT soluble inhibe la proliferación de varias células tumorales y parece que se une a los receptores LTβR y TR2 (también denominado mediador de la entrada del virus de herpes, HVEM). LIGHT se expresa mucho en linfocitos activados y evoca modulación inmune de células hematopoiéticas. Por ejemplo, LIGHT estimula la secreción de IFNγ. LIGHT también induce apoptosis de células

tumorales que expresan los receptores de LT $\beta$ R y TR2/HVEM. El efecto citotóxico de LIGHT, que se intensifica por IFN $\gamma$ , se puede bloquear por la adición de LT $\beta$ R-Fc soluble o TR2/HVEM-Fc.

La presente invención se refiere además al uso de un análogo de FLINT para unirse a LIGHT, inhibiendo así la activación de células T. La activación de células T es puede suprimir crónicamente cuando sea ventajoso, por ejemplo, después de un trasplante de órgano para prevenir el rechazo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en el tratamiento de respuestas inflamatorias sistémicas.

LIGHT se produce principalmente por linfocitos T activados. Cuando LIGHT se une a HVEM sobre la superficie de células T, estimula la proliferación de células T (J.A. Harrop y otros, J. Biol. Chem. 273, 27548-27556, 1988).

Los análogos de FLINT de la invención se pueden producir por técnicas recombinantes o por síntesis química directa. Los análogos se pueden producir también por técnicas de mutagénesis recombinantes de DNA, bien conocidas por los expertos. Véase, por ejemplo, K. Struhl, *Reverse biochemistry: Methods and applications for synthesizing yeast proteins in vitro*, Meth. Enzymol. 194, 520-535. En un procedimiento recombinante preferido, se usa mutagénesis dirigida al sitio para introducir cambios definidos en la región 214-222 de SEQ ID n°. 1 o la región comparativa de SEQ ID n°. 3.

Los análogos de FLINT incluyen también derivados modificados de ellos en los que uno o más grupos polietilenglicol (denominados en lo que sigue grupos "PEG") están unidos al término N o a grupos amino o grupos tiol en la(s) cadena(s) lateral(es) del aminoácido. Generalmente, los grupos PEG adecuados tienen un peso molecular de entre aproximadamente 5.000 y 20.000 unidades de masa atómica. Mumtaz y Bachhawat, en Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 28:346 (1991) y Francist y otros, en International Journal of Hematology 68:1 (1998) describen procedimientos para preparar polipéptidos PEGilados.

Otra realización más de un análogo de FLINT es una molécula que comprende dos o más análogos de FLINT modificados o no modificados, por ejemplo, un análogo de FLINT dimerizado tal como R128Q. Se contemplan homodímeros que comprenden dos subunidades de análogo idénticas (por ejemplo, R218Q(2)) y heterodímeros que comprenden dos subunidades de análogo no idénticas (por ejemplo, R218Q/R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q). La dimerización se puede realizar usando el procedimiento de cadena del polímero PEG descrito por Espot y otros, Journal of Surgical Research 59: 153 (1995), o mediante una fusión C-terminal a un dominio que induce dimerización, tal como un cierre de leucina, como describen O'Shea y otros, Science 254-539 (1991).

Se describen en esta memoria proteínas de fusión que comprenden un análogo de FLINT. "Proteína de fusión" denota una molécula de proteína híbrida que no se encuentra en la naturaleza que comprende una fusión translacional o una fusión enzimática en la que dos o más proteínas o fragmentos diferentes de ellas están unidas por covalencia en una cadena individual de polipéptido. La albúmina de suero humano y el dominio C-terminal de trombopoietina son ejemplos de proteínas que podrían fusionarse con un análogo de FLINT. En la patente EP394.827 y en las publicaciones de Tranecker y otros, Nature 331:84 (1988) y Fares y otros, Proced. Natl. Acad. Sci. USA 89:4304 (1992) se describen procedimientos para preparar proteínas de fusión.

Una proteína de fusión de un análogo de FLINT comprende dos segmentos de proteína o fragmentos de proteína fusionados mediante un enlace peptídico. El segmento de la primera proteína está constituido por al menos 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 o 275 restos de aminoácidos contiguos de un análogo de la presente invención (esto es, SEQ ID n°. 1 o SEQ ID n°. 3 resistente a proteasas). Alternativamente, la primera proteína puede ser un análogo de longitud entera de la presente invención y puede ser N-terminal o C-terminal.

La segunda proteína de una proteína de fusión de un análogo de FLINT puede ser una proteína de longitud entera o un fragmento de proteína. Las proteínas comúnmente usadas en proteínas de fusión incluyen B-galactosidasa, B-glucoronidasa, proteína fluorescente verde (CFP), trombopoietina (TPO), glutatona-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano amargo y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). En las construcciones de proteínas de fusión se pueden usar etiquetas de epitopos, incluidas etiquetas de histidina (His), etiquetas de FLAG, de influenza hemagglutina (HA), de Myc, de VSV-G y de tioredoxina. Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión de maltosa, etiqueta S, dominio de unión de DNA de Lex A, fusiones de dominio de unión de DNA de GAL 4 y fusiones de proteína BP 16 de virus de herpes simple.

Los análogos de FLINT de la presente invención pueden ser glicosilados o no glicosilados. Un polipéptido glicosilado se modifica con uno o más monosacáridos u oligosacáridos. Un monosacárido es un polihidroxialcanol o polihidroxialcanona quiral que típicamente existe en forma de hemiacetal. Un "oligosacárido" es un polímero de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 monosacáridos que en general están unidos por enlace de acetal. Un tipo de grupo glicosilo comúnmente hallado en proteínas glicosiladas es ácido N-acetilneuramínico. Un polipéptido glicosilado puede ser N-glicosilado y/o O-glicosilado, preferiblemente, N-glicosilado.

El término "polipéptido N-glicosilado" se refiere a polipéptidos que tienen uno o más motivos NXS/T en los que el átomo de nitrógeno de la amida de la cadena lateral de la asparagina está unido covalentemente a un grupo glicosilo. "X" se refiera a cualquier resto de aminoácido natural, excepto prolina. Los "aminoácidos naturales" son glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, cisteína, metionina, lisina, arginina, ácido glutámico, ácido

aspártico, glutamina, asparagina, fenilalanina, histidina, tirosina y triptófano. Las proteínas N-glicosiladas opcionalmente son O-glicosilación.

El término “polipéptido O-glicosilado” se refiere a polipéptidos que tienen una o más serinas y/o treoninas en los que el átomo de oxígeno en la cadena lateral está unido covalentemente a un grupo glicosilo. Las proteínas O-glicosiladas opcionalmente son N-glicosilación.

Los polipéptidos y análogos glicosilados de la presente invención se pueden preparar recombinantemente por expresión de un gen que codifica un polipéptido en una célula hospedante mamífera adecuada, lo que da por resultado la glicosilación de amidas de cadena lateral halladas en NXT/motivos S accesibles sobre la superficie del polipéptido y de alcoholes de cadena lateral de serinas y treoninas accesibles de superficie. Más adelante se proporcionan procedimientos específicos de para expresar recombinantemente genes en células de mamíferos. Se describen otros procedimientos para preparar proteínas glicosiladas en la patente EP 640.619 expedida a Elliot y Burn. Los polipéptidos no glicosilados se pueden preparar recombinantemente por expresión de un gen que codifica un polipéptido en una célula procariótica hospedante adecuada.

La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos, por ejemplo, cDNAs, DNAs o RNAs que codifican un análogo de la presente invención y vectores que comprenden los mencionados ácidos nucleicos. El experto sabe que tales ácidos nucleicos se pueden preparar sintéticamente mediante mutación de una plantilla de ácido nucleico que codifica FLINT, por ejemplo, introduciendo mutaciones puntuales adecuadas en un cDNA que codifica FLINT usando cualquiera de las técnicas mutagénicas adecuadas conocidas por los expertos para producir una proteasa resistente o análogo de proteasa de la presente invención sustancialmente resistente. Alternativamente, los mencionados ácidos nucleicos se pueden preparar sintéticamente de novo basándose en el conocimiento del código genético y el análogo particular de SEQ ID n°. 1 o SEQ ID n°. 3 en el que se está interesado. Puede tomarse en consideración la preferencia de codón cuando se diseña un ácido nucleico adecuado.

Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los análogos de la presente invención se describen en otro lugar de la presente solicitud y que comprenden supresiones, sustituciones y/o adiciones en la posición 218 y su entorno de la SEQ ID n. 1, o en otro lugar en la secuencia de FLINT. El experto sabe que el uso del código genético en combinación con el conocimiento del uso de los codones preferidos es adecuado para describir y permitiría la construcción de cualquier número de ácidos nucleicos que codifican cualquier análogo particular deseado. Por ejemplo, el codón que codifica arginina en la posición 218 de SEQ ID n°. 1 en FLINT nativa es “agg”. Uno de los análogos de la invención cambia la arginina en esta posición en glutamina, lo que puede llevarse a cabo cambiando el codón de “agg” a “caa” o “cag”. La elección de qué codon usar para cualquier aminoácido particular puede estar basada en el conocimiento del uso de codones preferidos y/o por prueba y error considerando la expresión del análogo. Son descriptibles otros análogos contemplados por la invención y utilizables de la misma manera.

Un cDNA de FLINT se puede sintetizar por RT-PCR usando técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede preparar PoliA RNA a partir de un tejido que se conoce que expresa el gen de FLINT (por ejemplo, pulmón humano) usando procedimientos estándar. La síntesis de cDNA de FLINT de primera cadena se logra en una reacción de transcriptasa inversa usando un cebador derivado “corriente abajo” de una secuencia de FLINT. Se puede emplear un kit disponible comercialmente, tal como GENEAMP de Perkin Elmer. En una PCR posterior, para amplificar el cDNA se usan cebadores directo e inverso. La muestra amplificada se puede analizar por electroforesis con gel de agarosa para comprobar la longitud del fragmento amplificado.

El cDNA de FLINT generado de esta manera se usa como plantilla para introducir mutaciones puntuales apropiadas (esto es, construcción de cDNAs de análogo de FLINT). Se describe detalladamente un protocolo adecuado en *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, sección 8.5.7 (John Wiley and Sons, Inc., publishers). En resumen, se diseñan oligonucleótidos sintéticos para incorporar una o más mutación(es) puntual(es) en un extremo de un fragmento amplificado, por ejemplo, en la posición 218 de SEQ ID n°. 1. Después de la PCR de la primera cadena, los fragmentos amplificados que abarcan la mutación se anillan entre sí y se extienden por síntesis mutuamente cebada. Al anillamiento sigue una etapa de segunda PCR utilizando cebadores terminales 5'-directo y 3'-inverso en la que se amplifica el fragmento mutagenizado y queda preparado para subclonar en el vector apropiado.

El experto sabe que la degeneración del código genético proporciona múltiples codones en algunos casos para un aminoácido dado. Se considera que todas estas variantes de secuencias de ácidos nucleico están en el ámbito de la invención.

Usando la información que se proporciona en esta memoria, tal como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n°. 1 o la SEQ ID n°. 3, o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n°. 2, o variantes de ellas, se puede obtener, usando procedimientos bien conocidos, una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica un análogo de FLINT.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de RNA, tal como mRNA, hnRNA o cualquier otra forma o en forma de DNA, incluido, aunque no sólo, cDNA o DNA genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de ellos. El DNA puede ser de cadena triple, de cadena doble o de cadena simple, también conocida como cadena de sentido, o puede ser una cadena no codificadora, conocida también como cadena antisentido.



La presente invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican un análogo de FLINT resistente a proteasas y que hibridiza en condiciones selectivas con un polinucleótido descrito y/o contemplado en esta memoria, por ejemplo, SEQ ID n°. 2 y/o sus derivados.

- 5 La presente invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que comprenden polinucleótidos análogos de FLINT, siendo tales polinucleótidos complementarios de los polinucleótidos de la invención. Pares de base de secuencias complementarias en la totalidad de su longitud con tales polinucleótidos (esto es, tienen una identidad de secuencia de 100% en toda su longitud). Las bases complementarias asocian mediante unión con hidrógeno en ácidos nucleicos de cadena doble. Por ejemplo, los siguientes pares de base son complementarios: guanina y citosina; adenina y timina; y adenina y uracilo. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, o Sambrook, *supra*).

#### Construcción de ácidos nucleicos

- 15 Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención se pueden hacer usando (a) procedimientos recombinantes estándar, (b) técnicas de síntesis, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de ellas, como es bien conocido en la técnica.

- 20 Los ácidos nucleicos pueden comprender adecuadamente secuencias, además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, en el ácido nucleico se puede insertar un sitio de multiclonación que comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasa con el fin de coadyuvar a aislar el polinucleótido. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención.

#### Procedimientos recombinantes para construir ácidos nucleicos

- 25 Las composiciones de ácidos nucleicos aislados de esta invención, tales como RNA, cDNA, DNA genómico o uno de sus híbridos, se pueden obtener de fuentes biológicas usando cualquiera de las metodologías de clonación conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de cDNA o DNA genómico se usan sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, en condiciones rigurosas, con los polinucleótidos de la presente invención. El aislamiento de RNA y la construcción de cDNA y las bibliotecas genómicas son bien conocidos por los expertos corrientes. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*).

#### Procedimientos de exploración y aislamiento de ácidos nucleicos

- 35 Se puede explorar un cDNA o una biblioteca genómica usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención como las discutidas en esta memoria. Se pueden usar sondas para hibridar con secuencias de un DNA genómico o cDNA para aislar genes homólogos en el mismo organismo o en diferentes organismos. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear varios grados de rigurosidad de hibridación en el ensayo; y que el medio de hibridación o el de lavado puede ser riguroso. A medida que las condiciones de hibridación son más rigurosas, debe haber un grado de complementariedad mayor entre la sonda y la diana para que haya una formación duplex. El grado de rigurosidad se puede controlar por la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturizante tal como formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de hibridación se cambia convenientemente cambiando la polaridad de la solución de reactivo mediante, por ejemplo, manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido para unión detectable variará de acuerdo con la rigurosidad del medio de hibridación y/o el medio de lavado. El grado de complementariedad óptimamente será de 100%, pero debe entenderse que variaciones menores de secuencia en las sondas y cebadores pueden compensarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación y/o el de lavado.

- 50 Los procedimientos de amplificación de RNA o DNA son bien conocidos en la técnica y se pueden usar de acuerdo con la presente invención sin una experimentación innecesaria basándose en las enseñanzas y la guía de la presente memoria.

- 55 Entre los procedimientos de amplificación de DNA o RNA están incluidos, pero no son los únicos, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y procedimientos de amplificación afines (véase, por ejemplo, patentes U.S. n°. 4.683.195, 4.800.202, 4.800.159, 4.965.188, expedidas a Mullis y otros; 4.795.699 y 4.921.794 expedidas a Tabor y otros; 5.142.033 expedida a Innis; 5.122.464 expedida a Wilson y otros; 5.091.310, expedida a Innis; 5.066.584 expedida a Gyllensten y otros; 4.889.818 expedida a Gelfand y otros; 4.994.370 expedida a Silver y otros; 4.766.067 expedida a Biswas; 4.656.134 expedida a Ringold) y la amplificación mediada de RNA que usa RNA antisentido a la secuencia diana como plantilla para la síntesis de DNA de doble cadena. (Patente U.S. n. 5.130.238 expedida a Malek y otros, con el nombre comercial NASBA). (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, o Sambrook, *supra*).

- 65 Por ejemplo, se puede usar la tecnología de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y genes afines directamente a partir de DNA genómico, bibliotecas de cDNA o DNA o RNA clonado. La PCR y otros procedimientos de amplificación *in vitro* pueden ser útiles también para, por ejemplo, clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas a expresar, para hacer ácidos nucleicos para usarlos como sondas para detectar la presencia del mRNA deseado en muestras, para secuenciar ácidos nucleicos o para otros fines. Se encuentran ejemplos de técnicas suficientes para dirigir personas expertas en procedimientos de amplificación *in vitro* en las publicaciones de Berger, Sambrook y Ausubel, así como de Mullis y otros, patente U.S.

nº. 4.683.202 (1987) e Innis y otros, *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Son conocidos en la técnica kits comerciales para amplificación genómica por PCR. Véase, por ejemplo, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech.). Para mejorar el rendimiento de productos largos de PCR se puede usar la proteína 32 del gen T4 (Boehringer Mannheim).

#### Procedimientos de síntesis para construir ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también se pueden preparar por síntesis química directa por procedimientos tales como el procedimiento del fosfotriéster de Narang y otros, *Meth. Enzymol.* 68:90-99 (1979); el procedimiento del fosfodiéster de Brown y otros, *Meth. Enzymol.* 68:109-151 (1979); el procedimiento de dietilfosforamida de Beaucage y otros, *Tetra Letts.* 22:1859-1862 (1981), el procedimiento de triéster de fosforamida en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetra Letts.* 22(20):1859-1862 (1981), por ejemplo usando un sintetizador automatizado, por ejemplo según se describe en Needham-VanDevanter y otros, *Nucleic. Acids Res.* 12:6159-6168 (1984); y el procedimiento sobre soporte sólido de la patente U.S. nº. 4.458.066. Generalmente, la síntesis química produce un oligonucleótido de cadena simple que se puede convertir en DNA de cadena doble por hibridización con una secuencia complementaria, o por polimerización con una DNA polimerasa usando la cadena simple como plantilla. Un experto en la técnica reconocerá que, si bien la síntesis química de DNA puede estar limitada a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas por ligación de secuencias más cortas.

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico de la presente invención, células hospedantes que generalmente se han tratado por ingeniería genéticamente con los vectores recombinantes, y la producción de análogos de FLINT, como se conoce bien en la técnica. (Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, 1989; Ausubel y otros, 1987-1998).

“Vector” se refiere a un compuesto de ácido nucleico usado para introducir ácido nucleico exógeno o endógeno en células hospedantes. Un vector comprende una secuencia nucleotídica que puede codificar una o más moléculas de proteína. Los plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos, en el estado natural o que han sido sometidos a ingeniería recombinante, son ejemplos no limitativos de vectores comúnmente usados para proporcionar vectores recombinantes que comprenden al menos una molécula de un ácido nucleico aislado deseado.

“Célula hospedante” se refiere a cualquier célula eucariótica o procariótica, u otra célula o pseudocélula, o construcción que contiene membrana, que es adecuada para propagar y/o expresar un ácido nucleico que se introduce en la mencionada célula hospedante mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, transformación o transfección o similarmente) o es inducida para expresar un ácido polidesoxinucleico endógeno. La célula puede ser parte de un tejido u organismo, aislado en un cultivo o en cualquier forma adecuada.

Los ácidos nucleicos de la invención, incluidos cDNAs, opcionalmente pueden estar unidos a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedante. Generalmente se introduce un vector plásmido en un precipitado tal como un precipitado de carbonato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado (por ejemplo, lipofectamina). Si el vector es un virus, puede ser empaquetado *in vitro* usando una línea de células de empaquetamiento y luego se transduce a las células hospedantes.

El inserto de DNA puede unirse operativamente a un promotor adecuado tal como un promotor PL lambda de fagos el promotor T7 de fagos, los promotores lac, trp y tac de *E. Coli*, los promotores SV40 precoz y tardío y los promotores de LTRs retrovirales, o cualquier otro promotor adecuado. Los expertos conocen otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán también sitios para iniciación y terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión de ribosoma para traducción. La región de codificación de los transcritos maduros expresados por las construcciones preferiblemente incluirá un codón que inicia una traducción al comienzo y de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) situado al final del mRNA a traducir, prefiriéndose UGA y UAA par expresión de células mamíferas o eucarióticas.

Los vectores de expresión preferiblemente incluirán al menos un marcador seleccionable. Entre tales marcadores están incluidos, por ejemplo, genes resistentes a dihidrofolatorreductasa, neomicina, zeocina, higromicina B o puromicina para cultivos de células eucarióticas o genes de resistencia a canamicina o ampicilina para cultivos en *E. Coli* u otras bacterias o procarióticas. Entre los ejemplos representativos de células hospedantes adecuados están incluidos, no exclusivamente, células bacterianas tales como *E. Coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*; células de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* o *Pichia pastoris*; células de insectos tales como *Drosophila S2*; Spodoptera Sf9, y células High Five (BTI-TN-5B1-4); células animales tales como 293, 293EBNA, CHO, COS y COS7, BHK, AV12, 3T3, HeLa y células de melanoma de Bowes; y células de plantas. Los medios de cultivo apropiados y las condiciones adecuadas para las células hospedantes descritas son conocidos en la técnica. Entre los vectores preferidos para uso en bacterias figuran pET15 y pET30, adquiribles de Novagen; pQE70, pQE60 y pQE-9, adquirible de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46 A, adquiribles de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT5, adquiribles de Pharmacia. Entre los vectores eucarióticos preferidos están incluidos pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, adquiribles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL, adquirible de Pharmacia; y el vector comúnmente usado pcDNA3.1, adquirible de Invitrogen. Los expertos en la técnica identificarán fácilmente otros vectores adecuados.

La introducción de una construcción de vector en una célula hospedante se puede efectuar por transfección en fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Tales procedimientos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como el de Sambrook, *supra*, capítulos 1-4 y 16-18, y Ausuble, *supra*, capítulos 1, 9, 13, 15 y 16.

También se describen en esta memoria proteínas de fusión que comprenden análogos de FLINT. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, por ejemplo, hexahistidina(HiS<sub>6</sub>)tag, al término amino o carboxilo de un análogo de FLINT para facilitar la purificación. Si se desea, tales regiones se pueden eliminar antes de la purificación final de un análogo. Tales procedimientos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio como el de Sambrook, *supra*, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; y Ausuble, *supra*, capítulos 16, 17 y 18.

#### *Expresión de análogos de FLINT en células hospedantes*

Usando los ácidos nucleicos de la presente invención, se puede expresar un análogo de FLINT en una célula ingenierilmente tratada recombinantemente, tal como células de bacterias, levadura, insecto o de mamífero.

Los expertos en la técnica son conocedores de numerosos sistemas de expresión disponibles para expresar un ácido nucleico que codifica un análogo de FLINT de la presente invención. No se hará intento alguno de describir en detalle los varios procedimientos conocidos para la expresión de proteínas en procariotes o eucariotes.

En resumen, típicamente, la expresión de ácidos nucleicos aislados que codifican un análogo de FLINT de la presente invenciones se efectuará uniendo operativamente un DNA o cDNA que codifica un análogo a un promotor (que es constitutivo o inducible), a lo que sigue la incorporación a un vector de expresión. Los vectores deben ser adecuados para replicación e integración en procariotes o eucariotes. Los vectores de expresión típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del DNA que codifica una proteína de la presente invención. Para obtener un nivel alto de la expresión de un gen clonado, es deseable construir vectores de expresión que contienen, como mínimo, un promotor para transcripción directa, un sitio de unión de ribosoma para iniciación de la traducción y un terminador de transcripción/traslación. Un experto reconocerá que se pueden hacer modificaciones a una proteína de la presente invención sin disminuir su actividad biológica. Algunas modificaciones se pueden hacer para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula que apunta la diana en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica y entre ellas están incluidas, por ejemplo, una metionina añadida al término amino para tener un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) situados en cualquier terminal para crear sitios de restricción o codones de terminación situados convenientemente o secuencias base de purificación.

#### *Expresión de procariotes*

Se pueden usar células procarióticas como células hospedantes para expresión de análogo(s) de FLINT. Muy frecuentemente, los procariotes están representados por varias cepas de *E. Coli*; sin embargo, también pueden usarse otras cepas microbianas. Entre las secuencias de control procarióticas comúnmente usadas que se definen en esta memoria para incluir promotores para iniciación de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias de sitios de unión de ribosomas, figuran promotores comúnmente usados tales como los sistemas promotores de beta lactamasa (penicilinas) y lactosa (lac) (Chang y otros, Nature 198:1056 (1977), el sistema promotor de triptófano (trp= (Goeddel y otros, Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980), el promotor de fago T7 (Studier, F.W., Methods of Enzymology, 185, 60-89, (1990) y el promotor PL lambda derivado y el sitio de unión de ribosoma de N-genes (Shimatake y otros, Nature 292:128 (1981). La inclusión de marcadores de selección en vectores de DNA transfectados en *E. Coli* es también útil. Entre los ejemplos de tales marcadores están incluidos genes que especifican resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol o canamicina.

El vector seleccionado ha de permitir la introducción en la célula hospedante adecuada. Típicamente, los vectores bacterianos son de origen de plásmido o fago. Las células de bacterias apropiadas se infectan con partículas de vectores de fago o se transfectan con DNA de vector de fago desnudo. Si se usa un vector de plásmido, las células bacterianas se transforman con el DNA de vector de plásmido. Hay disponibles sistemas para expresar una proteína de la presente invención usando *Bacillus subtilis* y *Salmonella* (Palva y otros, Gene 22:229-235 (1983); Mosbach y otros, Nature 302:543-545 (1983)).

#### *Expresión de eucariotes*

Los expertos en la técnica conocen una variedad de sistemas de expresión tales como levaduras, líneas de células de insecto, células de plantas y mamíferos. Como se explica seguidamente, un análogo de FLINT de la presente invención que codifica un ácido nucleico se puede expresar en estos sistemas eucarióticos.

La síntesis de proteínas heterólogas en levadura es bien conocida. *Methods in Yeast Genetics*, de F. Sherman y otros, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) es un trabajo muy reconocido que describe los varios procedimientos disponibles para producir la proteína en levadura. Dos levaduras ampliamente utilizadas para producción de proteínas eucarióticas son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Los vectores, cepas y protocolos para expresión en *Saccharomyces* y *Pichia* son conocidos en la técnica y son asequibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Invitrogen). Usualmente, los vectores de expresión adecuados tienen secuencias de control de la expresión, tales como secuencias

promotoras, incluida 3-fosfoglicerato quinasa o alcoholoxidasa, y un origen de replicación, secuencias de terminación, etc., si se desea.

Un análogo de FLINT de la presente invención expresado en levadura se puede aislar por técnicas estándar de aislamiento de proteínas. El control de la purificación se puede hacer usando electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE), técnicas de transferencia Western o un radioinmunoensayo de otras técnicas estándar de inmunoensayo tales como ELISA.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican análogos de FLINT también se pueden ligar a varios factores de expresión para uso en la transfección de cultivos de células originarias de, por ejemplo, mamíferos, insectos o de plantas. Son ilustrativas de cultivos de células útiles para la producción de péptidos las células de mamíferos. Los sistemas de células mamíferas frecuentemente estarán en forma de monocapas de células, aunque también pueden usarse suspensiones de células de mamíferos. Se han desarrollado en la técnica varias líneas de células hospedantes adecuadas capaces de expresar proteínas intactas, entre ellas las líneas de células AV12, HEK293, BHK21 y CHO. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control tales como un origen de replicación, un promotor (por ejemplo, el promotor VMV, un promotor HSV tk o un promotor pgk (fosfogliceratoquinasa), un intensificador (Queen y otros, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986) y sitios de información de procesamiento, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de unión de RNA, sitios de poliadenilación (por ejemplo, sitio de poli A adición de hormona de bovina de crecimiento) y secuencias de terminación transcripcionales. Hay disponibles otras células de animales útiles para la producción de proteínas de la presente invención, por ejemplo, del Catálogo de la American Type Culture Collection of Cell Lines and Hybridomas (8ª edición, 1994).

Usualmente, los vectores apropiados para expresar un análogo de FLINT de la presente invención en células de insecto derivan de SF9 baculovirus. Entre las líneas de células de insecto adecuadas están incluidas las de larvas de mosquito, gusano de seda, ciertas lombrices, polilla y *Drosophila* (tal como una célula de líneas de Schneider). (Véase Schneider, J. *Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-365 (1987).

Como con las levaduras, cuando se emplean células hospedantes de plantas o animales superiores, típicamente se incorporan en el vector secuencias terminadoras de poliadenilación o transcripción. Un ejemplo de secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona bovina de crecimiento. También se pueden incluir secuencias para una escisión precisa del transcripto. Un ejemplo de secuencia de ajuste es el intrón VP1 de SV40 (Sprague y otros, *J. Virol.* 45:773-781 (1983); Además, se pueden incorporar en el vector secuencias de genes para controlar la replicación en la célula hospedante, secuencias tales como las halladas en vectores del tipo de virus de papiloma. M. Saveria-Campo, *Bovine Papilloma Virus DNA, a Eucariotic Cloning Vector*, en *DNA Cloning*, vol. II, A *Practical Approach*, D.M. Glover, ED. IRL Press, Arlington, VA, págs. 213-238 (1988).

#### *Purificación de las proteínas*

Un análogo de FLINT de la presente invención se puede recuperar y purificar a partir de células recombinantes que expresan un análogo (por ejemplo, cultivos de células de *E. Coli*, levadura, insectos o de mamífero) por procedimientos bien conocidos, incluidos los de precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, incluida la tecnología de péptidos que quelatan iones metálicos inmovilizados. "IMAC", según la patente U.S. nº. 4.569.974; cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía hidrófoba de interacción, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lecitina. Muy preferiblemente, para purificación se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC").

Los análogos de la presente invención se pueden producir por procedimientos químicos de síntesis, o por técnicas recombinantes a partir de una célula hospedante procariótica o eucariótica, incluidas células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero. Tales procedimientos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como el de Sambrook, *supra*, capítulos 17.37-17.42, Ausubel, *supra*, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20. Dependiendo del hospedante empleado, los polipéptidos de la presente invención se pueden glicosilar o no glicosilar. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto inicial de metionina modificado, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedante.

#### *Aplicaciones terapéuticas*

La molécula que desencadena apoptosis, FasL, es un regulador homeostático importante del sistema inmune que desencadena la supresión de la célula T periférica autorreactiva y que amortigua la respuesta inmune mediada por célula (esto es, la muerte de la célula inducida por activación). FasL parece por ello que es un estímulo apoptótico importante en células no inmunes en ciertas condiciones (por ejemplo, inflamación). FasL existe en dos formas: unido a membrana y secretado. El último deriva de la escisión proteolítica y probablemente juega un papel adicional en la inflamación por atraer neutrófilos. La FLINT se une a ambas formas de FasL, inhibiendo la FLINT las interacciones con el receptor de Fas unido a membrana y con LIGHT, un activante secretado de células T y posiblemente también un agente desencadenante para ciertas células cancerosas para morir por apoptosis. La expresión en superficie de células constitutivas de FasL sobre ciertos tejidos conduce a un estado inmune privilegiado, de manera que no se presenta la inmunidad mediada por células, o se presenta débilmente (debido a la destrucción de células invasoras inmunes que presentan Fas en su superficie). Probablemente, la expresión de FasL está regulada en todos los otros tejidos; también están muy reguladas Fas y los inhibidores de las rutas de Fas (por ejemplo, FLIP, FAIM).

Seguidamente hay algunos de los factores y/o condiciones que regulan la expresión de FasL en seres humanos: inflamación (por ejemplo, lesión pulmonar aguda), carcinogénesis (por ejemplo, melanoma, carcinoma de colon), infección viral (por ejemplo, hepatitis C, HIV), manifestaciones autoinmunes (por ejemplo, colitis ulcerosa, tiroiditis de Hashimoto) e isquemia-reperfusión (por ejemplo, lesión de la médula espinal). Indudablemente existen otros muchos reguladores de expresión de FasL y es probable que, en ciertas condiciones, se puedan inducir en cualquier tejido la expresión y secreción de FasL.

Se espera que la utilidad clínica de los análogos de FLINT sea sustancial. Muchas enfermedades y/o afecciones que implican FasL/Fas son potencialmente dóciles a terapia con análogos de FLINT. Entre los ejemplos de enfermedades y/o afecciones adecuadas están incluidas:

*Enfermedades inflamatorias/autoinmunes:* artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de injerto frente a receptor, diabetes dependiente de insulina, SIRS/sepsis/MODS, pancreatitis, psoriasis, esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, rechazo de trasplante, SLE, gastritis autoinmune, enfermedad de pulmón fibrosante.

*Enfermedades infecciosas:* linfopenia inducida por HIV, hepatitis B/C viral fulminante, hepatitis crónica/cirrosis, ulceración H.piloriasociada.

*Afecciones de isquemia/reperfusión:* síndrome coronario agudo, infarto de miocardio agudo, fallo cardíaco congestivo, aterosclerosis, isquemia/infarto cerebral agudo, trauma de cerebro/médula espinal, conservación de órganos durante el trasplante.

*Otras:* citoprotección durante el tratamiento de cáncer, coadyuvante para quimioterapia, Alzheimer, glomerulonefritis crónica, osteoporosis, TTP/HUS, anemia aplásica, mielodisplasia,. También son de interés el tratamiento y la prevención de una lesión pulmonar aguda(ALI)/síndrome de distensión respiratoria aguda (ARDS); colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Los análogos de FLINT inhiben la unión de FAS a FasL y LIGHT a LT $\beta$ R y TR2/receptores de HVEM y se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad o afección que puede estar asociada con tal unión.

La apoptosis de raptó es un ejemplo de una afección causada por una activación excesiva de la ruta de transducción de la señal de Fas/FasL que se puede tratar con los análogos de FLINT de la presente invención (véase solicitud provisional de patente U.S. nº. Serial 60/112.577 presentada el 18 de diciembre de 1998, Kondo y otros, Nature Medicine 3(4): 409-413 (1997) y Galle y otros, J. Exp. Med. 182:1223-1230 (1995)). La apoptosis de raptó conduce a múltiples afecciones patológicas, entre las que están incluidas fallo orgánico, fallo hepático agudo (por ejemplo, fallo del hígado asociado con afecciones virales que afectan al hígado, infecciones bacterianas que afectan al hígado, hepatitis, lesión hepatocelular y/u otras afecciones en las que los hepatocitos experimentan apoptosis masiva o destrucción), fallo renal y fallo de la función pancreática.

Generalmente, los análogos de FLINT de la presente invención son clínicamente y/o terapéuticamente útiles para enfermedades que se pueden tratar con FLINT. (Véase solicitud de patente U.S. nº. Serial 09/280.567; y Miwa y otros, Nature Medicine 4:1287 (1998)). Un ejemplo es la inflamación causada por la activación neutrofílica inducida por FLINT. Las enfermedades inflamatorias asociadas con activación de neutrófilos incluyen sepsis, ARDS, SIRS y MODS.

Entre otras enfermedades para las que es útil un análogo de FLINT están incluidas artritis reumatoide (Elliot y otros, Lancet 344:1105-10 (1994); enfermedad pulmonar fibroproliferativa, enfermedad pulmonar fibrótica, HIV (Dockrell y otros, Clin. Invest. 101:2394-2405 (1998), isquemia (Sakurai y otros, 1998 Brain Res. 797:23-28), trauma/lesión cerebral (Ertel y otros, 1997 J. Neuroimmunol 80:93-6; fallo renal crónico (Schelling y otros, 1998 Lab Invest 78:813-824), enfermedad de injerto frente a receptor (GVHD) (Hattori y otros, 1998 Blood 11:4051-4055), inflamación cutánea (Orteu y otros 1988, J Immunol 161:1619-1729), síndrome de escape vascular (Rafi y otros, 1998 J. Immunol 161:3077-3086), infección pilórica de helicobacter (Rudi y otros, 1998, J. Clin. Invest 102:1506-1514), papeas (Tamura y otros, 1998 Endocrinology 139:3646-3653), aterosclerosis (Sata y Walsh, 1998 J. Clin Invest 102:1682-1689), IDDM (Itoh y otros, 1997 J. Exp med 186:613-618), osteoporosis (Jilka y otros, 1998 J. Bone Min Res 13:793-802), enfermedad de Crohn (van Dullemen y otros, 1995, Gastroenterology, 109:129-35), conservación y trasplante (injerto) de órganos (Lau y otros, 1996 Science 273:109-112), sepsis (Faist y Kim, 1998 New Horizons 6:S97-102), pancreatitis (Neoptolemos y otros, 1998 Gut 42:886-91), cáncer (melanoma, de colon y esófago) (Bennett y otros, 1998 J. Immunol 160:5669-5675), enfermedad autoinmune (IBD, psoriasis, síndrome de Down (Seidi y otros, Neuroscience Lett. 260:9 (1999) y esclerosis múltiple (D'Souza y otros, 1996 J. Exp Med 184:2361-70).

La solicitud de patente U.S. en tramitación nº. serial 09/280567, titulada *Therapeutic Applications of mFLINT Polypeptides*, presentada el 30 de marzo de 1999, describe otras enfermedades que se pueden tratar con análogos de FLINT. Entre los ejemplos figuran la enfermedad de Alzheimer, enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), mononucleosis; EBV; herpes; sitotoxicidad dependiente de anticuerpo, trastornos hemolíticos y de hipercoagulación tales como hemorragias vasculares; DIC (coagulación intravascular diseminada), eclampsia, HELLP (preeclampsia complicada por trombocitopenia, hemólisis y función hepática alterada), HITS (trombocitopenia inducida por heparina), HUS (síndrome urémico hemolítico) y preeclampsia; trastornos hematopoiéticos tales como anemia aplásica, trombocitopenia (TTP) y mielodisplasia; y fiebre hemolítica causada por, por ejemplo, E. Bola.

En el caso de conservación de órganos en la preparación para recogerlos, por ejemplo, el análogo de FLINT es profilácticamente útil para evitar la apoptosis asociada con lesión de reperusión isquémica al órgano una vez que es extraído del donante. Se puede administrar a un donante de órgano, antes de recoger el órgano, un análogo de FLINT. Después de extraído el órgano, se añade análogo de FLINT a un medio adecuado para transportar/almacenar el órgano. Alternativamente, el órgano extraído se perfunde con un medio que contiene un análogo de FLINT antes de trasplantarlo a un receptor. Los medios adecuados para este fin son conocidos, por ejemplo, el medio descrito en la solicitud EP 0356367 A2. El procedimiento puede incluir también tratamiento del receptor del trasplante con un análogo de FLINT antes y/o después de cirugía de trasplante.

Un procedimiento típico implica pretratamiento del donante del órgano con una cantidad efectiva de análogo de FLINT antes de extraer el órgano. Alternativa o conjuntamente, el órgano extraído se puede perfundir o bañar en una solución que contiene análogo de FLINT. Este procedimiento se puede emplear, por ejemplo, con el riñón, corazón, pulmón y otros órganos y tejidos.

La capacidad de los análogos de FLINT de retardar la apoptosis en condiciones isquémicas es útil para preservar órganos y tejidos cosechados para trasplante. Entre las condiciones isquémicas figuran, no limitativamente, isquemia neuronal, lesiones por contusión de un miembro, lesiones de la médula espinal, infarto de miocardio incluido el agudo, secuelas subagudas y crónicas y síndromes clínicos afines, fallo cardíaco congestivo. También se pueden tratar con análogos de FLINT tejidos testigos inocentes que se han lesionado durante la quimioterapia, terapia de radiación, fármacos tóxicos, trauma, cirugía y otras cargas. Un ejemplo de este tipo de enfermedad es la mucositis, que puede ser un efecto lateral mortífero del tratamiento del cáncer.

#### *Lesión pulmonar aguda y síndrome agudo de distensión respiratoria*

La lesión pulmonar aguda (ALI) y el síndrome de distensión respiratoria aguda (ARDS) representan enfermedades que difieren sólo en la severidad de la hipoxemia presente en la diagnosis. Un parámetro ampliamente aceptado para la diagnosis es la relación PaO<sub>2</sub> a FiO<sub>2</sub>, de acuerdo con el cual los pacientes de ARDS manifiestan una relación igual a o menor que 200 mm de Hg, mientras que los pacientes de ALI presentan valores menores que o iguales a 300 mm de Hg. ARDS representa una forma más severa de ALI. Numerosos mediadores contribuyen probablemente a la patogénesis de ARDS/ALI con neutrófilos que desempeñan un papel importante. Si bien son probables múltiples factores de precipitación en el desarrollo de ARDS, tanto directa como indirectamente, parece que la causa más importante es la sepsis y el síndrome de respuesta sistémica inflamatoria, responsables de aproximadamente 40% de los casos. La mortalidad en ARDS es alta, aproximadamente de 40%, ocurriendo la mayoría de las muertes dentro de las primeras 2 a 6 semanas. Actualmente no hay disponible una terapia farmacológica aprobada para ARDS y en la actualidad el tratamiento está limitado a un agresivo cuidado de soporte.

Hay evidencia de que ARDS puede ser mediada por la interacción de FasL soluble/Fas en seres humanos (Matute-Bello y otros, Immunol 163, 2217-2225, 1999). Un análogo de FLINT, uniéndose a FasL, podría inhibir la apoptosis mediada por FasL de neumocitos y/o células endoteliales, inhibiendo o previniendo así la progresión de un insulto inflamatorio agudo a ALI y de ALI a ARDS.

Por tanto, en otra realización, la presente invención se refiere al uso de análogos de FLINT de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de ALI y/o ARDS.

#### *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica*

La enfermedad obstructiva crónica (EPOC) es la cuarta causa importante de muerte no accidental en EE.UU. después de las enfermedades cardíacas, el cáncer y la enfermedad cerebral vascular. EPOC es un trastorno obstructivo de las vías respiratorias que abarca múltiples afecciones, incluidas bronquitis crónica, enfisema, broncoectasis y asma crónica. EPOC es lentamente progresiva y produce un declive irreversible de la función pulmonar. La hipoxemia crónica y la hipercapnia son manifestaciones eventuales del trastorno. El mecanismo por el que EPOC altera la función pulmonar parece que implica apoptosis desregulada. Las muestras de plasma de pacientes que tienen EPOC presentan concentraciones más altas de Fas soluble que sujetos sanos de control. (Véase Yasuda y otros, Resp. Med. 92, 993-999, 1998). Los niveles incrementados de Fas soluble en pacientes con EPOC pueden reflejar apoptosis incrementada inducida por Fas.

Los análogos de FLINT de la presente invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o inhibición de EPOC.

#### *Fibrosis pulmonar (PF)*

La fibrosis pulmonar (también conocida como enfermedad de pulmón fibrosante) se presenta como un resultado final del proceso de pretendida curación durante una lesión pulmonar aguda y crónica. El mecanismo patológico de tal lesión pulmonar puede ser cualquiera de los varios factores que desencadenan primeramente una respuesta inflamatoria en los alveolos o intersticios circundantes y posteriormente desencadenan fibrosis alveolar/intersticial (esto es, la respuesta reparadora). La fibrosis en otros tejidos tales como epidermis o peritoneo conduce a cicatrices o adherencias, respectivamente. A diferencia, la fibrosis pulmonar conduce a una enfermedad restrictiva del pulmón (capacidades aminoradas del pulmón y difusión aminorada del oxígeno). Entre las afecciones asociadas con la fibrosis pulmonar

están incluidas, no siendo las únicas: fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, lupus, escleroderma), enfermedad pulmonar inducida por fármacos (por ejemplo, bleomicina), neumoconiosis (por ejemplo, asbestosis), sarcoidosis, granulomatosis eosinofílica, neumonitis de hipersensibilidad y otras enfermedades asociadas con una inflamación pulmonar severa que puede dar por resultado una lesión pulmonar aguda y/o síndrome de distensión respiratoria aguda (por ejemplo, trauma, sepsis, ahogo, aspiración gástrica, shock, etc). La fibrosis en vías respiratorias es también una señal de la inflamación crónica en CODP.

La etiología de la PF puede implicar apoptosis desencadenada por FasL/Fas. De hecho, es esencial un sistema intacto FasL/Fas en la etiología de PF en ratones inducida por bleomicina. (Véase Kuwano J. y otros, J. Clin. Invest. 104, 13-19 (1999).

Los análogos de FLINT de la presente invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la inhibición de PF. Por ejemplo, un análogo de FLINT se puede administrar precisamente en el momento de un insulto inflamatorio en el pulmón (por ejemplo, durante el tratamiento con bleomicina) para prevenir que se produzca PF.

Un "sujeto" es un mamífero que necesita tratamiento, preferiblemente un ser humano, pero también puede ser un animal que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, etc.), animales de corral (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, etc.).

Una "cantidad eficaz" de un análogo de FLINT es una cantidad que da por resultado una inhibición suficiente de uno o varios procesos mediados por la unión de Fas a ligando de Fas o LIGHT a LT<sup>®</sup>R y/o TR2/HVEM de manera que se logre un efecto terapéutico o profiláctico deseado en un sujeto con una enfermedad o afección asociada con una unión FAS/ligando de FASS aberrante y/o unión mediada por LIGHT. Un ejemplo de un proceso así es la apoptosis de fuga. Alternativamente, una "cantidad eficaz" de un análogo de FLINT es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado en un sujeto con inflamación causada por activación neutrófila inducida por ligando de FAS o cualquiera de las otras enfermedades asociadas con actividad del ligando de FAS aberrante.

Un "efecto terapéutico y/o profiláctico deseado" en un sujeto con una enfermedad o afección incluye la mejora de síntomas, o retraso en la aparición de síntomas, asociados con tal enfermedad. Alternativamente, un "efecto terapéutico y/o profiláctico deseado" incluye un aumento del grado de supervivencia o de longevidad del sujeto con la enfermedad.

La cantidad de análogo de FLINT administrada al individuo dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a fármacos. Dependerá también del grado, gravedad y tipo de enfermedad. El experto será capaz de determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores.

Como propuesta general, la cantidad total farmacéuticamente eficaz de análogos de FLINT de la presente invención administrada parenteralmente por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día de peso corporal del paciente, en particular de 2 mg/kg/día a 8 mg/kg/día, más en particular, de 2 mg/kg/día a 4 mg/kg/día, aún más particularmente, de 2,2 mg/kg/día a 3,3 mg/kg/día y, finalmente, 2,5 mg/kg/día, aunque, como se ha indicado antes, esto estará sometido a discreción terapéutica. Más preferiblemente, esta dosis es de, como mínimo, 0,01 mg/kg/día. Si se administran continuamente, los análogos de FLINT de la presente invención típicamente se administran a una velocidad de administración de aproximadamente 1 µg/kg/h a aproximadamente 50 µg/kg/h, bien en 1-4 inyecciones al día o bien mediante infusión subcutánea continua, por ejemplo usando una minibomba. También se puede emplear una solución intravenosa en bolsa. La duración necesaria del tratamiento para observar cambios y el intervalo que sigue al tratamiento para que se produzcan respuestas varían dependiendo del efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas que contienen análogos de FLINT de la presente invención se pueden administrar oralmente, rectalmente, intracranalmente, parenteralmente, intracisternamente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (como por polvos, ungüentos, gotas o parches transdérmicos), transdérmicamente, intratecalmente, bucalmente, o como proyección oral o nasal. Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga, un diluyente, un material de encapsulación o una formulación auxiliar de cualquier tipo, sólida, semisólida o líquida, no tóxica. El término "parenteral", tal como se usa en esta memoria, incluye, no exclusivamente, modos de administración por inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular, por infusión e implantes que comprenden análogos de FLINT.

Los análogos de FLINT de la presente invención se administran también adecuadamente por sistemas de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida figuran matrices polímeras semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o semicápsulas. El grupo de matrices de liberación sostenida incluye poliláctidos (patente U.S. n.º. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo (Sidman, U. Y otros, Biopolymers 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (R. Langer y otros, J. Biomed. Res. 15:167-277 (1981) y R. Langer, Chem. Tech, 12:98-105 (1982)), acetato de etilenvinilo (R. Langer y otros, id.) o poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico) (EP 133.988). Otras composiciones de liberación sostenida incluyen también un análogo de FLINT atrapado liposomalmente. Tales liposomas se preparan por procedimientos conocidos *per se*: documento DE 3.218.121; Epstein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang y otros Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046;

EDP 134.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes U.S. n<sup>os</sup>. 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324. Ordinariamente, los liposomas son del tipo de unilamina pequeña (aproximadamente 200-800 angstroms) en los que el contenido de lípido es mayor que aproximadamente 30% en mol de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima de polipéptido de TNFR.

Para administración parenteral, los análogos de FLINT de la presente invención se formulan generalmente por mezcla al grado de pureza deseado, en una forma inyectable de unidosis (solución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, esto es, un vehículo que no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que es compatible con los otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, preferiblemente, la formulación no contiene agentes oxidantes y otros compuestos que se conoce que son perjudiciales para los polipéptidos.

Generalmente las formulaciones se preparan poniendo en contacto los análogos de FLINT de la presente invención, uniforme e íntimamente, con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o con vehículos de ambos tipos. Si es necesario, el producto se integra en la formulación deseada. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferiblemente una solución isotónica con la sangre del receptor. Entre los ejemplos de tales vehículos figuran agua, solución salina, solución de Ringer, una solución de dextrosa. También son útiles al efecto vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo, así como liposomas.

Es adecuado que el vehículo contenga cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que intensifican la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales son no tóxicos para el receptor a las dosificaciones y concentraciones empleadas y entre ellos figuran tampones tales como los de fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluida celulosa y sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelatantes tales como EDT; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio, y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG.

Los análogos de FLINT de la presente invención típicamente se formulan en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Ha de saberse que el uso de algunos de los excipientes, vehículos o estabilizadores anteriores dará por resultado la formación de sales de los análogos de FLINT de la presente invención.

Los polipéptidos a usar para administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se logra fácilmente por filtración a través de membranas estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Las composiciones terapéuticas de polipéptidos generalmente se ponen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de una solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede traspasar una aguja de inyección hipodérmica.

Ordinariamente, los análogos de FLINT se almacenarán en recipientes de unidosis o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas cerradas o viales, como solución acuosa o como formulación liofilizada para reconstitución. Como ejemplo de formulación liofilizada, viales de 10 ml se llenan con 5 ml de solución acuosa al 1% p/p esterilizada por filtración de uno de los análogos de FLINT de la presente invención, y la mezcla resultante se liofiliza. La solución para infusión se prepara por reconstitución del polipéptido liofilizado usando agua para inyección bacteriostática.

Se describen en esta memoria paquetes farmacéuticos o kits que comprenden uno o más recipientes llenos de uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Acompañando a este(os) recipientes puede estar un folleto prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, folleto que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración humana. Además, los análogos de FLINT de la presente invención se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

La invención se ilustra con los ejemplos siguientes cuya finalidad no es, en forma alguna, limitar la invención.

#### Ejemplo 1

##### *Producción de un vector para expresar el análogo de FLINT R218Q*

La variante de FLINT R218Q se construyó por PCR mutagénica a partir de una plantilla de FLINT de tipo salvaje. Véase, por ejemplo, Saiki R.K. y otros, Science 239:487-491 (1988) y *Curent Protocols in Molecular Biology*, vol. 1, sección 8.5.7 (John Wiley and Sons, Inc. Publishers), El mutante R218Q sustituye un resto de arginina hallado en el aminoácido 218 con glutamina.

El procedimiento mutagénico de PCR utilizó una reacción de SOEing (esto es, extensión de cadena con solapamiento) para crear mutaciones específicas en la plantilla de FLINT nativa con el fin de cambiar la secuencia de aminoácido en la posición 218 e introducir etiquetas de enzimas de restricción a fines de identificación.



## ES 2 291 197 T3

Generalmente, las reacciones de SOEing requieren el uso de cuatro cebadores, dos en la orientación de avance (denominados A, SEQ ID n°. 5 y SEQ ID n°. 7) y dos en la orientación inversa (denominados B, SEQ ID n°. 6 y D, SEQ ID n°. 8). La reacción de SOEing amplifica una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de gen) en dos etapas. La primera etapa es amplificar “la mitad” del gen efectuando una reacción A a B seguida de una reacción separada de C a D. Al construir el mutante R218Q, los cebadores B y C apuntaban a la misma zona del gen pero en cadenas opuestas. El cebado con ajuste desigual de ambos cebadores de oligonucleótidos instituye la mutación. Después de que finalizaran ambas reacciones, se aislaron y mezclaron los productos para uso como plantilla de la reacción A a D, que da el producto mutado deseado.

Los cebadores implicados en la clonación de R218Q eran:

Cebador A: CF 107 (39 nt)

GCACCAGGGTACCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCG

Cebador B: CF 111 (44 nt)

TCAGCTGCAAGGCGGCGGCCCGCTTGTGGTGTCTGGACCCCAG

Cebador C: CF 112 (44 nt)

GGGGTCCGACACCACAAGCGGGGCGCGCCGCCTTGCAGCTGAAG

Cebador D: CF 110 (43 nt)

GCACAGAATTCATCAGTGCACAGGGAGGAAGCGCTCACGGACG

Los nucleótidos escritos en negrillas representan cambios hechos en la secuencia de tipo salvaje. Usando el cebador de avance C como referencia, las negritas G y C presentan los cambios silentes necesarios para introducir un sitio Ascl. Este sitio de reconocimiento está subrayado en los cebadores B y C. La negrilla CAA presenta la sustitución de glutamina (CAA) por arginina (AGG).

El fragmento amplificado del par de base 311 que presenta la mutación de R218Q se subclonó usando un sitio 5' KpnI (GGTACC) y un sitio 3'EcoRI (GAATTC). La secuencia de FLINT nativa tiene un sitio interno KpnI natural en torno a la posición 176 de aminoácido. El sitio EcoRI se introdujo al fin de subclonar y está corriente debajo de los codones de parada. Estos sitios están subrayados como cebadores A y D respectivamente. El fragmento de 311 bp se incorporó a la secuencia de FLINT de longitud entera. Esto se realizó en las etapas siguientes:

I. El fragmento de 311 bp se puso en un vector intermedio, pCR2.1-TOPO, que utiliza la adenina establecida en saliente después de la PCR para ligación.

II. Una vez incorporado, una digestión de KpnI a EcoRI eliminó un fragmento de 289 bp. (Nota: el tamaño del fragmento de PCR disminuyó de 311 bp a 289 bp debido a la digestión). El fragmento mutado se usó para reemplazar el correspondiente segmento en el gen de FLINT de tipo salvaje por ligación direccional.

III. Se digirió FLINT/pJB03 con KpnI a EcoRI para producir dos fragmentos:

Fragmento 1: 6070 bp

Fragmento 2: 289 bp

IV. El fragmento de 6070 bp que presentaba el gen de FLINT se aisló y ligó con el producto de PCR de 289 bp eliminado del vector pCR2.1-TOPO para crear R218Q/pJB03. Por digestión de restricción se identificaron clones positivos y posteriormente se confirmó por análisis de secuencia.

El análogo R218Q contenido en R218Q/pJB03 se llevó al vector pIG3 mediante una ligación no dirigida de NheI a XbaI. R218Q/pJB03 se digirió con NheI a XbaI para que resultaran fragmentos de 932 y 5427 bp. Se aisló el fragmento que contenía FLINT R218Q de 932 bp. El fragmento de NheI de 932 bp y XbaI de R218Q se ligó con el vector pIG 3 linearizado de 8510 bp para generar clones en las orientaciones de avance e inversa.

### Ejemplo 2

#### *Expresión procariótica y purificación de análogos de FLINT recombinantes*

Un vector de expresión que presenta un marco de lectura abierta (ORF) que codifica el análogo de FLINT R218Q se transforma en la cepa BL21 de *E. coli* competente (DE3) (hsdS gal clts857 ind1Sam7nin5lacUV5-T7 gen 1) asequible de Novagen (Madison WI) usando procedimientos estándar. Se escogieron al azar múltiples transformantes atendiendo a la resistencia a la canamicina y se usaron para inocular medios de LB/canamicina. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C con sacudidas a una densidad de OD<sub>600</sub>=0,8-1,0, y en este momento se indujo con IPTG 1 mM la síntesis de proteína de FLINT. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C durante 3 h de posinducción antes de cosechar las células.

## ES 2 291 197 T3

El producto análogo de FLINT codificado por ORF nacido en vector se purificó de la fracción insoluble de lisado de células, los cuerpos de inclusión. En resumen, la purificación consistió en la preparación y solubilización de cuerpos de inclusión y el repliegue de proteínas por procedimientos de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaños, respectivamente.

5

### Ejemplo 3

#### *Construcción del vector pIG3 para expresión de análogos de FLINT en células de mamíferos*

10 Se construye un vector de expresión bicistrónico por inserción en el vector de expresión mamífero pGTD (Gerlitz, B. y otros, 1993, Biochemical Journal 295:131) de un fragmento de PCR que codifica un “sitio de entrada de ribosoma interno”/polipéptido fluorescente verde intensificado (IRES/eGFP). Este nuevo vector, designado PIG3, contiene las siguientes hitos de secuencia: el promotor GBMT correspondiente a Ela (D.T. Berg y otros, 1993 BioTechnics 14:972; D.T. Berg y otros, 1992 Nucleic Acids Research 20:5485); un sitio de clonación múltiple (MCS); la secuencia de IRES del virus de encefalomiocarditis (EMCV); la secuencia de codificación de eGFP (Cormack y otros, 1996 Gene 173:33, Clontech); las secuencias de sitio de ajuste de antígeno “t” pequeño de SV40/poliadenilación; el promotor precoz de SV40 y origen de replicación; el código de secuencia de la dihidrofolato reductasa de murino (dhfr); y el gen de resistencia a la ampicilina y origen de replicación de pBR32.

20 Sobre la base de la secuencia de cDNA de FLINT humana se sintetizan los cebadores de avance e inverso que presentan sitios de restricción BclI en sus respectivos extremos 5'. Estos cebadores se usan para amplificar por PCR el cDNA de análogo de FLINT. La orientación de cDNA de FLINT humana y la secuencia de nucleótidos se confirman por digestión de restricción y secuenciación de la cadena doble del inserto. El producto de PCR del análogo de FLINT amplificado de aproximadamente 900 pares de base se digirió con NheI y XbaI de endonucleasas de restricción, 25 respectivamente, para generar un fragmento que presenta extremos pegajosos de NheI y XbaI. Este fragmento se ligó posteriormente en un único sitio de pLG3 para generar plásmido recombinante pLG3-FLINT. El inserto que codifica el análogo se puede modificar en el término C del análogo para introducir una casete de hexahistidina escindible (His6) para facilitar la purificación del análogo.

### 30 Ejemplo 4

#### *Aislamiento de clon de análogo de FLINT de producción alta a partir de transfectantes AV12 RGT18*

35 El plásmido recombinante que porta el gen de FLINT codifica resistencia al metotrexato. Además, la construcción contiene un gen que codifica un polipéptido fluorescente, GFP, en el mismo transcripto e inmediatamente 3' al gen de FLINT. Puesto que un alto nivel de expresión de GFP requeriría un nivel alto de expresión del mRNA de FLINT-GFP, clones muy fluorescentes tendrían una probabilidad mayor de producir niveles altos de FLINT.

40 Se transfectan células de AV12 RGT18 usando un procedimiento con fosfato cálcico con plásmidos pIG1 recombinantes que contienen análogos de FLINT. Se seleccionan y reúnen células resistentes a metotrexato 250 nM. La combinación de clones resistentes se somete a clasificación asistida por fluorescencia (FACS) y las células que tienen valores de fluorescencia en la cima del 5% de la población se clasifican en una combinación y como células individuales. Las combinaciones de alta fluorescencia se someten a dos ciclos sucesivos de clasificación. Se analizan por ELISA en cuanto a la producción de análogo de FLINT combinaciones y clones individuales de los ciclos primero y 45 segundo. Las combinaciones o clones que expresan análogo de FLINT al nivel más alto se usan para afinamiento y purificación de análogo de FLINT.

### Ejemplo 5

#### 50 *Cuantificación de análogos de FLINT*

Los análogos de FLINT se pueden cuantificar en medios en bruto de células transfectadas y durante el procedimiento de purificación por ELISA desarrollada para FLINT. ELISA usa anticuerpo policlonal TKD-028(1494) anti-FLINT como anticuerpo de captura y TKD-078A anti FLINT biotinilado como un anticuerpo primario en un ensayo 55 “sandwich”. ELISA se desarrolla por peroxidasa de rábano amargo de caballo derivatizada de estreptavidina (SA-HRP) usando OPD como sustrato y controlando la absorbancia a 490 mn. El intervalo útil de una ELISA así es de 0,2-20 ng/ml.

### Ejemplo 6

60

#### *Análogos de FLINT inhiben la apoptosis de células de Jurkat inducida por FasL*

Se realizó un bioensayo que mide la prevención de apoptosis (esto es, supervivencia de células) usando FLINT y una variedad de análogos de FLINT producidos en cultivo de células mamíferas. A este fin se añadieron 25  $\mu$ l de células de Jurkat ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se mezclaron con 25  $\mu$ l de FasL recombinante humano (concentración final 150 ng/ml) y 50  $\mu$ l de FLINT o análogo de FLINT. Se ensayaron diluciones 65 seriales variables de 0 a 1 mg/ml. Se incubaron las células a 37°C durante la noche. A cada pocillo se añadieron 20  $\mu$ l de compuesto de MTS tetrazolio (Promega Corporation, Madison, WI) y la incubación se efectuó durante 2 h a 37°C.

## ES 2 291 197 T3

Se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas.

Los resultados se resumen en la Tabla siguiente y en las Figs. 2-4. Los análogos que cambiaban arginina en glutamina en la posición 218 presentaban actividad en este ensayo. La bioactividad no era función del tipo de célula de la que se preparó la muestra. Por ejemplo, R218Q purificada de células AV12 (Fig. 2) o de células de 293 EDNA (Fig. 3) fueron activas en el ensayo.

Un análogo doble mutante que reemplazó treonina en la posición 216 con prolina y arginina en la posición 218 con glutamina fue activo en el ensayo. También fue activo el análogo multisustituido [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q] en este ensayo (Fig. 4)

FLINT/análogo de FLINT	Inhibición de apoptosis de células de Jurkat
FLINT	++
R218Q	++
R34N, D36T, R218Q	+
R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q	+
T216P, R218Q	++

Ejemplo de referencia 7

*Ensayo de análogos de FLINT para inhibición de apoptosis de células de Jurkat inducida por FasL*

Se realiza un bioensayo que mide al prevención de apoptosis (esto es, supervivencia de células) usando FLINT y una variedad en análogos de FLINT (véase la siguiente Tabla) producidos en cultivo de células mamíferas. Los análogos de FLINT a ensayar incluyen: G214(1), G214(2), G214(3), G214(4), G214(5); P215(1), P215(2), P215(3), P215(4), P215(5); T216(1), T216(2), T216(3), T216(4), T216(5); P217(1), P217(2), P217(3), P217(4), P217(5); R218(1), R218(2), R218(3), R218(4), R218(5); A219(1), A219(2), A219(3), A219(4), A219(5); G220(1), G220(2), G220(3), G220(4), G220(5); R221(1), R221(2), R221(3), R221(4), R221(5); A222(1), A222(2), A222(3), A222(3), A222(4), A222(5). Los números entre paréntesis designan subgrupo de aminoácidos específicos como sigue, con tal que el resto de reemplazo no sea el mismo que el de FLINT nativo.

(1) cualquiera de los 20 aminoácidos naturales;

(2) Asp o Glu;

(3) His, Arg o Lys;

(4) Cys, Thr, Ser, Gly, Asn, Gln, Tyr;

(5) Ala, Pro, Met, Leu, Ile, Val, Phe, Trp.

A este fin se añadieron 25  $\mu$ l de células de Jurkat ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se mezclaron con 25  $\mu$ l de FasL recombinante humano (concentración final 150 ng/ml) y 50  $\mu$ l de FLINT o análogo de FLINT. Se ensayaron diluciones seriales variables de 0 a 1 mg/ml. Se incubaron las células a 37°C durante la noche. A cada pocillo se añadieron 20  $\mu$ l de compuesto de MTS tetrazolio (Promega Corporation, Madison, WI) y la incubación se efectuó durante 2 h a 37°C. Se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas.

Ensayo de análogos de FLINT representativos para actividad biológica
--

<p>G214D, G214H, G214T, G214A</p> <p>P215D, P215H, P215T, P215A</p> <p>T216D, T216H, T2216S, T216A</p> <p>P217D, P217H, P217T, P217A</p> <p>A219D, A219H, A219T, A219M</p> <p>G220D, G220H, G220T, G220A</p> <p>R221D, R221H, R221T, R221A</p> <p>A222D, A222H, A222T, A222M</p>
--

## Ejemplo 8

*Purificación a gran escala de polipéptidos de análogo de FLINT*

Se produce a gran escala análogo de FLINT (que contiene una etiqueta de 6 histidina) haciendo crecer masas estables en botellas rodillo. Después de alcanzar confluencia, las células se cultivan más en medio exento de suero durante 5-7 días para secretar en el medio cantidades máximas de FLINT. El medio que contiene análogo de FLINT se concentra a 350 ml en un sistema de filtración tangencial Amicon ProFlux M12. El medio concentrado se hace pasar sobre una columna IMAC (cromatografía inmovilizada de afinidad de metal) (Pharmacia, columna de 5 a 10 ml) a un caudal de 1 ml/min. La columna se lava con tampón A (PBS, NaCl 0,5 M, pH 7) hasta que la absorbancia (280 nm) retornó a la línea de base y el polipéptido unido se eluyó con un gradiente lineal de imidazol de 0,025 M-0,5 M (en tampón A) desarrollado durante 60 min. Se combinan las fracciones que contienen el análogo de FLINT. Este material se hace pasar sobre una columna de benzamidina-sefarosa (1 a 5 ml) para eliminar la trombina a un caudal de 1 ml/min. El flujo de la columna que contiene el análogo de FLINT se concentra a 2 ml usando una unidad de filtración centrífuga Ultrafree (Millipore). Este material se hace pasar sobre una columna de clasificación 16/60 Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con PBS, NaCl 0,5 M, pH 7,4. Las fracciones que contienen el análogo de FLINT se analizan por SDS-PAGE y la secuencia N-terminal del polipéptido purificado confirmó que era FLINT.

## Ejemplo 9

*Caracterización biofísica de análogos de FLINT purificados*

La integridad estructural y la estabilidad química de los análogos de FLINT se caracterizan como sigue:

El análisis estructural de las proteínas incluye la estimación de la estructura secundaria normalmente obtenida por análisis de UV lejano CD. Usualmente se usan 100  $\mu$ l de 1 mg/ml de análogo de LINT en tampón de fosfato, pH 7,4, para barrer una anchura de banda de 1 nm de 140-180 nm en etapas de 0,5 nm, con un tiempo constante de 3 s, una media de 3 barridos en una celda de 0,01 cm a temperatura ambiente. Se obtienen espectros de UV cercano CD que dan información sobre la estructura terciaria de 240-350 nm, etapas de 0,5 nm, anchura de banda, 5 s de tiempo constante, con una media de 3 barridos a temperatura ambiente.

Se mide la fluorescencia intrínseca de triptófano con los siguientes parámetros: excitación a través de una célula de 1 cm de longitud de paso a 298 nm con una anchura de ranura de 2/2 nm, con emisión recogida a 305-400 nm con anchura de ranura de 2/2 nm, etapa de 0,5 nm, a través de una longitud de paso de 0,4 cm con 1 s de tiempo de integración. Generalmente, un “desplazamiento azul” es indicador de que los restos aromáticos están enterrados más profundamente en la estructura de la proteína y frecuentemente están acompañados de propiedades farmacéuticas mejoradas.

La estructura cuaternaria de los análogos de FLINT se puede examinar por análisis de sedimentación en equilibrio realizado en una ultracentrifugadora con celdas de 3 mm de ancho. Se prefieren análogos de FLINT con valores de sedimentación en equilibrio similares comparativamente a los de análogos de FLINT nativos.

El análisis de la estabilidad física incluye el examen de la propensión a la agregación de los análogos de FLINT como reflejo de sus propiedades de superficie. En los párrafos siguientes se describen ensayos de estabilidad física.

*Ensayo de dispersión dinámica de luz (DLS):* Se diluye una solución de análogo de FLINT en (a) PBS, pH 7, o (b) PBS, NaCl 0,5 M o (c) PBS, pH 7,4 y 3 mg/ml de m-cresol, que contenía de 0,1 a 5 mg/ml de proteína. El pH

## ES 2 291 197 T3

se ajusta a 7,4 (+ 0,05) con HCl/NaOH y se filtra a un tubo de ensayo de vidrio tipo I de borosilice, de 6 x 50 mm. Se recoge el tamaño de partícula ponderal medio de intensidad de dispersión de la luz en un instrumento Brookhaven B1900 constituido por un goniómetro a un ángulo de 90°, correlator digital y un láser iónico de argón Lixel modelo 3500 ajustado a la línea de 488 nm. Se analiza por el procedimiento de acumulación la función C(t) de autocorrelación determinada experimentalmente para obtener el diámetro hidrodinámico. El tiempo antes de un cambio significativo del tamaño de partícula o tiempo de demora se determina por ajuste de trazos lineales a los datos de puntos de fase de precrecimiento y crecimiento. La intersección se define como tiempo de demora. Generalmente, una dispersión de la luz aminorada por un análogo en comparación con FLINT nativa a la misma concentración y temperatura es indicativa de estabilidad física.

*Calorimetría diferencia de barrido (DSC):* La estabilidad física se refleja también en la temperatura de fusión (p.f.) de la proteína por DSC (calorimetría diferencial de barrido). Usualmente, el barrido de análogos de FLINT se hace desde 5° a 100°C con una velocidad de barrido de 60°C/h y un parámetro de filtración de 16 segundos. Generalmente, temperaturas de fusión más altas son indicativas de estabilidad física.

La estabilidad química de análogos de FLINT diluidos a 5 mg/ml se controla por análisis por HPLC en fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de exclusión de tamaños. El procedimiento en fase inversa está constituido por sistemas de gradiente de acetonitrilo/TFA optimizados para FLINT con detección a 214 nm usando una columna Zorbex 300SB-CB a 40°C. El procedimiento de exclusión de tamaños está constituido por una fase móvil de PBS a pH 7,4 en una columna Superdex-75 (3,2x300 mm) a temperatura ambiente. Generalmente, los cambios en el cromatograma de fase inversa son indicativos de inestabilidad química.

### Ejemplo 10

#### *Ensayo in vivo de análogos de FLINT para tratamiento de una lesión del hígado*

Se indujo *in vivo* una lesión del hígado en un modelo de ratón usando el procedimiento de Tsuji H. y otros, 1997, *Infection and Immunity*, 65(5): 1892-1898. Se retó a los ratones con una dosis baja de lipopolisacárido (LPS) para inducir lesión hepática aguda y masiva. Se determinó la capacidad de FLINT y análogos de FLINT de proteger frente a la inflamación aguda y la apoptosis. En resumen, se administraron intravenosamente (vena lateral de la cola) a ratones BALBc (Harlan) inyecciones de 6 mg de D-(+)-galactosamina (Sigma, 39F-0539) en 100 µl de PBS (GIBCO-BRL) y 3 µg de lipopolisacárido B de *E. Coli* 026.B6 (LPS) (Difco, 3020-25-2) en 100 µl de PBS. Después del reto con LPS, se administró a los animales por vía intravenosa FLIN (1-200 µg) o un análogo de FLINT (1-200 µg) 4 horas después del tratamiento con LPS. Los grados de supervivencia de los ratones se determinaron después de 48 horas (véase Fig. 7).

Se observó una correlación entre el porcentaje de supervivencia de los animales y la cantidad de FLINT o análogo administrada. En un estudio que involucraba 5 animales por grupo de ensayo, los análogos R218Q y [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q] protegían los animales frente a la lesión del hígado de una manera dependiente de la dosis (véase Fig. 7). En un segundo experimento, que involucraba 10 animales por grupo de ensayo, sobrevivían 7 de 10 animales a las 24 horas después del tratamiento con FLINT, R218Q y [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q]. A las 24 horas después del tratamiento 7 de 10 animales sobrevivían con tratamiento de FLINT, y 6 de 10 animales sobrevivían con R218Q o [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q].

### Ejemplo 11

#### *Ensayo de unión de análogo de FLINT/ligando de FAS*

Se puede confirmar la unión entre análogos de FLINT y ligando de Fas y se pueden determinar las propiedades de unión (por ejemplo, cinética, especificidad, afinidad, cooperatividad, patrón relativo de unión) usando análisis de interacción biomolecular en tiempo real (en lo que sigue, BIA). Para controlar interacciones biomoleculares, BIA usa resonancia óptica de plasmón de superficie. La detección de interacciones de unión depende de cambios en la concentración de masa de macromoléculas en la interfaz bioespecífica. Se usaron los materiales y procedimientos siguientes:

Dispositivo Biacore® 2000 (Biacores AB, Rapskatan 7, S-754 50 Uppsala, Suecia Chip sensor CM5 (Biacore)

Kit de acoplamiento de amina (Biacore)

Tampón de lavado: HBS-EP (Biacore)

Solución de isotiocianato de guanidina (GibcoBRL)

Ligando de Fas (Kamiya Biomedical Company, 910 Industry Drive, Seattle, WA 98100)

Análogos de FLINT

Quimeras de Fas/Fc (R&D Systems)

## ES 2 291 197 T3

### *Protocolo de inmovilización*

Se inmoviliza FasL o el análogo de FLINT a través de su grupo amina primaria sobre restos de lisina en polímero de carboximetildextrano unido a una superficie de oro (Sensor Chip CM5). La inmovilización se realiza usando el kit de acoplamiento de amina (Biacore) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, 100  $\mu$ l de solución de FasL o análogo de FLINT (10-25  $\mu$ g/ml en tampón de acetato 20 mM, pH 5,0) se carga en un chipo CM5 activado. Después de acoplamiento, se desactiva el exceso de grupos reactivos de la superficie con hidrocloreto de etanolamina 1 M, pH 8,5. Luego se lava el chip con tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5,0, para eliminar material unido no covalentemente.

### *Análisis de interacción*

Para analizar la interacción entre FasL y los análogos de FLINT, se hacen pasar soluciones que contienen análogos de FLINT sobre el chip que contiene FasL y se inmovilizan sobre él. La cantidad de análogo de FLINT asociado con FasL se determina midiendo la señal de resonancia de plasmón de superficie (en unidades de respuesta, RU). Típicamente, se cargan sobre el chip sensor durante 10 min, a un caudal de 5  $\mu$ l/min, soluciones de análogo de FLINT a diferentes concentraciones en tampón de HBS-ET. Luego se lava el chip con tampón de HBS-Et (Hepes 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P20) durante 2 min a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Se regenera luego la superficie bioactiva del chip por exposición a isotiocianato de guanidina 0,8 M durante 2 min a un caudal de 5  $\mu$ l/min y luego con tampón de HBS-EP durante 2 min a un caudal de 5  $\mu$ l/min.

También se puede hacer la reacción inversa en la que una solución de FasL se hace pasar por un chip de tiene un análogo de FLINT inmovilizado en él. La cantidad de FasL asociada con el análogo de FLINT se determina usando señal de resonancia de plasmón de superficie (en unidades de respuesta, RU).

### *Determinación de constantes de actividad*

Se evalúan los datos y se determinan los parámetros de unión usando software 3.02 de evaluación por BIA (Biacore). Se determinó la Kd para la interacción entre FLINT y FasL y se determinó Fas usando los protocolos descritos antes. Los resultados se indican seguidamente:

### *Moléculas de interacción*

Kd inmovilizada (nM)-	en solución
Ligando de Fas (monómero)- 1,13x10 <sup>-7</sup>	FLINT
Ligando de Fas (monómero)- 1,62x10 <sup>-7</sup>	Fas
Análogo de FLINT- 0,63x10 <sup>-9</sup>	ligando de Fas (trímero)

### *Ejemplo 12*

#### *Digestión analítica con trombina de FLINT y análogos de FLINT*

En tubos de reacción separados se incubaron 1  $\mu$ g de FLINT y 1  $\mu$ g de los análogos de FLINT R218Q, [R34N, D36T] y [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q] en un tampón que contenía Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 o PBS; NaCl 0,5 M, 10% de glicerol y trombina en una proporción ponderal de 1 a 100 (trombina a FLINT/análogo). Las mezclas de reacción se incubaron durante tiempos variables a 25°C o 37°C. Se analizaron partes alícuotas de las mezclas de reacción por SDS-PAGE para detectar escisión en la posición 218. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Como se esperaba, la FLINT fue digerida por trombina para producir el metabolito de FLINT. Por ejemplo, a los 50 min, se proteolizó casi la mitad de FLINT y un análogo de control [R34N, D36T], en 4 h se proteolizó más de 90%. A diferencia, no se detectó proteólisis en la posición 218 en muestras de los análogos R218Q y [R34N, D36T, D194N, S196T, R218Q] incluso fuera del punto de tiempo de 4 horas (Fig. 1).

### *Ejemplo 13*

#### *Estabilidad metabólica in vitro del análogo de FLINT R218Q*

Se suministró FLINT derivada de células AV12 como solución de 0,16 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato/NaCl 0,5 M/10% de glicerol. Se suministró análogo de FLINT (R218Q) derivado de células 293 EBNA como solución de 0,12 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato/NaCl 0,5 M/10% de glicerol. Los materiales se almacenaron a 4°C hasta que se usaron. FLINT y el análogo de FLINT (R218Q) se radiomarcaron con <sup>125</sup>I-NaI usando

el reactivo de yoduración IODO-BEADS (PIERCE). Los artículos de ensayo radiomarcados eran precipitables en más de 90% en ácido trifluoroacético. Las proteínas radiomarcadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para los análisis *in vitro*, se recogieron en tubos de coagulación (tubos de suero, sin anticoagulante) mediante punción cardíaca muestras de sangre de ratones ICR hembra (que pesaban 35 a 45 g). Inmediatamente después a los tubos con la sangre recogida se añadió <sup>125</sup>I-FLINT o <sup>124</sup>I-análogo de FLINT (R218Q). Los tubos se pusieron luego en un baño de agua a 37°C y se dejó que coagularan durante 1 h. Se preparó el suero por sedimentación y se ensayó por HPLC en fase inversa.

Las muestras de suero o plasma se aplicaron directamente a una columna C4 de Vydac (4,6 x 250 mm). Los (el) compuesto(s) se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de 15-55% de B en 40 min a 1 ml/min. Disolvente A = H<sub>2</sub>O/0,1% de TFA; disolvente B = acetonitrilo/0,08% de TFA. El eluido se controló a 214 nm. Se recogieron fracciones (1 ml) del eluido de la columna. La radiactividad de las fracciones se analizó directamente por recuento de  $\gamma$ .

#### *Incubación in vitro*

Después de 1 h de incubación con sangre de ratones ICR, aproximadamente el 70% de <sup>125</sup>I-FLINT se había degradado a un producto que tenía las características de retención del metabolito de FLINT (esto es, restos 1-218 de SEQ ID n°. 1) (Fig. 5A). A diferencia, el análogo de FLINT (R218Q) era completamente resistente a la degradación proteolítica (Fig. 5B).

#### Ejemplo 14

##### *Estabilidad metabólica in vivo del análogo de FLINT R218Q*

Se realizaron en ratones hembra (peso corporal 35-45 g) estudios diseñados para ensayar la estabilidad y resistencia de análogos de FLINT a la digestión proteolítica *in vivo*. Se diluyó FLINT y análogo de FLINT (R218Q) en solución salina tamponada con fosfato/10% de glicerol para obtener soluciones de dosis que tenían una concentración final de 75  $\mu$ g/ml. Se administraron FLINT y análogo de FLINT (R218Q) a ratones ICR (n = 2) como único bolo intravenoso por la vena de la cola (15  $\mu$ g/animal) en un volumen de 0,2 ml. A las 0,25 horas después de la administración intravenosa de los artículos a ensayar, se recogieron por punción cardíaca muestras de sangre en tubos de EDTA que contenían 0,01 ml de una mezcla inhibidora de proteasa (AEBSF 0,5 mM, aprotinina 150 nM, E-64 1  $\mu$ M, leupeptina 1  $\mu$ M) y se preparó plasma por sedimentación. Las concentraciones en plasma de FLINT o análogo de FLINT (R218Q) se determinaron por ELISA y se determinó la inmunorreactividad de FLINT usando HPLC en fase inversa según se describe seguidamente.

#### *ELISA de FLINT*

Se cultivaron durante la noche pocillos de una placa de 96 pocillos con anticuerpo policlonal purificado TKD-028-1494 (5  $\mu$ g/ml, 0,1 ml/pocillo). Después de lavado, se añadieron las muestras en un volumen de 50  $\mu$ l/pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Después de lavar, se añadió Ab TKD-076A biotinilado (dilución 1:4000, 50  $\mu$ l/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar, se añadió estreptavidin-fosfatasa alcalina (Boehringer Ingelheim) (dilución 1:1000, 50  $\mu$ l/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 12 h. La detección se realizó con sustrato Attophos<sup>MC</sup>. La LOQ del ensayo se determinó que era de aproximadamente 0,5 ng/ml.

El análisis ELISA reveló que las concentraciones en plasma de FLINT y análogo de FLINT (R218Q) eran comparables (aproximadamente 200-300 ng/ml) cuando se midieron 15 min después de administración intravenosa. Sin embargo, con el fin de distinguir entre FLINT de longitud completa y FLINT metabólico (esto es, restos 1-216 de SEQ ID n°. 1), se realizó RP-HPLC. Las fracciones recogidas se concentraron a sequedad en un instrumento Speed-Vac (Savant Instruments), se volvieron a poner en suspensión en PBS/BSA al 0,1% y se ensayaron por ELISA.

El fraccionamiento por RP-HPLC indicó que el metabolito de FLINT (1-218) representaba aproximadamente 50% de la inmunorreactividad circulante 15 min después de la administración de FLINT nativa (Fig. 6A). Esencialmente, de toda la inmunorreactividad era responsable el análogo de FLINT (R218Q), lo que indica resistencia a la degradación proteolítica en la posición de R218Q (Fig. 6B).

#### Ejemplo 15

##### *Uso de análogo de FLINT para tratar un paciente de ALI*

Un hombre de 55 años se presenta inconsciente en el departamento de emergencias. Su familia indica que había sido tratado de bronquitis como paciente externo. No tenía una historia pasada relevante y su única medicación había sido una cefalosporina de tercera generación. El examen físico revela un hombre cianótico aturdido, que es hipotenso, taquicárdico y taquicárdico, con una congestión pulmonar bilateral compatible con edema pulmonar. No hay evidencia de fallo cardíaco congestivo. Los ensayos revelan hipoxemia (basada en PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) e infiltraciones pulmonares bilaterales sin cardiomegalia, consistente con un diagnóstico de lesión pulmonar aguda. Sobre la base de la historia

## ES 2 291 197 T3

se concluye que la lesión pulmonar era resultado directo de neumonía adquirida en la comunidad y que el paciente satisfizo el criterio de hipoxemia para ALI en las últimas 12 h. Las medidas de ventilación incluyen el uso de PEEP y un bajo volumen tidal. Tan pronto como se confirma una oxigenación adecuada, se inicia el tratamiento con el análogo de FLINT R218Q en ER como bolo i.v. de 2,5 mg/kg seguido de infusión continua de 0,1 mg/min. Se continúa el tratamiento con el análogo de FLINT R218Q junto con medidas de soporte agresivas (por ejemplo, ventilación progresiva, fluidos intravenosos, hipertensores y soporte nutricional) durante 4 días en la UCI, a cuyo término se interrumpe el análogo de FLINT. A lo largo de los 3 días siguientes, el paciente empieza a recuperarse y es extubado a los 8 días. Tiene una recuperación tranquila y a los 6 meses de la descarga no tiene evidencia de enfermedad pulmonar residual por gas en sangre y espirometría.



REIVINDICACIONES

1. Un análogo de FLINT resistente a la proteólisis por una proteasa del tipo tripsina entre las posiciones 218 y 219 de SEQ ID nº. 1 o entre las posiciones 247 y 248 de SEQ ID nº. 3, y activo en la unión de Ligando de Fas (FasL) y/o LIGHT, en el que Arg en la posición 218 de SEQ ID nº. 1 o la posición 247 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Gln, y en el que el mencionado análogo es en como mínimo 97% idéntico a SEQ ID nº. 1 o SEQ ID nº. 3.

2. Un análogo de FLINT de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Arg en la posición 34 de SEQ ID nº. 1 o la posición 63 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Asn, y Asp en la posición 36 de SEQ ID nº. 1 o 65 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Thr.

3. Un análogo de FLINT de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que Asp en la posición 194 de SEQ ID nº. 1 o la posición 223 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Asn, y Ser en la posición 196 de SEQ ID nº. 1 o la posición 225 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Thr.

4. Un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Thr en la posición 216 de SEQ ID nº. 1 o la posición 245 de SEQ ID nº. 3 está remplazado por Pro.

5. Un análogo de FLINT de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID nº. 1, en el que Arg en la posición 218 está sustituido por Gln.

6. Un ácido nucleico que codifica una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.

8. Una célula hospedante recombinante que comprende un vector de la reivindicación 7.

9. Un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como medicamento.

10. Uso de un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión pulmonar aguda, un síndrome de distensión respiratoria aguda o una colitis ulcerosa.

11. Una formulación farmacéutica que comprende como ingrediente activo un análogo de FLINT de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 asociado con uno o varios vehículos, excipientes o diluyentes de él farmacéuticamente aceptables.

FIG. 1

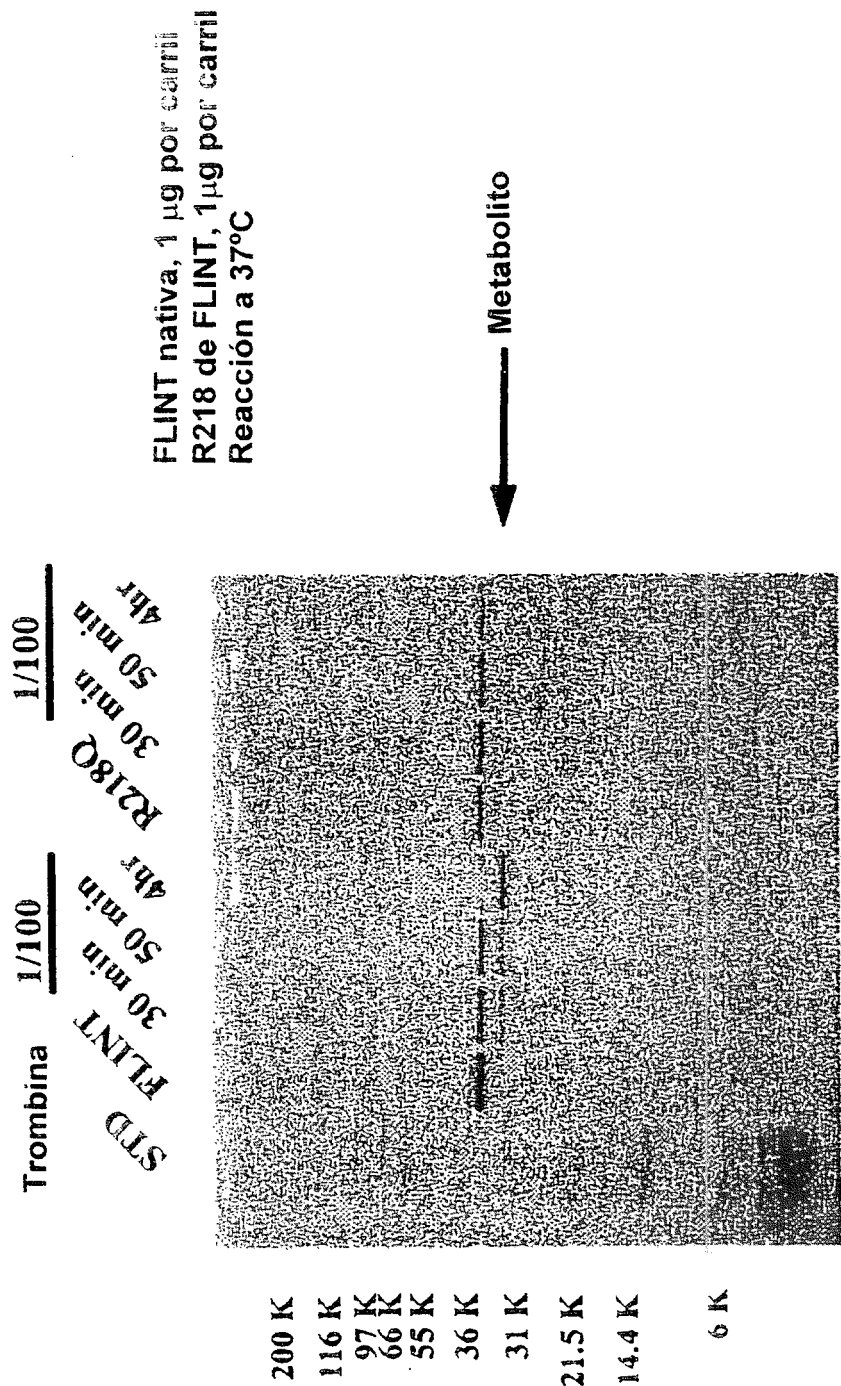


FIG. 2

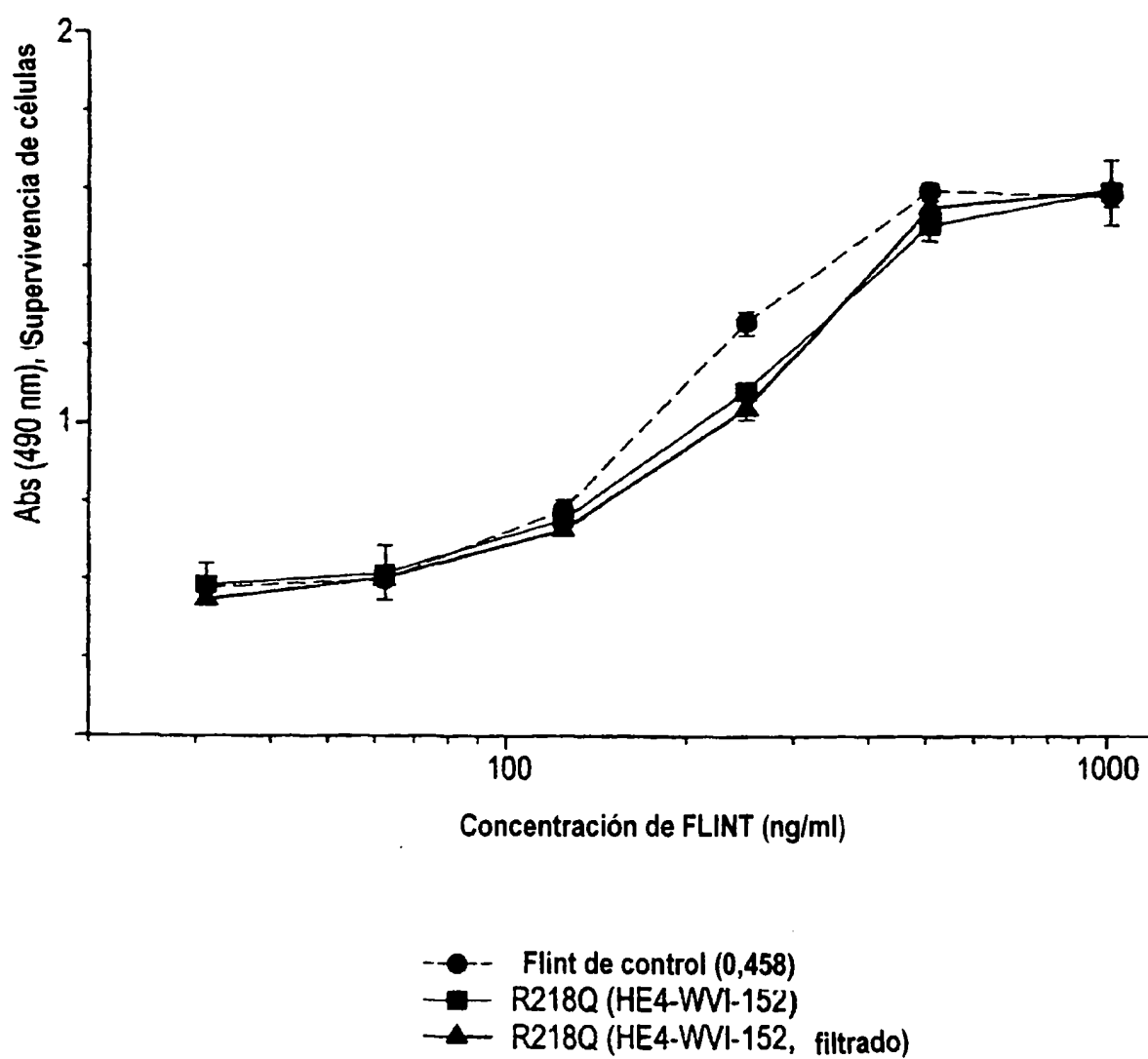


FIG. 3

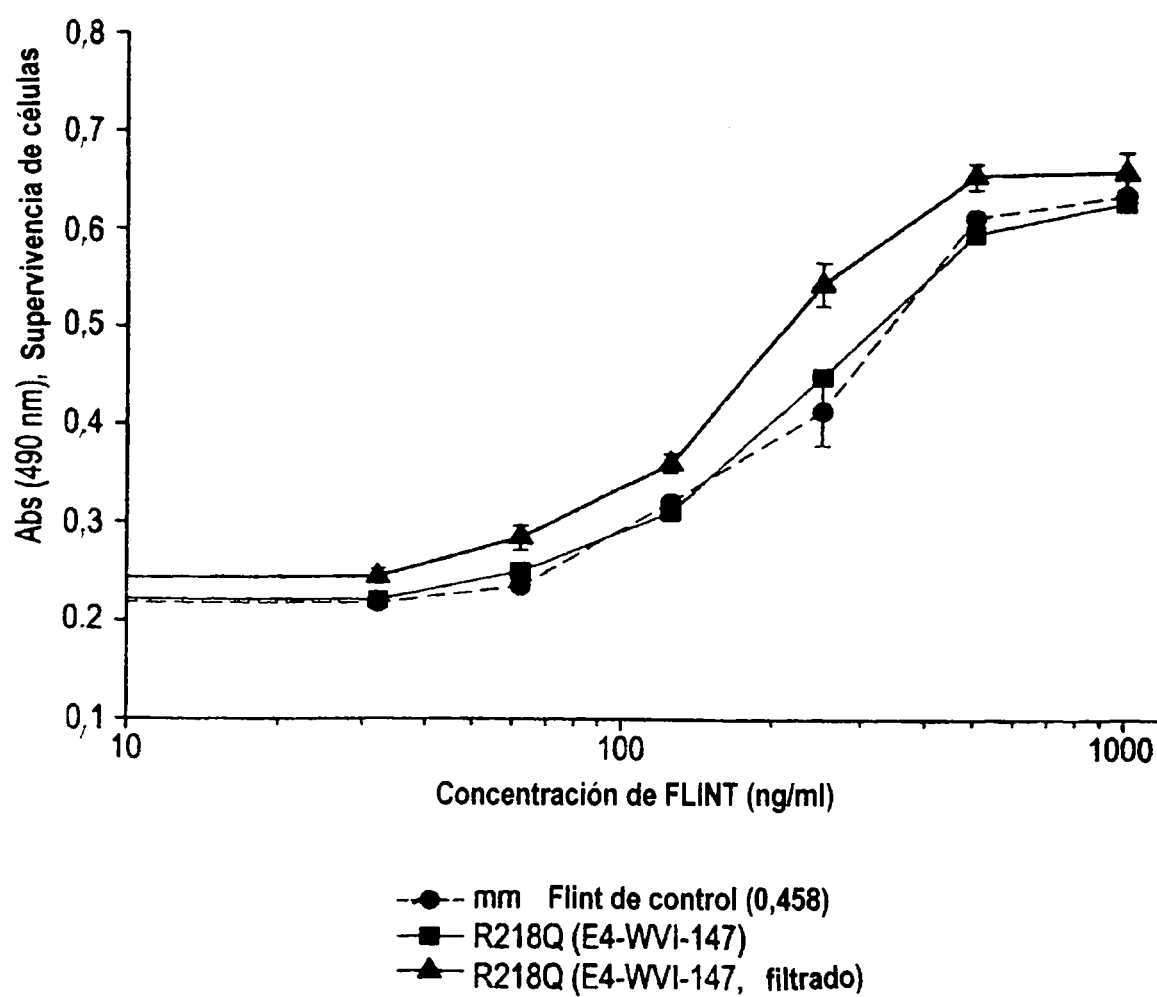


FIG. 4

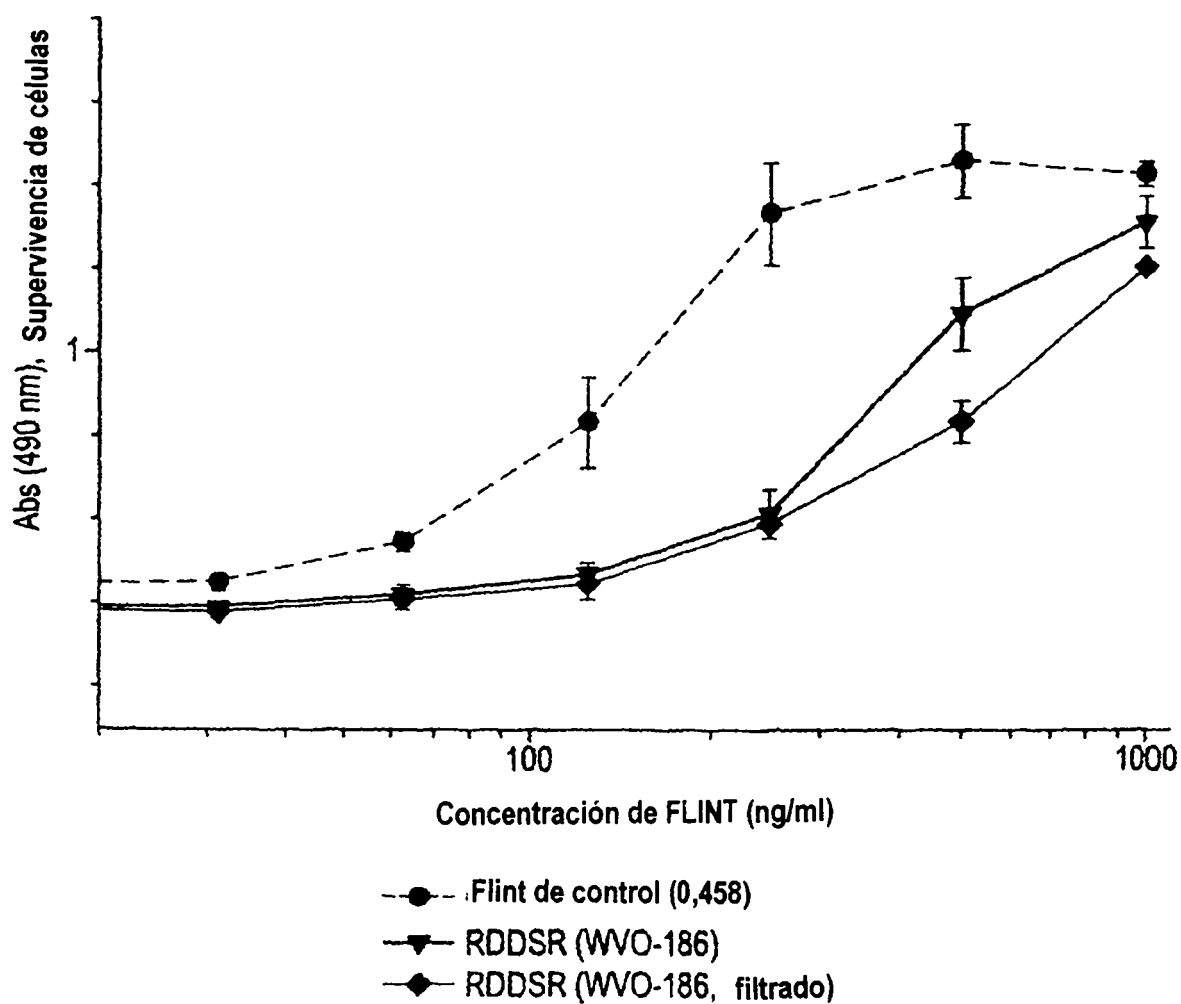


FIG. 5A

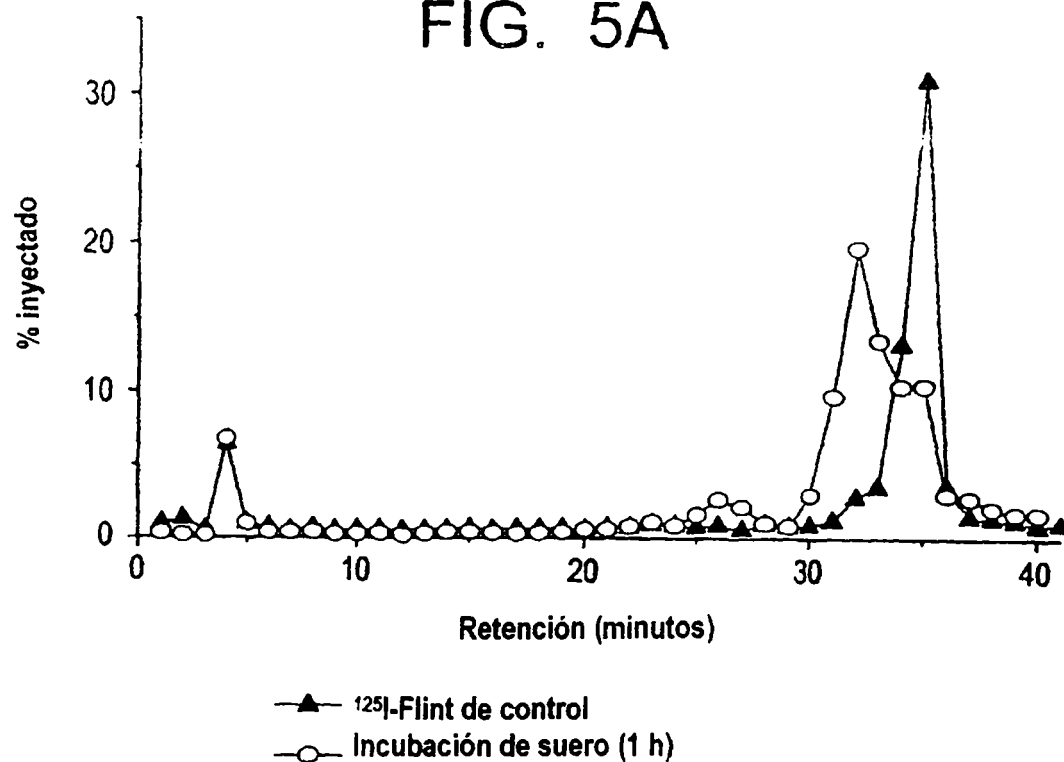


FIG. 5B

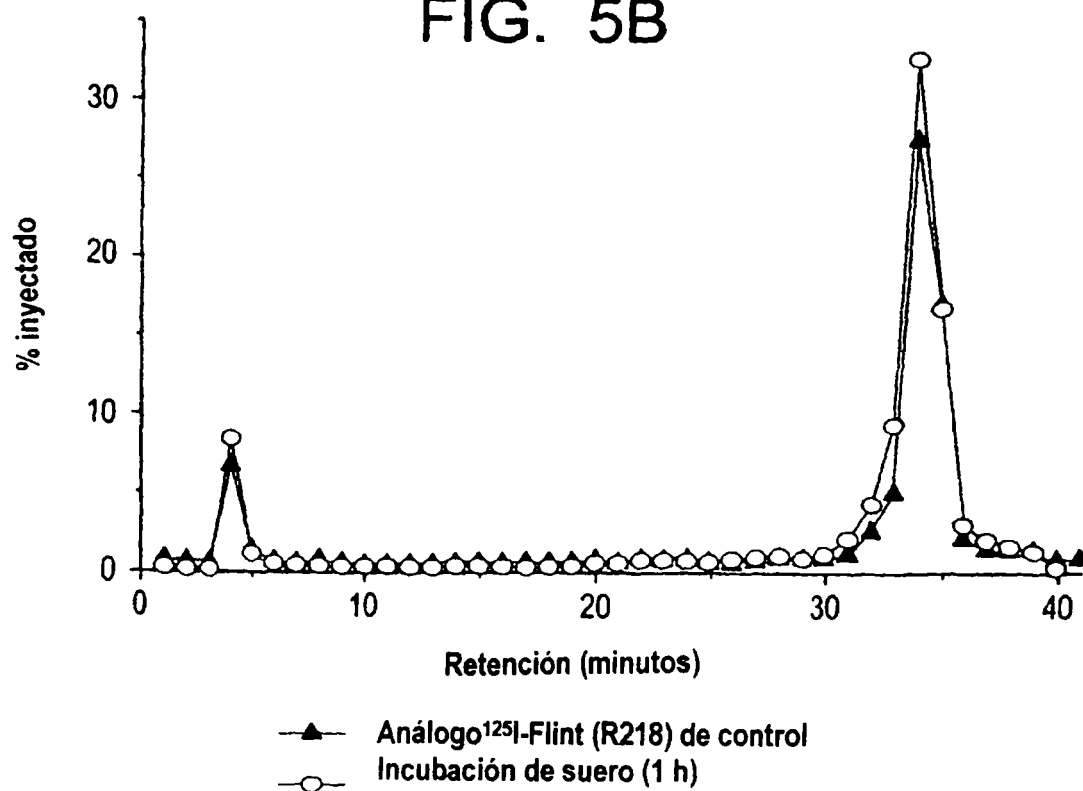


FIG. 6A

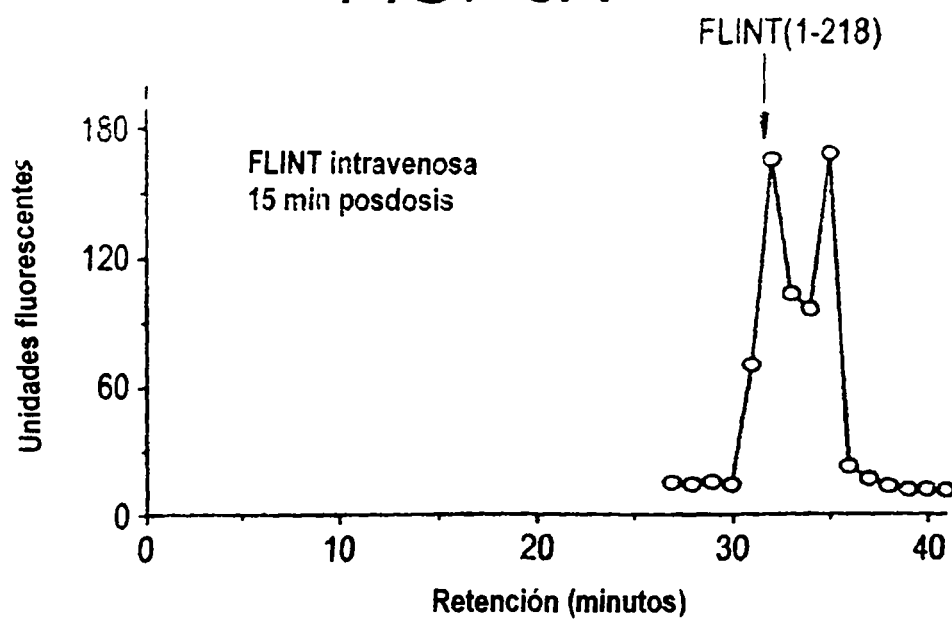


FIG. 6B

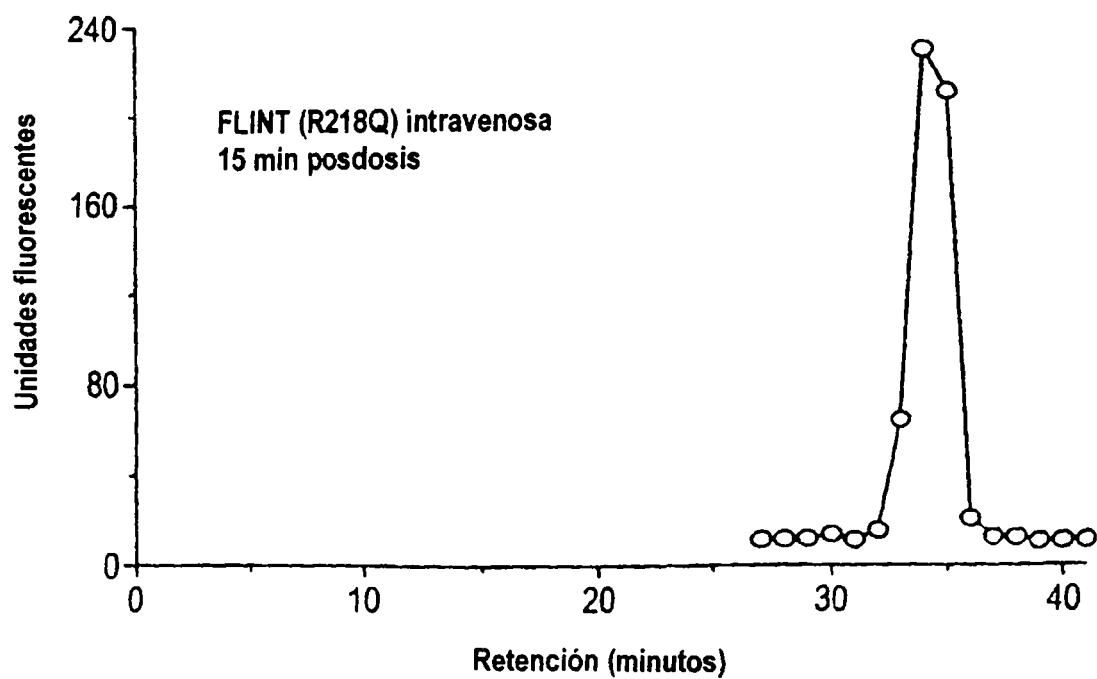
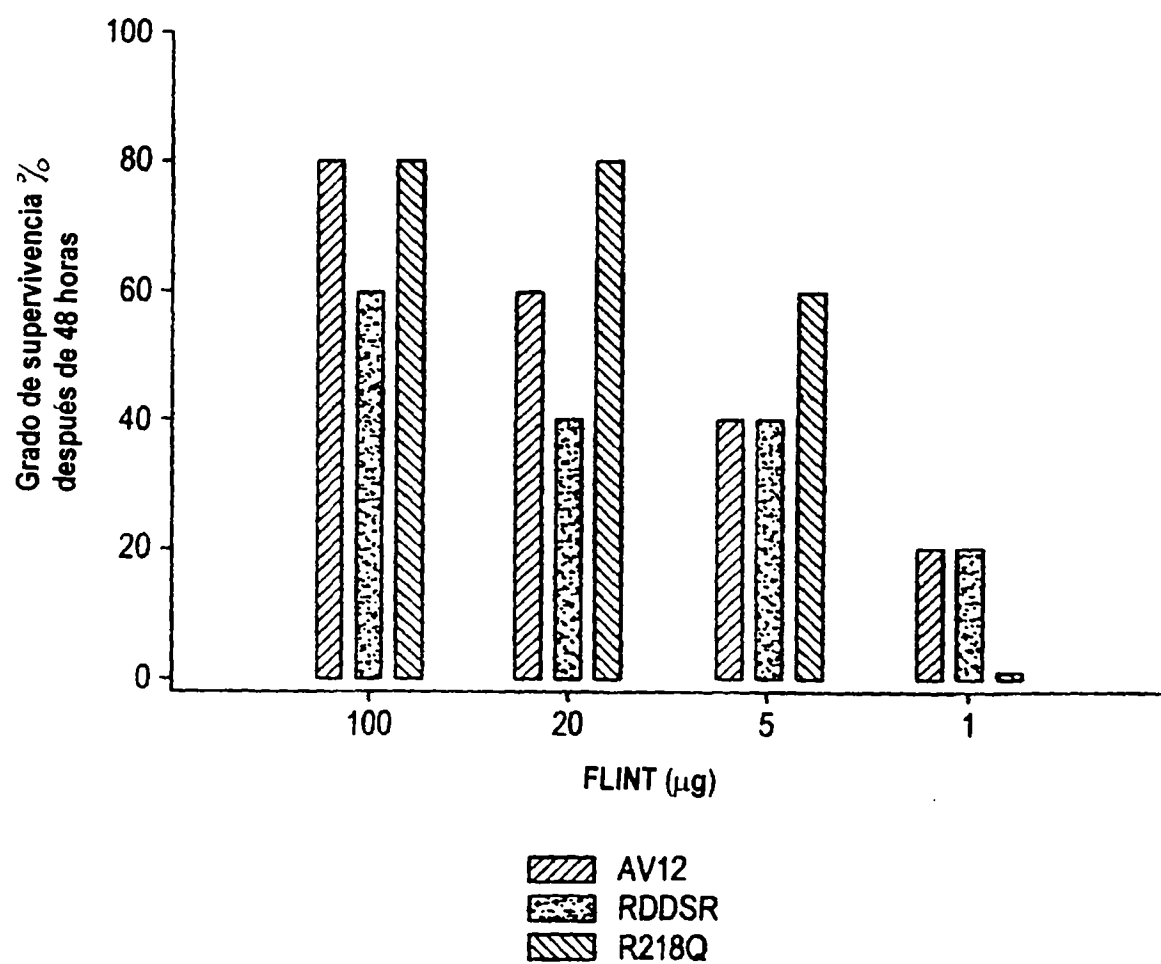


FIG. 7





# ES 2 291 197 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Witcher, Derrick  
Rathnachalam, Radhakrishnan  
Micanovic, Radmila

<120> Análogos de FLINT resistentes a proteasas

<130> X-13161

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 271

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Val Ala Glu Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly Glu
 1      5      10      15
Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg Pro
      20      25      30
Cys Arg Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg His
      35      40      45
Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn Val
      50      55      60
Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr His
      65      70      75      80
Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly Phe
      85      90      95
Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala Pro
      100      105      110
Gly Thr Pro Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys Pro Pro Gly Thr
      115      120      125
Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln Pro His Arg Asn
      130      135      140
Cys Thr Ala Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly Ser Ser Ser His
      145      150      155      160
Asp Thr Leu Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe Pro Leu Ser Thr Arg Val
      165      170      175
Pro Gly Ala Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val Ile Asp Phe Val Ala Phe
      180      185      190
Gln Asp Ile Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Ala Leu Glu
      195      200      205
Ala Pro Glu Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly Arg Ala Ala Leu
      210      215      220
Gln Leu Lys Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu Gly Ala Gln Asp
      225      230      235      240
Gly Ala Leu Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg Val Ala Arg Met
      245      250      255
Pro Gly Leu Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu Pro Val His
      260      265      270

```

# ES 2 291 197 T3

<210> 2

<211> 813

<212> DNA

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

10  gtggcagaaa caccaccta ccctggcg gacgcagaga caggggagcg gctggtgtgc 60
    gccacgtgcc ccccaggcac ctttgtgcag cggccgtgcc gccgagacag cccacgacg 120
    tgtggcccggt gtccaccgcg ccactacacg cagttctgga actacctgga gcgctgccgc 180
    tactgcaacg tcctctgcgg ggagcgtgag gaggaggcac gggcttgcca cgcacccac 240
    aaccgtgcct gccgctgccg caccggcttc ttcgcgcacg ctggtttctg cttggagcac 300
    gcatcgtgtc cacctggtgc cggcgtgatt gcccgggca ccccagcca gaacacgcag 360
15  tgccagccgt gccccccagg cactttctca gccagcagct ccagctcaga gcagtgccag 420
    cccacccgca actgcacggc cctgggctg gccctcaatg tgccaggctc ttcctcccat 480
    gacaccctgt gcaccagctg cactggcttc cccctcagca ccagggtacc aggagctgag 540
    gagtgtgagc gtgccgtcat cgactttgtg gctttccagg acatctccat caagaggctg 600
    cagcggctgc tgcaggccct caggggcccg gagggtggg gtccgacacc aaggggcggc 660
20  cgcgcgccct tgcagctgaa gctgcgtcgg cggtcacgg agctcctggg ggcgcaggac 720
    ggggcgctgc tgtgcggct gctgcaggcg ctgcgctgg ccaggatgcc cgggctggag 780
    cggagcgtcc gtgagcgctt cctccctgtg cac 813

```

<210> 3

25 <211> 300

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 3

```

    Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu
      1             5             10             15
35  Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg Gly Val Ala Glu
      20             25             30
    Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val
      35             40             45
40  Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg Pro Cys Arg Arg
      50             55             60
    Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln
      65             70             75             80
    Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly
      85             90             95
50  Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr His Asn Arg Ala
      100            105            110
    Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly Phe Cys Leu Glu
      115            120            125
55  His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro
      130            135            140
    Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala
      145            150            155            160
    Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln Pro His Arg Asn Cys Thr Ala
      165            170            175
65  Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly Ser Ser Ser His Asp Thr Leu

```

# ES 2 291 197 T3

	180	185	190
	Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe	Pro Leu Ser Thr Arg	Val Pro Gly Ala
	195	200	205
5	Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val	Ile Asp Phe Val Ala Phe Gln Asp Ile	
	210	215	220
10	Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Ala Leu Glu Ala Pro Gln		
	225	230	235
	Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly Arg Ala Ala Leu Gln Leu Lys		
	245	250	255
15	Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu Gly Ala Gln Asp Gly Ala Leu		
	260	265	270
	Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg Val Ala Arg Met Pro Gly Leu		
	275	280	285
20	Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu Pro Val His		
	290	295	300

25 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <400> 4

35	Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu
	1 5 10 15
	Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg Gly
	20 25

40 <210> 5  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligocebador  
 50  
 <400> 5

55 gcaccagggt accaggagct gaggagtgtg agcgtgccg

55 <210> 6  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> descripción de Secuencia Artificial: oligocebador  
 65

## ES 2 291 197 T3

<400> 6

tcagctgcaa ggcggcgcg gc cccgcttggtg gtgtcggacc ccag 44

5

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: oligocebador

15

<400> 7

ggggtccgac accacaagcg ggcgcgcgcg ccttcagct gaga 44

20

<210> 8

<211> 43

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligocebador

30

<400> 8

gcacagaatt catcagtgca caggaggaa gcgctcacgg acg 43

35

<210> 9

<211> 936

<212> DNA

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

45 <222> (25)..(924)

50

55

60

65

# ES 2 291 197 T3

<400> 9

	gctctccctg ctccagcaag gacc atg agg gcg ctg gag ggg cca ggc ctg	51
	Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu	
5	1 5	
	tcg ctg ctg tgc ctg gtg ttg gcg ctg cct gcc ctg ctg ccg gtg ccg	99
	Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro	
	10 15 20 25	
10	gct gta cgc gga gtg gca gaa aca ccc acc tac ccc tgg cgg gac gca	147
	Ala Val Arg Gly Val Ala Glu Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala	
	30 35 40	
	gag aca ggg gag cgg ctg gtg tgc gcc cag tgc ccc cca ggc acc ttt	195
15	Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe	
	45 50 55	
	gtg cag cgg ccg tgc cgc cga gac agc ccc acg acg tgt ggc ccg tgt	243
	Val Gln Arg Pro Cys Arg Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys	
	60 65 70	
20	cca ccg cgc cac tac acg cag ttc tgg aac tac ctg gag cgc tgc cgc	291
	Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg	
	75 80 85	
25	tac tgc aac gtc ctc tgc ggg gag cgt gag gag gag gca cgg gct tgc	339
	Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Glu Ala Arg Ala Cys	
	90 95 100 105	
	cac gcc acc cac aac cgt gcc tgc cgc tgc cgc acc ggc ttc ttc gcg	387
30	His Ala Thr His Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala	
	110 115 120	
	cac gct ggt ttc tgc ttg gag cac gca tcy tgt cca cct ggt gcc ggc	435
35	His Ala Gly Phe Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly	
	125 130 135	
	gtg att gcc ccg ggc acc ccc agc cag aac acg cag tgc cag ccg tgc	483
	Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys	
	140 145 150	
40	ccc cca ggc acc ttc tca gcc agc agc tcc agc tca gag cag tgc cag	531
	Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln	
	155 160 165	
45	ccc cac cgc aac tgc acg gcc ctg ggc ctg gcc ctc att gtg cca ggc	579

# ES 2 291 197 T3

	Pro	His	Arg	Asn	Cys	Thr	Ala	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Pro	Gly	
	170					175				180						185	
5	tct	tcc	tcc	cat	gac	acc	ctg	tgc	acc	agc	tgc	act	ggc	ttc	ccc	ctc	627
	Ser	Ser	Ser	His	Asp	Thr	Leu	Cys	Thr	Ser	Cys	Thr	Gly	Phe	Pro	Leu	
				190					195						200		
10	agc	acc	agg	gta	cca	gga	gct	gag	gag	tgt	gag	cgt	gcc	gtc	atc	gac	675
	Ser	Thr	Arg	Val	Pro	Gly	Ala	Glu	Glu	Cys	Glu	Arg	Ala	Val	Ile	Asp	
				205					210					215			
15	ttt	gtg	gct	ttc	cag	gac	atc	tcc	atc	aag	agg	ctg	cag	cgg	ctg	ctg	723
	Phe	Val	Ala	Phe	Gln	Asp	Ile	Ser	Ile	Lys	Arg	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	
				220					225					230			
20	cag	gcc	ctc	gag	gcc	ccg	gag	ggc	tgg	gct	ccg	aca	cca	agg	gcg	ggc	771
	Gln	Ala	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Gly	Trp	Ala	Pro	Thr	Pro	Arg	Ala	Gly	
				235				240					245				
25	cgc	gcg	gcc	ttg	cag	ctg	aag	ctg	cgt	cgg	cgg	ctc	acg	gag	ctc	ctg	819
	Arg	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Arg	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	
						255					260					265	
30	ggg	gcg	cag	gac	ggg	gcg	ctg	ctg	gtg	cgg	ctg	ctg	cag	gcg	ctg	cgc	867
	Gly	Ala	Gln	Asp	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Arg	
						270				275					280		
35	gtg	gcc	agg	atg	ccc	ggg	ctg	gag	cgg	agc	gtc	cgt	gag	cgc	ttc	ctc	915
	Val	Ala	Arg	Met	Pro	Gly	Leu	Glu	Arg	Ser	Val	Arg	Glu	Arg	Phe	Leu	
				285					290					295			
40	cct	gtg	cac	tgatcctggc	cc												936
	Pro	Val	His														
				300													