



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 365 691**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03753550 .7**

(96) Fecha de presentación : **14.10.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1551977**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

(54)

Título: **Activación local selectiva de miembros de la familia de ligandos TNF de proteínas de fusión del ligando TNF sin anticuerpos sistémicamente inactivas.**

(30)

Prioridad: **14.10.2002 DE 102 47 755**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.10.2011

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

(73)

Titular/es: **BIONTECH AG.**
Hölderlinstrasse 8
55131 Mainz, DE

(72)

Inventor/es: **Pfizenmaier, Klaus y**
Wajant, Harald

(74)

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

Activación local selectiva de miembros de la familia de ligandos TNF de proteínas de fusión del ligando TNF sin anticuerpos sistémicamente inactivas.

La presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio efector y uno de fijación a la molécula a la superficie de la célula que están unidos por un enlazador peptídico. El dominio efector es un fragmento, en particular el dominio extracelular, de un miembro de la familia del ligando TNF (módulo 1) que como tal es biológicamente inactivo o de actividad limitada. El dominio de unión de la molécula de la superficie de la célula (módulo 2) es un segmento de aminoácidos que se une selectivamente a una estructura de la superficie de la membrana plasmática, de preferencia a una proteína de la membrana, pero que no procede de la inmunoglobulina. Además, la invención proporciona montajes de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, vectores que los contienen, células hospedadoras transfectadas con los mismos, composiciones farmacéuticas que contienen dichas materias de la invención, procedimientos para la producción de los polipéptidos según la invención y utilizaciones de las materias de la invención con fines terapéuticos.

En estudios *in vitro*, las citocinas, por ejemplo los miembros de la familia del ligando TNF, por ejemplo TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand), denominado también Apo2L (Wiley *et al.* (1995), *Immunity* 6: 673-682, Pitti *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 12687-12689), y por ejemplo FasL tiene una potente acción apoptótica en muchas células tumorales de origen animal y humano. En el caso de TRAIL, parece que no están afectadas las células malignas. Además, en los modelos animales preclínicos estudiados (ratón, mono) no se observaron indicaciones en absoluto de toxicidad aguda o de otros efectos secundarios generales de TRAIL, que puedan considerarse restrictivas de la terapia (Walczack *et al.* (1999) *Nat. Med.* 5:157-163, Ashkenazy *et al.* (1999) *J. Clin. Invest.* 104: 155-162). Sin embargo, recientes estudios *in vitro* en hepatocitos humanos primarios indicaron una potente acción citotóxica en el caso de un producto TRAIL producido de manera recombinante o de TRAIL localizado en la membrana, forma natural de esta citocina (Jo *et al.* (2000) *Nat. Med.* 6: 564-567, Ichikawa *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7: 954-960). Por consiguiente, actualmente una aplicación clínica general de variantes solubles especiales de miembros de la familia del ligando TNF (en particular TNF, FasL, TRAIL y CD40L), que son biológicamente activos y por consiguiente esencialmente tienen la acción de los ligandos localizados en la membrana, está regulada debido a los efectos secundarios que se producen. Lo mismo se aplica a los anticuerpos agonísticos que activan los receptores correspondientes a estos ligandos. Así, por ejemplo, para FasL (ligando del receptor Fas (Fas, CD95)), prototipo de citocinas apoptóticas, no se llevó a cabo una aplicación clínica *a priori* por razones de seguridad, ya que los anticuerpos agonísticos contra su receptor, Fas, son sumamente hepatotóxicos *in vivo* (Ogasawara *et al.* (1993) *Nature* 364: 806-809). Por último, ha sido posible también demostrar que FasL en forma soluble, en contraste con su forma localizada en la membrana, no tiene prácticamente actividad biológica (Schneider *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 187: 1205-1213).

Por lo tanto, las variantes de los miembros de la familia del ligando TNF disponibles según el estado de la técnica no son utilizables o solamente en un grado muy limitado (por ejemplo en el caso del TNF en las denominadas condiciones de "perfusión aislada de la extremidad") para aplicación terapéutica, por ejemplo, para el tratamiento de tumores, ya sea debido a la falta de actividad biológica o debido a efectos secundarios extremos.

El documento WO 02/22680 da a conocer proteínas de fusión, en las que los fragmentos que como tales no son biológicamente activos o solamente en un grado limitado, por ejemplo de citocinas de TNF, están unidos mediante un enlazador peptídico a un anticuerpo que se une al antígeno o a un fragmento que se une al antígeno del mismo. Sin embargo, existe la necesidad de proporcionar sistemas alternativos, ya que con cierta frecuencia no existe ningún anticuerpo (o fragmentos de anticuerpo) correspondiente disponible para determinadas moléculas de la superficie celular, u otro antígeno que se une tiene lugar como es de esperar, por ejemplo sin la especificidad apropiada.

La presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un sistema alternativo, en particular independiente de anticuerpos, con lo que es posible manifestar la acción de ligandos de la familia TNF (o fragmentos de los mismos) de manera orientada y específica para el tejido y las células y por lo tanto evitar o por lo menos limitar notablemente determinados efectos secundarios generales sobre las células y tejidos que no pertenecen al tejido diana durante la utilización clínica.

Este problema se resuelve mediante las formas de realización de la presente invención caracterizadas en las reivindicaciones.

Según la presente invención, se proporciona un polipéptido que comprende un segmento (1) que contiene un dominio de unión a la molécula de la superficie celular (denominado también módulo 2) en el que el dominio que se une a la molécula de la superficie celular no procede de una inmunoglobulina, de un segmento (2), que es un enlazador peptídico ni de un segmento (3), que contiene un fragmento de un miembro de la familia del ligando TNF (denominado también "citocinas del TNF" o "familia del ligando receptor de TNF") que como tal es biológicamente inactivo/de actividad restringida (denominado también módulo 1) en el que el fragmento en el segmento (3) tiene un dominio extracelular de un miembro de la familia del ligando TNF o una variante de la secuencia natural del dominio

extracelular que tiene por lo menos el 80% de homología de secuencia, y en el que el fragmento en el segmento (3) solo se vuelve biológicamente activo por completo mediante la unión del segmento (1) a la molécula de la superficie celular.

- 5 Según una forma de realización preferida, los segmentos (1) a (3) en el polipéptido (= proteína de fusión según la invención = montaje de proteína según la invención) se ordenan desde el terminal N al C.

La presente invención se basa en la observación de que los ligandos de la familia TNF natural en la membrana, cuando son procesados proteolíticamente por el organismo en una forma soluble correspondiente al dominio extracelular, son biológicamente inactivos por completo, o son solo todavía activos en un grado restringido, por ejemplo en determinados subtipos del receptor de membrana. Esto también aplica a los derivados producidos de manera recombinante que corresponden a los dominios extracelulares de los ligandos en cuestión. Significativamente, dichos ligandos solubles, biológicamente inactivos son todavía absolutamente capaces de unirse a su receptor de membrana complementario, sin efectuar sin embargo una activación del receptor, es decir la transducción de señal y la activación de una reacción celular. El descubrimiento según la invención consiste en que dicho ligando que es inactivo y de actividad restringida (módulo 1) por fusión con un componente peptídico adicional (módulo 2), que no consta de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y que permite una unión específica a una estructura situada en una membrana celular independiente de la fracción del ligando TNF, alcanza de nuevo actividad biológica (completa), si este componente peptídico conduce a la unión a una superficie celular. La reconstitución de la acción biológica del módulo 1 lograda de este modo se vuelve activa tanto contra las propias células diana reconocidas por el módulo 2 como también contra las células adyacentes, con tal que cada una de éstas exprese los receptores apropiados para el fragmento del ligando TNF (módulo 1) contenido en la proteína de fusión.

25 El dominio de unión a la molécula de la superficie celular (segmento (1) o módulo (2)) de la proteína de fusión según la invención media en la unión de la proteína de fusión a las células que tienen la estructura superficial apropiada. La invención se diferencia en base a los módulos específicos por dos propiedades que dan como resultado que toda la proteína adquiere propiedades que ninguno de los módulos utilizados posee solo y que no son previsibles.

30 La primera propiedad que se refiere a esto es que el dominio de unión a la molécula de la superficie celular en la proteína de fusión no se consigue por el principio de la utilización de anticuerpos o fragmentos procedentes de la misma (por ejemplo scFv) correspondiente al estado actual de la tecnología, pero mejor que en contraste con los dominios de anticuerpos que se unen al antígeno normalmente utilizados, inesperadamente otros dominios de unión a la molécula de la superficie celular pueden proporcionar actividad de efector completa y por consiguiente muy eficaz específicamente dirigida contra las células diana a los fragmentos de citocinas de TNF que como tales son biológicamente inactivos y de actividad restringida mediante la unión a determinadas estructuras de la superficie celular, en particular a proteínas de la membrana. Los dominios sin inmunoglobulina preferidos para la unión a las estructuras de la superficie celular son por ejemplo hormonas peptídicas o citocinas, péptidos cortos, pero exactamente receptores para ligandos localizados en la membrana (o preferentemente en cada caso los fragmentos de los mismos que se introducen en la unión específica).

La segunda propiedad consiste en que el dominio efector como tal y también en la proteína de fusión es biológicamente inactivo o tiene poca actividad en las células que no poseen la estructura superficial que es reconocida por el dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula, es decir el receptor correspondiente al dominio efector no está activado. La sorprendente propiedad, sólo poseída por la proteína de fusión completa, consiste en que el dominio efector (fragmento de una citocina del TNF que como tal es biológicamente inactivo y de actividad limitada) de la proteína de fusión sólo se vuelve biológicamente activa después de unirse a las células que expresan la superficie celular que es reconocida por el dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula. Por lo tanto, el dominio efector del polipéptido según la invención activa sólo el receptor correspondiente a éste en una célula que tiene la estructura superficial correspondiente al módulo de fijación a la molécula de la superficie celular o en una célula que está al lado de una célula equipada con una estructura superficial. Por consiguiente la proteína de fusión, pero no cada uno de los componentes individuales de la misma (módulo 1 y módulo 2 respectivamente) y tampoco una forma activa del dominio efector, activa selectivamente el receptor correspondiente al dominio efector en las células (o en las células adyacentes a éste) que expresa la estructura superficial que es reconocida por el dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula. Esta nueva propiedad (activación selectiva del receptor local) del polipéptido según la invención permite de este modo evitar los efectos secundarios generales que presenta la citocina del TNF activa de la que procedía el dominio efector según la invención, o los anticuerpos agonísticos conocidos en el estado actual de la tecnología que activan el receptor correspondiente receptor. Por consiguiente, el polipéptido según la invención permite la manifestación local dirigida de la acción en todo el organismo.

El dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula se selecciona con provecho de modo que la estructura superficial que es reconocida por éste está presente de manera selectiva o al menos enriquecida en las células, puntos u órganos en los que el dominio efector debe ser activo. Por otra parte, el dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula se selecciona de modo que no permita la autoactivación de la proteína de fusión, por ejemplo por agregación.

Los miembros de la familia del ligando TNF, por ejemplo TNF (Factor de Necrosis Tumoral; nº de registro NM_000594 en GenBank), por ejemplo TRAIL (del inglés TNF Related Apoptosis Inducing Ligand; nº de registro U37518 en GenBank), denominado también Apo2L, por ejemplo CD40L (nº de registro NM_011616 en GenBank) y por ejemplo FasL (nº de registro U11821 en GenBank) presentan actividad reguladora del sistema apoptótico y/o inmunitario. Con la excepción de unas pocas excepciones, los miembros de la familia TNF son proteínas de la membrana de tipo II. Sin embargo, en muchos casos las formas solubles pueden proceder también de estas formas localizadas en la membrana por proteólisis específica o corte y empalme alternativo. En particular, pueden producirse también formas solubles por procedimientos de ingeniería genética. Sin embargo, los miembros solubles y también los localizados en la membrana de la familia del ligando TNF manifiestan su acción biológica por interacción con los miembros de una familia correspondiente de receptores, los miembros de la familia del receptor del TNF. En muchos casos, las formas solubles y localizadas en la membrana de los miembros de la familia del ligando TNF pueden diferenciarse considerablemente en su actividad biológica. Así, por ejemplo, el TNF soluble es un activador muy potente de TNF-R1, pero tiene solamente actuación muy restringida o ninguna sobre TNF-R2. Por otra parte, la forma localizada en la membrana del mismo ligando puede activar ambos receptores de TNF igualmente bien. Más ejemplos en los que difieren las formas solubles y localizadas en la membrana de miembros de la familia del ligando receptor de TNF son entre otros FasL, CD40L y TRAIL.

Según la invención, se sobreentiende que una variante significa en general secuencias que tienen por lo menos el 80% de la secuencia natural y se diferencian de la secuencia natural por ejemplo por eliminación o eliminaciones, inserción o inserciones y/o por lo menos una mutación. En este caso, se prefiere una homología de secuencia de por lo menos el 90%, preferentemente por lo menos del 95% y aún más preferentemente del 97% con la correspondiente secuencia natural. Un fragmento natural pueden ser secuencias acortadas en el terminal N, en el terminal C o dentro de la secuencia de las formas solubles de los miembros de la familia del ligando del receptor del TNF. Variantes biológicamente activas de estos fragmentos se dan a conocer según la invención. Las variantes derivadas en el sentido de la invención tienen preferentemente propiedades selectivas de unión al receptor, y las variantes pueden optimizarse, por ejemplo en lo que se refiere a su actividad biológica o a otras propiedades (estabilidad).

El principio de actuación de los montajes según la invención es aplicable en particular a todos los miembros de la familia del ligando del receptor del TNF que son eficaces para determinados receptores exclusivamente o en una medida particularmente buena como moléculas de la membrana. Así como también FasL, CD40L estos incluyen también TNF, TRAIL, 41BB, CD30L Y Ox40L. Por consiguiente se prefieren particularmente en el módulo I (segmento (3)) de los polipéptidos según la invención los miembros de la familia del ligando receptor del TNF que activan de manera natural su receptor complementario solamente como proteína de la membrana.

Muy especialmente preferido como segmento (3) es un dominio extracelular soluble de TRAIL, FasL, CD40, 41BBL, CD30L, Ox40L o TNF.

El segmento enlazador (2) entre los segmentos (1) (dominio de fijación de la molécula a la superficie celular; módulo 2) y (3) (fragmento del ligando receptor del TNF; módulo 1) en montajes de polipéptido según la invención es preferentemente por ejemplo un enlace flexible, pero preferentemente sin influir desfavorablemente en las propiedades de trimerización intrínsecas del (fragmento del ligando receptor del TNF en cuestión (módulo 1), como se muestra más adelante en los montajes (A) y (B) del ejemplo.

En el segmento (2), es posible cualquier secuencia peptídica preparada de forma natural o sintética. En principio, un enlazador de una secuencia natural o variada (parte) de todos los organismos, preferentemente de vertebrados, en particular de mamíferos, sobre todo del hombre, puede ser adecuado. Además, por ejemplo todos los segmentos de la secuencia de proteínas que generan trímeros mediante desarrollo de estructuras supersecundarias son adecuados como enlazadores. En cada caso, las secuencias de polipéptidos naturales o fragmentos de estos polipéptidos naturales que se utilizan como enlazadores en el segmento (2) de un polipéptido según la invención, puede ocurrir también en forma de variantes biológicamente activas del mismo en el sentido de la presente invención y según la definición anterior.

El dominio de fijación a la molécula de la superficie de la célula (segmento (1)) del polipéptido de la presente invención puede comprender, por ejemplo, el segmento de un receptor para un ligando localizado en la membrana necesario para la interacción específica con la molécula de la superficie de la célula. Sin embargo, los polipéptidos que tienen un dominio soluble de fijación al ligando de un receptor, en particular de un miembro de la familia del receptor del TNF, son preferibles en el contexto de la presente invención. En este caso, el componente receptor no debe ser complementario del fragmento del ligando receptor del TNF presente en el segmento (3).

Según una forma de realización más preferida del polipéptido, el segmento (1) comprende por lo menos el segmento de un ligando de un receptor localizado en la membrana necesario para la interacción específica con la molécula de la superficie celular. Por consiguiente, los ligandos o péptidos solubles que reconocen a los receptores localizados en la célula son adecuados según la invención. Los fragmentos del ligando receptor diferentes del segmento (3) (módulo 1) son también adecuados. En este caso, se prefiere particularmente un polipéptido según la invención cuando el segmento (1) es un fragmento soluble del ligando/receptor de un mamífero, en particular de origen

humano, e interactúa específicamente con estructuras diana complementarias definidas en un mamífero, en particular tejidos y células humanos.

El segmento (1) del polipéptido según la invención presentará preferentemente especificidad para una proteína de la superficie celular selectiva o predominantemente expresada en el tejido tumoral o en las células activadas del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, dendrocitos). Ejemplos de dichas proteínas de la superficie celular selectiva o predominantemente expresadas que pueden estar unidas por el segmento (1) de un polipéptido según la invención están en los tejidos tumorales, tal como la VEGFR o el complejo VEGFR/VEGF, todos mutados y las formas naturales de la familia del receptor de EGF o CD30, en linfocitos T activados, por ejemplo CD40L o el receptor de IL2, en linfocitos B por ejemplo Baff-R o CD40, en macrófagos, por ejemplo TNF de la membrana o el ligando B7 y en dendrocitos, por ejemplo asimismo el ligando B7.

Por consiguiente, las hormonas proteicas o peptídicas, por ejemplo factores de crecimiento tal como EGF, y factores de angiogenia tal como VEGF, y también extracelulares solubles de receptores tales como por ejemplo todos los miembros de la superfamilia del receptor del TNF, en particular TNF-R2, CD-30 y CD-40, y de otros receptores, por ejemplo CD-28, se observa que son preferidos para el segmento (1) del polipéptido según la invención.

Por lo tanto, un polipéptido preferido según la invención es una proteína de fusión recombinante que en principio contiene los siguientes elementos estructurales (monómeros) en una secuencia definida: segmento (1), por ejemplo en el terminal N, un ligando o fragmento receptor o péptido; segmento (2) una secuencia enlazadora; segmento (3), por ejemplo en el terminal C, el dominio extracelular humano de FasL o de TNF o de CD40L. Análogamente, por ejemplo CD30L, Ox40L u otros miembros de la familia del TNF pueden servir como segmento (3) en los polipéptidos correspondientes según la invención.

Un objetivo adicional de la presente invención son los ácidos nucleicos con secuencias (en particular secuencias de ADN) que codifican proteínas de fusión de la susodicha naturaleza según la invención (montajes de ácido nucleico) o contienen dicha región que codifica un polipéptido según la invención. Dichos montajes de ácido nucleico se expresan preferentemente en vectores de expresión. Los vectores correspondientes que contienen una secuencia de ADN para las proteínas de fusión según la invención son también por lo tanto también objeto de la presente invención. Preferentemente, los vectores según la invención tienen una capacidad de expresión y/o ampliación en una célula procariótica y/o eucariótica. En particular, la presente invención se refiere también a vectores retrovíricos y a todos los sistemas vectoriales que se utilizan en terapia génica, por ejemplo los sistemas vectoriales adenovíricos. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, los procedimientos de la terapia génica con los vectores o montajes de ácido nucleico según la invención se dan a conocer también como métodos de tratamiento para las indicaciones médicas dadas a conocer según la invención.

Un objetivo adicional de la presente invención son las células hospedadoras que se transfectan con ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión según la invención. En este contexto, las células hospedadoras que se transfectan con vectores de expresión según la invención o montajes de ácido nucleico según la invención, en las que los vectores de expresión a su vez contienen secuencias de ADN que codifican las proteínas de fusión según la invención, son muy particularmente preferidas.

Un objetivo adicional de la presente invención son los procedimientos para la producción (expresión y aislamiento) de polipéptidos según la invención, en los que un procedimiento de aislamiento según la invención está caracterizado por lo general por (a) provisión de un vector o de un montaje de ácido nucleico según la invención, (b) transfección de células con un vector o montaje de ácido nucleico obtenido según la etapa (a) del procedimiento, (c) cultivo de las células transfectadas según (b), y (d) aislamiento de polipéptidos según la invención expresado en condiciones apropiadas a partir de las células hospedadoras y/o del sobrenadante del cultivo. En este caso, la expresión de la proteína de fusión se efectúa por lo general según el estado actual de la tecnología en los sistemas de expresión adecuados, preferentemente como producto segregado de transfectantes estables, por ejemplo células CHO o en otras células animales tales como Cos7 o SF9 (células de insectos) u otros sistemas de células eucarióticas, en particular en levaduras, por ejemplo *Pichia pastoris*. Preferentemente, los polipéptidos expresados según la invención tienen secuencias principales relevantes adecuadas para la secreción en el sistema celular. Por consiguiente, los vectores según la invención utilizados para la expresión contendrán también secuencias de codificación que codifican una secuencia funcional principal.

Los polipéptidos según la invención, pero cuando proceda también los montajes de ácido nucleico, los vectores o las células hospedadoras (resumidas en la presente memoria en la categoría "sustancias según la invención" o "objetos según la invención") son también posibles como fármacos o para la producción de un fármaco. Pueden utilizarse en particular cuando las sustancias según la invención, después de la unión de la proteína de fusión a través del módulo 2 de la misma (segmento (1)) a una molécula diana localizada en la membrana (celular) específica están destinadas a manifestar la acción biológica mediante el correspondiente receptor del fragmento del ligando receptor del TNF según el módulo 1 (segmento (3)). Por selección adecuada del módulo 2, la actividad del ligando receptor del TNF de la sustancia según la invención se dirige al tejido que debe tratarse, o al tipo de célula que debe tratarse, y puede producirse un agente terapéutico adaptado/optimizado para la indicación en cuestión.

Después de la administración *in vivo*, por ejemplo durante la utilización como agente terapéutico tumoral, en particular para el tratamiento de tumores sólidos, pero también de tumores linfáticos (benignos y malignos), un polipéptido según la invención está en primer lugar específicamente unido por el dominio de fijación a la molécula de la superficie celular (módulo 2) en la propia área del tumor al sistema vascular reactivo estroma tumoral/tumor y de este modo está activado. Los receptores correspondientes al fragmento del ligando receptor del TNF (módulo 1) puede activarse a continuación y por ejemplo provocan apoptosis (módulo 1 por ejemplo fragmento soluble de FasL o TRAIL) o activan a linfocitos T infiltrantes (módulo 1 por ejemplo fragmento soluble de CD40L). Después de la administración *in vivo*, por ejemplo durante la utilización como agente terapéutico tumoral en enfermedades autoinmunitarias, un polipéptido según la invención en primer lugar llegará a estar unido por el dominio de fijación a la molécula de la superficie celular (módulo 2) a un marcador de superficie de linfocitos T activados (por ejemplo CD40L) o de macrófagos activados (por ejemplo TNF de la membrana) y de este modo llega a estar por completo biológicamente activo. Los receptores correspondientes al fragmento del ligando receptor del TNF (módulo 1) puede activarse a continuación y por ejemplo provocan apoptosis (módulo 1 por ejemplo fragmento soluble de FasL o TRAIL).

Sin embargo, en principio la utilización de sustancias según la invención siempre deseable para la utilización en el campo terapéutico si la activación de una cadena de transducción de señal, por ejemplo las cascadas de señal activadas por la familia del receptor del TNF, por ejemplo una cascada de señal apoptótica debe activarse. Por lo tanto, la utilización de sustancias según la invención en el tratamiento o para la producción de un fármaco para el tratamiento de todas las enfermedades hiperproliferantes es una posibilidad, por ejemplo para la eliminación orientada de células del sistema inmunitario en exceso de reacciones inmunitarias, por ejemplo en enfermedades autoinmunitarias, tales como por ejemplo la esclerosis múltiple, la artritis reumatoidea, la diabetes mellitus y TEN, o en reacciones inmunitarias aberrantes contra antígenos extraños tales como pueden producirse por ejemplo en enfermedades infecciosas (bacterianas (por ejemplo debidas a micobacterias), víricas o protozoarias). Además, una posibilidad es el tratamiento de enfermedades metabólicas o afecciones hiperinflamatorias generales, en particular la inflamación crónica, por ejemplo también en alergias, pero también el tratamiento de reacciones de rechazo por el sistema inmunitario del paciente contra el tejido extraño. En dichos casos, el dominio de unión de la molécula de la superficie de la célula (módulo 2), es decir el segmento (1) de un polipéptido según la invención, debe reconocer en cada caso marcadores característicos en la superficie de las células diana, en las que debe desencadenarse preferentemente una cascada de señal apoptótica para la muerte celular. Así por ejemplo, en el caso del tratamiento tras el trasplante de tejido extraño, las células endógenas del sistema inmunitario del paciente del trasplante responsables de la reacción de rechazo servirán como células diana. De este modo, por ejemplo en el caso del tratamiento de la artritis reumatoidea, los macrófagos endógenos activados que contribuyen sustancialmente a la enfermedad servirán como células diana.

Los objetivos según la invención, tales como los montajes de ácido nucleico, vectores de expresión o células hospedadoras – tal como se especificó anteriormente – son también posibilidades como fármacos, por ejemplo para el tratamiento de dichas enfermedades. En este caso, las células que deben transfectarse se extraen preferentemente del paciente que ha de tratarse, éstas se transfectan *in vitro* con vectores de expresión según la invención, se cultivan y a continuación se transfieren al paciente en forma de trasplante. La transfección se efectúa preferentemente mediante montajes de ácido nucleico o vectores de expresión según la invención que acoplan la expresión a un activador controlable. El autotrasplante transfectado puede administrarse localmente, por ejemplo inyectarse, dependiendo de la enfermedad específica y de las células dianas específicas. Se prefiere por ejemplo la administración local en el caso de la terapia tumoral. En ésta, las células tumorales se extraen del paciente, se transfectan *in vitro* y a continuación preferentemente se inyectan directamente en el tumor. Este procedimiento es adecuado por ejemplo para el tratamiento de tumores de piel (por ejemplo melanomas), tumores del sistema nervioso (por ejemplo glioblastomas), etc.

Un objetivo adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene polipéptidos según la invención, montajes de ácido nucleico según la invención, vectores según la invención y/o células hospedadoras según la invención y adyuvantes farmacéuticamente inocuos, aditivos y/o sustancias excipientes (por ejemplo también disolventes). Por lo tanto según la invención se da a conocer una combinación de sustancias según la invención con excipiente, adyuvante y/o sustancias aditivas farmacéuticamente aceptables. Las vías de producción adecuadas se dan a conocer en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, partícula, 1980). Para administración parenteral, agua esterilizada, soluciones salinas esterilizadas, polialquilenglicoles, naftaleno hidrogenado y en particular polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno son posibles por ejemplo como excipientes. Dichas composiciones según la invención son posibles para todas las indicaciones médicas dadas a conocer anteriormente.

En principio, en el contexto de la presente invención todas las vías de administración conocidas en el estado actual de la tecnología se dan a conocer para las sustancias según la invención o las composiciones según la invención. Preferentemente, la administración de un fármaco para el tratamiento de las enfermedades o trastornos susodichos se efectúa por vía de administración parenteral, es decir, por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa, oral o intranasal. Por lo general, las composiciones farmacéuticas según la invención serán sólidas, líquidas o en aerosol (por ejemplo formuladas como pulverización). Sin embargo, la forma de la composición será modificable dependiendo de la naturaleza de la presentación.

En resumen, puede decirse que según la invención se proporcionan proteínas de fusión dobles específicas con propiedades proapoptóticas e inmunomodulatoria, que contienen fragmentos solubles de ligandos receptores del TNF localizados en la membrana *a priori* que son inactivos y de actividad restringida, que pueden activarse, sin embargo, localmente uniéndose a las estructuras de la célula que no interactúan con el fragmento de ligando receptor del TNF. El propio dominio de unión de la molécula de la superficie de la célula puede ser una segunda citocina, un receptor de ligandos localizados en la membrana u otro péptido (o un fragmento del mismo) que no sea anticuerpo que se introduce en la unión específica a la estructuras de la membrana celular. Mediante este dominio de fijación a la molécula de la superficie celular, puede producirse la actividad del ligando receptor del TNF se dirige al tejido que va a tratarse o a los tipos de células que van a tratarse, y a un agente terapéutico adaptado/optimizado para la indicación específica. Por lo tanto, globalmente la selectividad de la acción del ligando receptor del TNF se consigue con los presentes polipéptidos según la invención mediante dos mecanismos: por una parte mediante el enriquecimiento de la proteína de fusión que es inactiva o de actividad restringida en el estado no unido mediado por el dominio de unión de la molécula de la superficie de la célula y más significativamente mediante la activación del mismo por la unión de la molécula de la superficie celular, es decir inmovilización.

La presente invención se ilustra con más detalle en los siguientes diagramas.

En la Fig. 1, se muestran los resultados de los estudios en relación con la producción de apoptosis preferencial por las proteínas de fusión según la invención en el caso de las células positivas a CD40L. Para poder detectar fácilmente la expresión de CD40L la proteína fluorescente amarilla YFP se fusionó con el dominio intracelular de la CD40L.

La Fig. 1A muestra la expresión de la proteína de fusión CD40L-YFP en las células madre KB y HT1080 y los transfectantes procedentes de las mismas que expresan de manera estable CD40L-YFP, utilizando análisis FACS. Una fotografía correspondiente se obtiene también por análisis FACS con anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de CD40L (datos no mostrados).

Las Figs. 1B a 1D muestran respectivamente un gráfico de la vitalidad celular (en %) frente a la concentración de la respectiva proteína de fusión especificada. Las curvas representadas reproducen los resultados del tratamiento de las células HT1080 y KB positivas a CD40L (HT1080-CD40L, KB-CD40L) o negativas a CD40L con los montajes CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex.

En los experimentos según la Fig. 1B, las células HT-1080 y HT1080-CD40L-YFP (diagrama de la izquierda) y células KB y KB-CD40L-YFP (diagrama de la derecha) respectivamente se cultivaron durante la noche en una laca de cultivo celular con 96 pocillos. Al día siguiente, las células se estimularon con las concentraciones especificadas de CD40ex-Flag-FasLex. En paralelo, para la sensibilización de la producción de apoptosis las células se trataron con CHX (2,5 µl). Al día siguiente, se determinó la vitalidad celular por tinción con violeta de cristal.

En los experimentos según la Fig. 1C, las células HT1080 y HT1080-CD40L-YFP se cultivaron durante la noche en una placa de cultivo celular con 96 pocillos. Al día siguiente, se estimularon las células con las concentraciones de CD40ex-Flag-TRAILex. Si no, el procedimiento utilizado era el descrito en la Fig. 1B.

En la Fig. 1D, a modo de ejemplo se demuestra que la muerte celular producida en las células HT1080 que expresan CD40L por CD40ex-Flag-FasLex está mediada por Fas. De nuevo, las células HT1080-CD40L-YFP se cultivaron durante la noche en una placa de cultivo celular con 96 pocillos. Al día siguiente, se estimularon las células se estimularon con 100 ng/ml de CD40ex-Flag-FasLex. Cuando se indicaba, el reactivo CD40ex-Flag-FasLex se preincubaba de antemano con 2 µg/ml de Fas-Fc o Fas-Comp respectivamente. Si no, el procedimiento utilizado era el descrito en la Fig. 1B o 1C respectivamente. Por enmascaramiento del contenido de FasL en CD40ex-Flag-FasLex con los reactivos Fas-Fc y Fas-Comp solubles con la unión FasL, la producción de apoptosis en células positivas a CD40L podría bloquearse parcial o completamente respectivamente.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos prácticos.

Ejemplo 1

Construcción de los polipéptidos CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex

Montaje (A): CD40ex-Flag-FasLex

NH₂-[CD40(1-192)]-[enlazador con flag-tag]-[FasL(139-281)]-COOH

CD40(1-192): dominio extracelular del receptor CD40 humano que incluye la secuencia principal (AA 1-192)

Enlazador I: enlazador con epítipo flag (en negrilla)

GSDYKDDDDKEFGRGDSPGRGDSP

FasL(139-281): dominio extracelular del FasL humano (AA 139-281)

Montaje (B): CD40ex-Flag-TRAILex
 NH₂-[CD40(1-192)]-[enlazador=flag-tag]-[TRAIL(95-281)]-COOH

CD40(1-192): dominio extracelular del receptor CD40 humano que incluye la secuencia principal (AA 1-192)
 5 Enlazador I: enlazador con epítipo flag (en negrilla)
GSDYKDDDDKEF
 TRAIL(95-281): dominio extracelular del TRAIL humano (AA 95-281)

Las proteínas de fusión se prepararon de la manera siguiente:

10 CD40ex-Flag-FasLex

1. El ADNc correspondiente al dominio extracelular del receptor CD40 (aminoácidos 1-192 incl. la secuencia principal) se amplió por RCP con "revisión del texto" a partir de una mezcla de ADNc de linfocitos B activados. Para
 15 ésto, mediante los cebadores utilizados (nº 1160 y nº 1161) se insertó la enzima de escisión Hind3 en el extremo 5' del amplicón y la enzima de escisión BamHI en el extremo 3'. El amplicón digerido con Hind3 y BamHI se introdujo a continuación en el vector de expresión eucariótico pCR3 (Invitrogen) digerido asimismo con Hind3 y BamHI.

2. El ADNc correspondiente al dominio extracelular del FasL (aminoácidos 139-281 se amplió por RCP con
 20 "revisión del texto" a partir de una mezcla de ADNc de linfocitos T activados. Para ésto, mediante los cebadores utilizados (nº 1106 y nº 1107) se insertó la enzima de escisión EcoRI en el extremo 5' del amplicón y la enzima de escisión XhoI en el extremo 3'. Además, mediante el cebador directo se introdujeron seis aminoácidos como enlazador. El amplicón digerido con EcoRI y XhoI se insertó a continuación en el producto intermedio que se obtuvo en 1., digerido asimismo con EcoRI y XhoI.

3. Por último, se insertó una flag-tag mediante enlazadores oligonucleotídicos entre las enzimas de escisión BamHI
 25 y EcoRI del producto intermedio obtenido en 2. El montaje obtenido de este modo (pCR3-CD40ex-Flag-FasLex) codifica una proteína de fusión con el dominio extracelular de la molécula CD40 y el dominio extracelular del ligando Fas, que están unidos por una flag-tag y unos pocos AA más.

30 CD40ex-Flag-TRAILex

1. El ADNc correspondiente al dominio extracelular de TRAIL (aminoácidos 95-281) se amplió por RCP con
 35 "revisión del texto" a partir de una mezcla de ADNc de linfocitos T activados. Para esto, mediante los cebadores utilizados (nº 1302 y nº 1334) se insertó la enzima de escisión EcoRI en el extremo 5' del amplicón y la enzima de escisión XbaI en el extremo 3'. El amplicón digerido con EcoRI y XbaI se introdujo a continuación en el vector de expresión pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex asimismo digerido con EcoRI y XbaI. Antes de la ligadura, se eliminó por digestión el fragmento FasL liberado de pCR3-CD40ex-Flag-FasL-ex. El montaje (pCR3-CD40ex-Flag-TRAILex) obtenido de este modo codifica una proteína de fusión con el dominio extracelular de la molécula CD40 y el dominio
 40 extracelular de la molécula TRAIL que están unidos por una flag-tag y unos pocos aminoácidos (AA) más.

Para obtener CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex, células HEK293 o Cos7 se transfectaron con los
 45 montajes descritos anteriormente con lipofectamina (Gibco-BRL) según las instrucciones del fabricante. 48 a 96 horas después de la transfección, los sobrenadantes de la proteína de fusión se filtraron estériles y se almacenaron a 4°C hasta la utilización ulterior.

Todas las etapas de clonación y de ampliación por RCP se llevaron a cabo por procedimientos ordinarios normales
 con los cebadores siguientes. Se secuenciaron todos los montajes para la verificación de la secuencia del ADNc.

50 Cebador 1106

5' CCG GAA TTC GGC CGG GGC GAC TCA CCC GGC CGG GGC GAC TCA
CCC GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC 3'

Cebador 1107

5' CCG CTC GAG GTG CTT CTC TTA GAG CTT ATA TAA GCC G 3'

Cebador 1160

5' CCC AAG CTT CTC GCC ATG GTT CGT CTG CCT CTG CAG 3'

Cebador 1161

5' CGC GGA TCC CAG CCG ATC CTG GGG ACC ACA GAC 3'

Cebador 1302

5' CCG GAA TTC TAC GCA TAT TAC ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA
G 3'

Cebador 1334

5' TGC TCT AGA CCA GGT CAG TTA GCC AAC TAA AAA GGC 3'

Ejemplo 2

Demostración de la activación dependiente de CD40L de CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex en el caso de las células que expresan CD40L (véase también la Fig. 1A).

Se prepararon CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex tal como se describe en el ejemplo 1. Se cultivaron durante la noche células que expresan CD40L (HT1080-CD40L; KB-CD40L-YFP) y negativas a CD40L (HT1080; KB) en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Al día siguiente, se incubaron las células con las concentraciones especificadas de CD40ex-Flag-FasLex y CD40ex-Flag-TRAILex durante 8 h en presencia de CHX (2,5 µl/ml). Las células supervivientes se cuantificaron por tinción con violeta cristal.

LISTADO DE SECUENCIAS

SOLICITANTE

1. NOMBRE: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
CALLE: Seehausstrasse 7
CIUDAD: Tiefenbronn
CÓDIGO POSTAL: 75233
TELÉFONO: 07 11/6 85 69 86
TELEFAX: 07 11/6 85 74 84

2. NOMBRE: Prof. Dr. Harald Wajant
CALLE: Sonnenbühl 2
CIUDAD: Leinfelden-Echterdingen
CÓDIGO POSTAL: 70771
TELÉFONO: 07 11/6 85 69 86
TELEFAX: 07 11/6 85 74 46

TÍTULO DE LA INVENCION: Activación local selectiva de miembros de la familia de ligandos TNF de proteínas de fusión del ligando TNF sin anticuerpos sistémicamente inactivas

NÚMERO DE SECUENCIAS: 2 secuencias de ADN
2 secuencias de proteína

FORMA LEGIBLE POR EL ORDENADOR:

TIPO MEDIO: Disquete
ORDENADOR: PC
SISTEMA OPERATIVO: MS DOS
PROGRAMA INFORMÁTICO: Windows nucleótido

Descripción 1 de la secuencia: Secuencia del ADN de codificación (a continuación, solo cadena de ADN de codificación, nucleótido (NT) 1-1080) y secuencia traducida de aminoácidos (anteriormente, código de aminoácidos de una sola letra (aminoácidos) 1-359) de una proteína de fusión de la invención por el ejemplo de CD40ex-Flag-FasL (montaje A).

ES 2 365 691 T3

1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80
193	AGC	GAA	TTC	CTA	GAC	ACC	TGG	AAC	AGA	GAG	ACA	CAC	TGC	CAC	CAG	CAC	240
81	K	Y	C	D	P	N	L	G	L	R	V	Q	Q	K	G	T	96
241	AAA	TAC	TGC	GAC	CCC	AAC	CTA	GGG	CTT	CGG	GTC	CAG	CAG	AAG	GGC	ACC	288
97	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	112
289	TCA	GAA	ACA	GAC	ACC	ATC	TGC	ACC	TGT	GAA	GAA	GGC	TGG	CAC	TGT	ACG	336
113	S	E	A	C	E	S	C	V	L	H	R	S	C	S	P	G	128
337	AGT	GAG	GCC	TGT	GAG	AGC	TGT	GTC	CTG	CAC	CGC	TCA	TGC	TCG	CCC	GGC	384
129	F	G	V	K	Q	I	A	T	G	V	S	D	T	I	C	E	144
385	TTT	GGG	GTC	AAG	CAG	ATT	GCT	ACA	GGG	GTT	TCT	GAT	ACC	ATC	TGC	GAG	432
145	P	C	P	V	G	F	F	S	N	V	S	S	A	F	E	K	160
433	CCC	TGC	CCA	GTC	GGC	TTC	TTC	TCC	AAT	GTG	TCA	TCT	GCT	TTC	GAA	AAA	480
161	C	H	P	W	T	S	C	E	T	K	D	L	V	V	Q	Q	176
481	TGT	CAC	CCT	TGG	ACA	AGC	TGT	GAG	ACC	AAA	GAC	CTG	GTT	GTG	CAA	CAG	528
177	A	G	T	N	K	T	D	V	V	C	G	P	Q	D	R	L	192
529	GCA	GGC	ACA	AAC	AAG	ACT	GAT	GTT	GTC	TGT	GGT	CCC	CAG	GAT	CGG	CTG	576
193	G	S	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	G	R	G	D	208
577	GGA	TCC	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	GGC	CGG	GGC	GAC	624
209	S	P	G	R	G	D	S	P	E	K	K	E	L	R	K	V	224
625	TCA	CCC	GGC	CGG	GGC	GAC	TCA	CCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	672
225	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	240
673	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	720
241	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	256
721	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	768
257	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	272
769	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	816
273	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	288
817	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	864
289	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	304
865	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	912
305	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	320
913	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	960
321	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	336
961	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	1008
337	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	352
1009	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	1056
353	F	F	G	L	Y	K	L	*									359
1057	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TAA									1080

Características del montaje A:

Secuencia del dominio extracelular de CD40 (AA 1-192) incl. secuencia principal: NT 1-576, aminoácidos 1-192

- 5 Secuencia del epítipo "Flag" que contiene el enlazador entre los dominios extracelulares de CD40 y FasL: NT 577-648, AA 193-216

Secuencia del fragmento FasL humano (dominio extracelular, de los AA 139-281 de la molécula FasL humana natural): NT 649-1077, aminoácidos 217-359

- 10 Codón de terminación: NT 1078-1080

- 15 **Descripción 2 de la secuencia:** Secuencia del ADN de codificación (a continuación, solo cadena de ADN de codificación, nucleótido (NT) 1-1176) y secuencia traducida de aminoácidos (anteriormente, código de aminoácidos de una sola letra (aminoácidos) 1-391) de una proteína de fusión de la invención por el ejemplo de CD40ex-Flag-TRAIL (montaje B).

1	M	V	R	L	P	L	Q	C	V	L	W	G	C	L	L	T	16
1	ATG	GTT	CGT	CTG	CCT	CTG	CAG	TGC	GTC	CTC	TGG	GGC	TGC	TTG	CTG	ACC	48
17	A	V	H	P	E	P	P	T	A	C	R	E	K	Q	Y	L	32
49	GCT	GTC	CAT	CCA	GAA	CCA	CCC	ACT	GCA	TGC	AGA	GAA	AAA	CAG	TAC	CTA	96
33	I	N	S	Q	C	C	S	L	C	Q	P	G	Q	K	L	V	48
97	ATA	AAC	AGT	CAG	TGC	TGT	TCT	TTG	TGC	CAG	CCA	GGA	CAG	AAA	CTG	GTG	144
49	S	D	C	T	E	F	T	E	T	E	C	L	P	C	G	E	64
145	AGT	GAC	TGC	ACA	GAG	TTC	ACT	GAA	ACG	GAA	TGC	CTT	CCT	TGC	GGT	GAA	192
65	S	E	F	L	D	T	W	N	R	E	T	H	C	H	Q	H	80
193	AGC	GAA	TTC	CTA	GAC	ACC	TGG	AAC	AGA	GAG	ACA	CAC	TGC	CAC	CAG	CAC	240
81	K	Y	C	D	P	N	L	G	L	R	V	Q	Q	K	G	T	96
241	AAA	TAC	TGC	GAC	CCC	AAC	CTA	GGG	CTT	CGG	GTC	CAG	CAG	AAG	GGC	ACC	288
97	S	E	T	D	T	I	C	T	C	E	E	G	W	H	C	T	112
289	TCA	GAA	ACA	GAC	ACC	ATC	TGC	ACC	TGT	GAA	GAA	GGC	TGG	CAC	TGT	ACG	336
113	S	E	A	C	E	S	C	V	L	H	R	S	C	S	P	G	128
337	AGT	GAG	GCC	TGT	GAG	AGC	TGT	GTC	CTG	CAC	CGC	TCA	TGC	TCG	CCC	GGC	384
129	F	G	V	K	Q	I	A	T	G	V	S	D	T	I	C	E	144
385	TTT	GGG	GTC	AAG	CAG	ATT	GCT	ACA	GGG	GTT	TCT	GAT	ACC	ATC	TGC	GAG	432
145	P	C	P	V	G	F	F	S	N	V	S	S	A	F	E	K	160
433	CCC	TGC	CCA	GTC	GGC	TTC	TTC	TCC	AAT	GTG	TCA	TCT	GCT	TTC	GAA	AAA	480
161	C	H	P	W	T	S	C	E	T	K	D	L	V	V	Q	Q	176
481	TGT	CAC	CCT	TGG	ACA	AGC	TGT	GAG	ACC	AAA	GAC	CTG	GTT	GTG	CAA	CAG	528
177	A	G	T	N	K	T	D	V	V	C	G	P	Q	D	R	L	192
529	GCA	GGC	ACA	AAC	AAG	ACT	GAT	GTT	GTC	TGT	GGT	CCC	CAG	GAT	CGG	CTG	576
193	G	S	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	T	S	E	E	208
577	GGA	TCC	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	ACC	TCT	GAG	GAA	624
209	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	224
625	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	672
225	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	240
673	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	720
241	G	R	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	256
721	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	768
257	L	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	272
769	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	816

273	F	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	288
817	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	864
289	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	304
865	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	912
305	E	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	320
913	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	960
321	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	336
961	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	1008
337	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	352
1009	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	1056
353	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	368
1057	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	1104
369	S	V	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	E	A	S	F	384
1105	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	1152
385	F	G	A	F	L	V	G	*									391
1153	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	TAA									1176

5 Características del montaje B:

Secuencia del dominio extracelular de CD40 (AA 1-192) incl. secuencia principal: NT 1-576, aminoácidos 1-192

10 Secuencia del epítipo "Flag" que contiene el enlazador entre los dominios extracelulares de CD40 y TRAIL: NT 577-612, AA 193-204

Secuencia del fragmento FasL humano (dominio extracelular, de los AA 139-281 de la molécula FasL humana natural): NT 613-1173, aminoácidos 205-391

15 Codón de terminación: NT 1174-1176

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende un segmento (1), que contiene un dominio de unión a la molécula de la superficie celular, no procediendo el dominio que se une a la molécula de la superficie celular de una inmunoglobulina, un
5 segmento (2), que es un enlazador peptídico, y un segmento (3), que contiene un fragmento de un miembro de la familia del ligando TNF que como tal es biológicamente inactivo/de actividad restringida, en el que el fragmento en el segmento (3) contiene un dominio extracelular de un miembro de la familia del ligando TNF o una variante que presenta por lo menos el 80% de homología de secuencia de la secuencia natural del dominio extracelular, y en el
10 que el fragmento en el segmento (3) se vuelve biológicamente activo por completo sólo cuando el segmento (1) se une a la molécula de la superficie celular.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que los segmentos (1) a (3) están dispuestos desde el terminal N al terminal C.
- 15 3. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que el segmento (3) contiene el dominio extracelular de TRAIL, FasL, TNF, 41BBL, CD40L, CD30L u Ox40L.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio de unión a la molécula de la superficie celular se une a una proteína de la membrana.
- 20 5. Polipéptido según la reivindicación 4, en el que el dominio de unión a la molécula de la superficie celular comprende por lo menos el segmento de un ligando de un receptor localizado en la membrana que se requiere para la interacción específica con la molécula de la superficie celular.
- 25 6. Polipéptido según la reivindicación 5, en el que el ligando es un péptido u hormona proteica que se une al receptor o un fragmento de una citocina que se une al receptor.
7. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que el fragmento de citocina es un fragmento de un miembro de la familia del ligando del TNF, con la condición de que sea diferente el miembro de la familia del ligando TNF del que
30 proceden los segmentos (1) y (3).
8. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que la hormona se selecciona de entre el grupo constituido por factores de crecimiento, en particular EGF, y factores de angiogenia, en particular VEGF.
- 35 9. Polipéptido según la reivindicación 4, en el que el dominio de unión a la molécula de la superficie celular comprende por lo menos el segmento de un receptor para un ligando localizado en la membrana que se requiere para la interacción específica con la molécula de la superficie celular, con la condición de que el segmento receptor no esté unido al dominio extracelular del miembro de la familia del ligando del TNF según el segmento (3).
- 40 10. Polipéptido según la reivindicación 9, en el que el receptor se selecciona de la superfamilia del receptor del TNF.
11. Polipéptido según la reivindicación 9 ó 10, en el que el receptor se selecciona de entre el grupo constituido por TNF-R2, CD30, CD40 Y CD28.
- 45 12. Montaje de ácido nucleico que contiene una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido según una de las reivindicaciones anteriores.
13. Vector, que contiene un montaje de ácido nucleico según la reivindicación 12.
- 50 14. Célula hospedadora, que contiene el montaje de ácido nucleico según la reivindicación 12 y/o el vector según la reivindicación 13.
15. Procedimiento para el aislamiento de un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que
- 55 (a) se prepara un vector según la reivindicación 13 o un ácido nucleico según la reivindicación 12,
- (b) se transfectan células con un vector o se obtiene el montaje de ácido nucleico según el procedimiento de la etapa (a),
- 60 (c) se cultivan las células transfectadas según el apartado (b), y
- (d) los polipéptidos expresados en condiciones apropiadas se aíslan de las células hospedadoras y/o del sobrenadante del cultivo.
- 65 16. Polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 11, montaje de ácido nucleico según la reivindicación 12, vector según la reivindicación 13 o célula hospedadora según la reivindicación 14 como medicamento.

- 5 17. Polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 11, montaje de ácido nucleico según la reivindicación 12, vector según la reivindicación 13 o célula hospedadora según la reivindicación 14 para su utilización en el tratamiento de enfermedades cancerosas, en particular de tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, cuadros inflamatorios y enfermedades autoinmunitarias, en particular reumáticas o artríticas.
- 10 18. Composición farmacéutica que contiene por lo menos un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 11 y/o un montaje de ácido nucleico según la reivindicación 12 y/o un vector según la reivindicación 13 y/o células hospedadoras según la reivindicación 14, así como sustancias auxiliares, aditivos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18 para su utilización en el tratamiento de enfermedades cancerosas, en particular de tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, cuadros inflamatorios y enfermedades autoinmunitarias, en particular reumáticas o artríticas.

Figura 1

