

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 896**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/525</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/62</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/19</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2005 E 05716360 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1727833**

54 Título: **Polipéptidos recombinantes de los miembros de la familia de ligandos de TNF y su utilización**

30 Prioridad:

**26.03.2004 DE 102004014983**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.01.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT STUTTGART (100.0%)  
Keplerstrasse 7  
70174 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

**PFIZENMAIER, KLAUS;  
SCHEURICH, PETER;  
GRUNWALD, INGO y  
KRIPPNER-HEIDENREICH, ANJA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 439 896 T3**

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

Polipéptidos recombinantes de los miembros de la familia de ligandos de TNF y su utilización.

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para la manipulación, depleción y/o eliminación extracorporal de componentes contenidos en los líquidos corporales, por ejemplo por medio de aféresis.

En el caso de los miembros de la familia de ligandos de TNF se trata de citocinas proinflamatorias. Las citocinas en general y los miembros de la familia de ligandos de TNF en particular desempeñan un papel importante en la estimulación y coordinación del sistema inmunitario innato así como de la respuesta inmunitaria humoral (mediada por anticuerpos), en la inducción de apoptosis, en la creación de huesos, en la formación de los soportes estructurales para el crecimiento de pelo, el crecimiento de los dientes y el desarrollo de las glándulas sudoríparas, el soporte estructural de ganglios linfáticos y muchos más (Aggarwal, B.B. (2003), *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745-756). Por el contrario, una regulación deficiente de los miembros de la familia de ligandos de TNF puede conducir a numerosos estados patológicos. A éstos pertenecen, por ejemplo, el choque septicémico, enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, o enfermedades neurodegenerativas. El factor de necrosis tumoral (TNF) es el miembro que da nombre y probablemente el más importante de esta gran familia de citocinas.

Los miembros de la familia de ligandos de TNF despliegan su acción en su forma biológicamente activa como homotrímeros (Banner, D.W. *et al.* (1993) *Cell* 73, 431-445). Las estructuras triméricas y también las agregaciones de orden superior (por ejemplo oligómeros o multímeros de trímeros) de proteínas pueden encontrarse en gran número en la naturaleza. Ejemplos son la proteína de matriz del cartílago (CMP), una proteína del tejido conjuntivo (Beck *et al.* (1996), *J Mol Biol* 256, 909-923), proteínas de la familia del colágeno, tal como la familia Clq, a la que pertenecen Clq, colágeno  $\alpha 1$  (X),  $\alpha 2$  (VII), la proteína específica de la hibernación, ACRP30, la proteína de la estructura interna del oído, celebrina y multimerina (Kishore y Reid, (1999), *Immunopharmacol.* 42, 15-21), y proteínas de la familia de la colectina, tal como la proteína surfactante pulmonar A (SP-A) y la proteína de unión a manosa (MBP) (Epstein *et al.* (1996), *Current Opinion in Immunology*, vol. 8 n.º 1, 29-35).

La disposición conjunta de proteínas para dar un trímero tiene lugar en las superficies de estas proteínas que se trimerizan en disolución debido a interacciones, tales como interacciones hidrófobas, uniones por puente de hidrógeno, uniones covalentes (por ejemplo puentes disulfuro) y/o fuerzas de Coulomb, pero también debido a motivos estructurales, es decir secuencias de aminoácidos características, que provocan una formación de superestructuras secundarias intermoleculares. En el caso de los miembros de la familia de ligandos de TNF, los tres monómeros se mantienen juntos en la estructura homotrímica de manera no covalente a través de uniones hidrófobas. En su forma activada activan a su vez los miembros de la familia de receptores de TNF opuestos a ellos, que como tales no presentan actividad enzimática. Por ejemplo, el TNF, como miembro de la familia de ligandos de TNF, se une a los dos receptores de membrana TNFR1 y TNFR2 y facilita la trimerización o la activación de receptores que se encuentran ya en forma de trímeros, pero inactivos desde el punto de vista de las señales. Mediante la formación de complejos de los receptores se inicia una cascada de señales con la que, entre otros, va acompañada una asociación de proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Wajant, H. *et al.* (2003), *Cell Death, Differ.* 10, 45-65). La estructura trimérica de TNFR1 y TNFR2 se presenta de tal manera que los receptores se unen en cada caso en el intersticio entre dos de los tres monómeros de TNF del homotrímero de TNF (Banner *et al.* (1993) citado anteriormente). De esto resulta evidente que tanto el TNF como los otros miembros de la familia de ligandos de TNF sólo son biológicamente activos en su estructura como homotrímero.

Debido a su función, los miembros der familia de ligandos de TNF o sus receptores de membrana pueden utilizarse de múltiples maneras para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como enfermedades infecciosas e inflamatorias, enfermedades metabólicas, enfermedades que se deben a una regulación deficiente de la apoptosis, enfermedades neurodegenerativas y muchas otras enfermedades. Un papel especialmente importante lo desarrolla su utilización en el tratamiento de enfermedades cancerosas, dado que en el caso de los miembros de la familia de ligandos de TNF se trata en general de sustancia de acción antitumoral. En este contexto pueden mencionarse en particular el propio TNF (Eggermont, A.M. y ten Hagen, T.L. (2003), *Curr. Oncol. Rep.* 5, 79-80), TRAIL (*TNF related apoptoses inducing ligand*, ligando que produce apoptosis relacionadas con TNF), también denominado Apo 2L (Weley *et al.* (1995), *Immunity* 6: 673-682; Petti *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271: 12687-12689) y FasL. Sin embargo, estudios *in vivo* mostraron fuertes efectos secundarios sistémicos en el caso del TNF y agonistas del receptor Fas y estudios *in vitro* indican también efectos tóxicos similares en determinadas preparaciones de TRAIL (Jo *et al.* (2000) *Nat Med* 6: 564-567, Ichikawa *et al.* (2001) *Nat Med* 7: 954-960; Ogasawara *et al.* (1993) *Nature* 364: 806-809). Por ejemplo, anticuerpos agonistas mostraron contra Fas, el receptor de FasL, un efecto extremadamente hepatotóxico (Ogasawara *et al.* (1993) citado anteriormente). Por tanto, en el caso de ligandos/agonistas que activan Fas se ha descartado por el momento una aplicación clínica por motivos de seguridad. No obstante, debido a la gran importancia de TNF, TRAIL, FasL y otros miembros de la familia de ligandos de TNF en este campo y los efectos secundarios asociados con su aplicación en forma de una administración sistémica clínica, se han seguido varios enfoques para minimizar estos efectos secundarios (Eggermont, A.M. y ten Hagen, T.L. (2003), *Curr. Oncol. Rep.* 5, 79-80).

Así, por ejemplo el documento WO 02/22680 describe proteínas de fusión, que posibilitan un efecto dirigido y

específico de tejido o de célula de las citocinas mediante la fusión de la citocina con un anticuerpo de unión a antígeno. De esta manera se consigue que las citocinas no desplieguen ninguna acción sobre tejidos o células que no entran en contacto con estas proteínas de fusión y que se reduzcan los efectos secundarios sobre estos tejidos o células.

5 En el documento DE 102 47 755 se da a conocer un sistema independiente de anticuerpos, que posibilita igualmente una acción dirigida y específica de tejido o de célula de las citocinas. En este caso se trata de proteínas de fusión, en las que la activación de un tramo de proteína contenido en las mismas con función biológica tiene lugar a través de su unión a un dominio de unión de moléculas de la superficie celular, que representa un tramo de proteína adicional de la proteína de fusión. Además de una reducción de los efectos secundarios en los tejidos no diana, este sistema puede utilizarse ventajosamente también para moléculas de la superficie celular en las células diana para las que no hay anticuerpos o hay anticuerpos con una especificidad demasiado reducida.

15 Sin embargo, además de los efectos secundarios mencionados también es extremadamente problemático el hecho de que los homotrimeros activos de los miembros de la familia de ligandos de TNF se disocian en diluciones, es decir también en el caso de concentraciones fisiológicamente útiles. Si bien esta disociación es básicamente reversible, sin embargo la proteína pierde rápidamente su bioactividad, dado que se desnaturaliza. Se supone que esta desnaturalización tiene lugar a lo largo de la etapa de los monómeros inestables (Smith, R.A. y Baglioni, C. (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 6951-6954; Narhi, L.O. y Arakawa, T. (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun* 147, 740-746).

25 Debido a observaciones correspondientes en el caso de TRAIL, que presenta una labilidad especial, se intentó superar la estabilidad de la proteína agregando una cremallera de leucina como módulo de trimerización (Cha, S.S. *et al.*, (1999), *Immunity*. 11, 253-261). En el estado natural, TRAIL se estabiliza mediante un ión zinc, que se encuentra en el centro del ligando trimérico, y que se coordina mediante restos cisteína (Hymowitz, S.G. *et al.* (2000), *Biochemistry* 39, 633-640). Sin embargo, en este caso puede ser desventajoso que mediante la agregación de la cremallera de leucina no sólo se consiga un aumento de estabilidad, sino que también se vean perjudicadas otras propiedades, por ejemplo propiedades estructurales, tales como modificaciones estructurales, la tasa de actividad o propiedades fisiológicas.

30 En el documento WO 01/37873 se presenta un procedimiento para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por la producción de moléculas de receptores de citocinas solubles, por ejemplo receptores del factor de necrosis tumoral solubles (sTNFR). Las enfermedades comprenden muchos tipos de cáncer y determinadas enfermedades adicionales tales como infecciones por VIH. A este respecto, en una forma de realización preferida se hace pasar la sangre del paciente a través de una columna, en la que están inmovilizados anticuerpos que se unen a moléculas de sTNFR y las eliminan, y a continuación se lleva entonces la sangre de vuelta al paciente. El proceso puede realizarse solo o en combinación con otras formas de terapia.

40 En el documento WO 01/43770 se presenta un procedimiento para reforzar la respuesta inmunitaria en un mamífero, que facilita la erradicación de un estado patológico crónico. El procedimiento comprende la eliminación de inhibidores del sistema inmunitario de la circulación del mamífero y permite de este modo una respuesta inmunitaria más intensa sobre el patógeno. La eliminación de los inhibidores del sistema inmunitario se consigue poniendo en contacto un componente de la sangre libre de células, o una fracción de la misma, con una o varias parejas de unión, que pueden unirse a los inhibidores y eliminarlos de este modo de los líquidos biológicos. En la realización del procedimiento es especialmente útil una matriz absorbente, que se compone de una sustancia inerte biocompatible, que está unida covalentemente con una pareja de unión, por ejemplo un anticuerpo, que puede unirse específicamente a los inhibidores deseados.

50 En la publicación internacional WO 99/61085 se da a conocer un procedimiento para el tratamiento del cáncer utilizando ultraaféresis, que se mejoró para eliminar compuestos de menos de 120000 Dalton de peso molecular. A esto le sigue la administración de líquido de sustitución, para estimular el sistema inmunitario del paciente para atacar los tumores sólidos. En una forma de realización preferida se lleva a cabo una ultraaféresis en el paciente utilizando un ultrafiltro de tubos de capilaridad con un tamaño de poro de 0,02 - 0,05 mm y con una exclusión de peso molecular de 120000 Dalton. El líquido de recambio preferido es plasma tratado con ultraaféresis.

55 Existe por tanto la necesidad de aumentar la estabilidad de las citocinas activas, en particular los miembros de la familia de ligandos de TNF, sin que sus propiedades naturales se vean influidas desventajosamente por una modificación de su estructura, y sin que muestren fuertes efectos secundarios citotóxicos u otros en caso de aplicaciones terapéuticas.

60 La presente invención se basa en el conocimiento de que los miembros de citocina solubles que se producen de manera natural de la familia de ligandos de TNF sólo despliegan toda su bioactividad como homotrimeros, pero por otro lado tienden a desnaturalizarse en sus monómeros a través de disociación.

65 Por tanto, debe impedirse esta disociación de los homotrimeros en monómeros. Esto se consiguió uniendo covalentemente entre sí por lo menos tres monómeros de un miembro de la familia de ligandos de TNF, en particular

TNF, a través de sus extremos C y N-terminales por medio de ligandos peptídicos cortos para dar una molécula “de cadena sencilla” (a continuación “sc”), en particular para dar un scTNF. Por tanto, la molécula completa (por lo menos tres monómeros de un miembro de la familia de ligandos de TNF con los dos ligandos peptídicos) se compone de una única hebra de proteína, de modo que ya no puede tener lugar una disociación en los monómeros.

5 Se estableció que las moléculas de este tipo presentan una pérdida muy reducida de su actividad en comparación con sus miembros de tipo natural solubles correspondientes de la familia de ligandos de TNF. Al contrario, se demostró no sólo que los polipéptidos presentan las mismas actividades (cualitativas) que su miembro de tipo natural soluble correspondiente de la familia de ligandos de TNF, sino también que debido a su estabilidad considerablemente mayor también presentan todavía bioactividad en un momento en el que el miembro de tipo

10 natural soluble de la familia de ligandos de TNF ya ha perdido su actividad, es decir está disociado o desnaturalizado (para ello se remite a las diferentes pruebas de estabilidad descritas a continuación, que se describen en los ejemplos así como en las figuras).

Por un “miembro de tipo natural soluble de la familia de ligandos de TNF” debe entenderse un tramo extracelular soluble de un miembro de membrana de la familia de ligandos de TNF. A continuación se utilizan como sinónimos para el término “tipo natural soluble” las expresiones “tipo natural”, “wt”, “soluble” y “s” (para “soluble”). En particular puede tratarse de un TNF de tipo natural soluble (como miembro de la familia de ligandos de TNF), para el que de manera correspondiente a continuación se utilizan los términos sinónimos “TNF de tipo natural”, “wtTNF”, TNF soluble y “sTNF”.

Un componente A en el sentido de la invención es un monómero de TNF o un fragmento funcional o una variante funcional del mismo. Por un “monómero” debe entenderse la unidad proteica o polipeptídica más pequeña que pueda separarse de una proteína oligomérica sin separación de las uniones covalentes.

Un polipéptido o un componente A o un fragmento o una variante del mismo son funcionales en el sentido de la invención, siempre que presente su función o bioactividad, en particular su propiedad de unión a una pareja de interacción, por ejemplo un receptor de membrana, y también su propiedad de trimerización. Si bien en los fragmentos funcionales y las variantes funcionales de la invención estas funciones biológicas pueden estar modificadas, por ejemplo con respecto a su especificidad o selectividad, sin embargo la función biológica básica se mantiene.

En el estado de la técnica se conocen numerosos procedimientos para la medición de la bioactividad de una proteína, un polipéptido o una molécula, por ejemplo ensayos de proteína, que utilizan sustratos marcados, análisis de sustratos mediante procedimientos cromatográficos, tales como HPLC o cromatografía en capa fina, procedimientos espectrofotométricos, etc. (véase, por ejemplo Maniatis *et al* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY).

Por un fragmento en el sentido de la invención debe entenderse tanto un fragmento de un monómero de un miembro de la familia de ligandos de TNF como un fragmento de un polipéptido o proteína de la presente invención. Puede tratarse en este sentido de secuencias de aminoácidos, acortadas en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o dentro de la secuencia, del monómero, polipéptido o proteína. En particular en el caso de acortamientos del polipéptido o proteína dentro de la secuencia puede tratarse de acortamientos de la secuencia de uno o varios de los tres monómeros, que a su vez pueden aparecer en el extremo N-terminal, en el extremo C-terminal o dentro de la secuencia.

En una forma de realización especialmente preferida de la invención, el fragmento representa un monómero cuyo dominio extracelular corresponde a todo el dominio extracelular del miembro de tipo natural soluble de la familia de ligandos de TNF o un tramo del mismo. En particular, el fragmento representa un monómero cuyo dominio extracelular corresponde o bien al TNF de tipo natural soluble (aminoácidos 77-233) o bien a todo el dominio extracelular (aminoácidos 53-233).

La producción de tales fragmentos se conoce ampliamente en el estado de la técnica y puede realizarse por un experto en la materia aplicando procedimientos convencionales (véase por ejemplo Maniatis *et al* (2001), *Molecular cloning: Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press). En general, la producción de fragmentos de los monómeros, polipéptidos o proteínas puede realizarse modificando la secuencia de ADN que codifica para el monómero, polipéptido o proteína nativo, seguido de una transformación de esta secuencia de ADN en un huésped adecuado y la expresión de esta secuencia de ADN modificada, con la condición de que la modificación del ADN no destruya las actividades funcionales del monómero, polipéptido o proteína.

La identificación de un fragmento puede o bien tener lugar a través de la comprobación de su funcionalidad mediante la medición de su bioactividad, tal como se describió anteriormente, o bien también mediante una secuenciación del fragmento y una comparación posterior de la secuencia obtenida con la secuencia nativa. La secuenciación puede tener lugar mediante procedimientos convencionales, que son numerosos y se conocen ampliamente en el estado de la técnica.

Como variantes de monómeros, polipéptidos o proteínas biológicamente activos o fragmentos de los mismos o de un

componente A se denominan en particular aquellos monómeros, polipéptidos o proteínas o fragmentos de los mismos que presentan diferencias de secuencia con las secuencias nativas correspondientes. En el caso de estas diferencias de secuencia puede tratarse de una o varias inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, habiendo una homología de secuencia de por lo menos el 60%, preferentemente el 70%, más preferentemente el 80%, igualmente más preferentemente el 85%, aún más preferentemente el 90% y lo más preferentemente el 97%.

Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, pueden alinearse las secuencias, para compararlas a continuación entre sí. Para ello pueden introducirse por ejemplo huecos en la secuencia de la primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico y compararse los aminoácidos o nucleótidos en la posición correspondiente de la segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico. Cuando una posición en la primera secuencia de aminoácidos está ocupada con el mismo aminoácido o el mismo nucleótido que en una posición en la segunda secuencia, entonces ambas secuencias son idénticas en esta posición. La identidad porcentual entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas dividido entre las secuencias.

La determinación de la identidad porcentual de dos secuencias puede realizarse mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, pero no limitativo, de un algoritmo matemático, al que puede recurrirse para la comparación de dos secuencias, es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo está integrado en el programa NBLAST, con el que pueden identificarse secuencias que presentan una identidad deseada con las secuencias de la presente invención. Para obtener una alineación de huecos (también "gapped alignment"), tal como se describió anteriormente, puede utilizarse el programa "Gapped BLAST", tal como se describe en Altschul *et al.* (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402.

Las variantes biológicamente activas, es decir funcionales, de monómeros, polipéptidos o proteínas o fragmentos de los mismos en el sentido de la invención, pueden presentar preferentemente propiedades de unión a receptores selectivos, pudiendo estar optimizada la variante por ejemplo con respecto a su bioactividad específica u otras propiedades, en particular su estabilidad.

Dentro del término variantes están incluidas en particular aquellas secuencias de aminoácidos que presentan una sustitución conservativa con respecto a las secuencias fisiológicas. Se denominan sustituciones conservativas aquellas sustituciones en las que se intercambian aminoácidos entre sí que proceden de una misma clase. En particular hay aminoácidos con cadenas laterales alifáticas, cadenas laterales con carga positiva o negativa, grupos aromáticos en las cadenas laterales o aminoácidos, cuyas cadenas laterales pueden formar puentes de hidrógeno, por ejemplo cadenas laterales que presentan una función hidroxilo. Esto significa que, por ejemplo, un aminoácido con una cadena lateral polar se sustituye por otro aminoácido con una cadena lateral igualmente polar o por ejemplo un aminoácido caracterizado por una cadena lateral hidrófoba se sustituye por otro aminoácido con una cadena lateral igualmente hidrófoba (por ejemplo serina (treonina) por treonina (serina) o leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)). Las inserciones y sustituciones son posibles en particular en aquellas posiciones de secuencia que no provocan una modificación de la estructura tridimensional o afectan a una región de unión. Una modificación de una estructura tridimensional mediante inserción (inserciones) o deleción (deleciones) puede comprobarse fácilmente, por ejemplo, con ayuda de espectros CD (espectros de dicroísmo circular) (Urry, 1985, Absorption, circular Dichroism and ORD of Polypeptides, en: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger *et al.* (Ed.), Elsevier, Amsterdam).

Procedimientos adecuados para la producción de variantes, por ejemplo de monómeros, polipéptidos o proteínas o fragmentos de los mismos con secuencias de aminoácidos, que presentan sustituciones con respecto a la(s) secuencia(s) nativa(s), se dan a conocer por ejemplo en los documentos US 4.737.462, US 4.588.585, US 4.959.314, US 5.116.943, US 4.879.111 y US 5.017.691. La producción de variantes en general se describe en particular también por Maniatis *et al.* (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). A este respecto pueden suprimirse, añadirse o intercambiarse codones. Las variantes pueden ser en particular también aquellas proteínas o polipéptidos que están estabilizados para evitar la degradación fisiológica, por ejemplo mediante estabilización de la estructura principal proteica mediante sustitución de la unión de tipo amida, por ejemplo también mediante la utilización de  $\beta$ -aminoácidos.

Igualmente pueden producirse variantes introduciendo modificaciones en los ácidos nucleicos que codifican para las variantes, tales como por ejemplo inserciones, deleciones y/o sustituciones de uno o varios nucleótidos. En el estado de la técnica se conocen numerosos procedimientos para tales modificaciones de secuencias de ácido nucleico. Una de las técnicas más utilizadas es la mutagénesis de sitio específico dirigida a oligonucleótidos (véase Comack B., Current Protocols in Molecular Biology, 8.01- 8.5.9, Ausubel F. *et al.*, Ed. 1991). En esta técnica se sintetiza un oligonucleótido, cuya secuencia presenta una determinada mutación. Este oligonucleótido se hibrida entonces con un molde que contiene la secuencia de ácido nucleico de tipo natural. Preferentemente, en esta técnica se utiliza un molde de una sola hebra. Tras la hibridación del oligonucleótido y el molde se utiliza una ADN polimerasa dependiente de ADN, para sintetizar la segunda hebra del oligonucleótido, que es complementaria a la hebra de ADN del molde. Como resultado se obtiene una molécula heterodúplex, que contiene un apareamiento erróneo que se genera por la mutación mencionada anteriormente en el oligonucleótido. La secuencia de oligonucleótidos se introduce en un plásmido adecuado, éste se introduce en una célula huésped y en esta célula huésped se replica el ADN del oligonucleótido. Con esta técnica se obtienen secuencias de ácido nucleico con modificaciones

(mutaciones) dirigidas que pueden utilizarse para la producción de variantes según de la invención.

Los componentes A comprendidos en el polipéptido pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un polipéptido puede contener 4, 5, 6 o más componentes A, que forman un tetrámero, pentámero, hexámero, etc. Igualmente, de manera especialmente preferible un polipéptido contiene un múltiplo entero de un trímero, tal como se ha descrito anteriormente, de los componentes A, por ejemplo dos, tres, cuatro o más trímeros dispuestos uno detrás de otro. Los componentes A contenidos en los polipéptidos pueden estar separados entre sí mediante ligantes (véase más adelante). Si a este respecto, tal como se describió anteriormente, están dispuestos dos, tres, cuatro o más trímeros de los componentes A uno detrás de otro, entonces los ligantes que unen entre sí los diferentes trímeros pueden ser eventualmente más largos que los ligantes que unen entre sí los componentes A en un único trímero.

Los componentes A pueden proceder del mismo o de diferentes organismos. A este respecto puede tratarse de vertebrados, en particular de mamíferos, por ejemplo ratón, rata, cerdo y sobre todo ser humano.

Según la invención, en el caso de los componentes A del polipéptido se trata en cada caso de un monómero o un fragmento funcional o una variante funcional de TNF (factor de necrosis tumoral; GenBank n.º de registro NM\_000594).

En una forma de realización especialmente preferida, en el caso del componente A del polipéptido tal como se definió anteriormente se trata de un monómero de TNF que es resistente frente a la enzima de procesamiento TACE. TACE es un miembro de la familia de proteasas ADAM y representa la enzima de procesamiento específica de TNF fisiológica del TNF que se encuentra de manera natural en la membrana celular. El TNF se escinde habitualmente de la membrana celular y se libera al entorno. A un componente A según la invención, resistente frente a TACE, le falta preferentemente el sitio de escisión Ala-Val (por ejemplo AS 76-77 en scTNF según la nomenclatura SWISSPROT para TNF humano, n.º PO1375). El sitio de escisión puede eliminarse a este respecto según la invención mediante la delección de uno o ambos aminoácidos relevantes Ala o Val. Alternativa o adicionalmente, según la invención la secuencia de reconocimiento para TACE (por ejemplo AS 77-88 en scTNF según la nomenclatura SWISSPROT para TNF humano, n.º PO1375) puede deleccionarse total o parcialmente. Esto tiene lugar preferentemente mediante la delección de dos, tres, cuatro o más aminoácidos, por ejemplo de todos los aminoácidos de la secuencia de reconocimiento de TACE. Para scTNF la secuencia resistente frente a TACE se encuentra por ejemplo en la región de los aminoácidos 89-233 (AS 89-233) del scTNF según la nomenclatura SWISSPROT para TNF humano, n.º PO1375. Una delección de este tipo en el componente A impide una posible escisión del componente A, por ejemplo scTNF, mediante TACE cerca de los sitios de enlace de los componentes A en la región de los ligantes (componente B, véase más adelante), y aumenta por consiguiente la estabilidad *in vivo* de los polipéptidos. Eventualmente el acortamiento de la secuencia generado por la delección puede compensarse mediante un alargamiento correspondiente de los ligantes. La delección de la secuencia del componente A descrita a modo de ejemplo para scTNF puede aplicarse en cada uno de los componentes A mencionados anteriormente. Si la secuencia TACE no se elimina o sólo se elimina parcialmente, entonces se presta preferentemente atención a que en caso de utilizar componentes B o C adicionales (véase más adelante) en el polipéptido según la invención no se restablezca la secuencia de reconocimiento de TACE y el sitio de escisión de TACE.

En una forma realización especialmente preferida adicional, los componentes A del polipéptido de la invención tal como se definieron anteriormente están modificados de tal manera que los polipéptidos según la invención puedan acoplarse covalentemente a superficies. Este acoplamiento tiene lugar preferentemente a superficies planas o a partículas esféricas, tal como por ejemplo en partículas magnéticas (perlas magnéticas) o a nanopartículas/micropartículas, preferentemente como reactivo terapéutico, mimético para la célula, con propiedades similares al TNF unido a la membrana. Para el acoplamiento se introduce un grupo de acoplamiento, preferentemente el grupo SH de un resto cisteína, en la región N-terminal de por lo menos un componente A de un polipéptido. (Grupos de acoplamiento preferidos según la invención adicionales se describen más adelante). Esto puede tener lugar de manera especialmente preferible mediante la introducción de un resto cisteína en forma de una adición y/o sustitución en la posición deseada. El grupo de acoplamiento puede encontrarse en cualquier posición de la región N-terminal del componente A, preferentemente cerca del extremo N-terminal. De manera especialmente preferible el grupo de acoplamiento se encuentra en una región de los primeros 1-15, y aún más preferentemente en una región de los primeros 1-10 aminoácidos N-terminales. Por ejemplo, la modificación puede introducirse en un scTNF expresado en procariotas tras una metionina inicial (posición 2) de la secuencia de aminoácidos o en un scTNF expresado en eucariotas directamente tras la secuencia líder escindida, que representan por tanto los aminoácidos N-terminales del componente A. Alternativamente, en el caso de una etiqueta utilizada según la invención, por ejemplo una etiqueta de His, una etiqueta Flag (véase por ejemplo la figura 18) puede introducirse según la invención un grupo de acoplamiento, dando como resultado por ejemplo una etiqueta de CysHis con una cisteína en la posición de aminoácido 9. Una alternativa adicional incluye la introducción de un grupo de acoplamiento en uno o ambos componentes B (ligantes) del polipéptido.

Preferentemente, en un polipéptido sólo el componente A situado en el extremo N-terminal o la etiqueta situada más en el extremo N-terminal se dota de/modifica con un grupo de acoplamiento tal como se describió anteriormente. En una forma de realización adicional, en caso de un polipéptido, que contiene 3 componentes A, se modifican por ejemplo 2 o 3 de los componentes A con en cada caso un grupo de control, de modo que toda la molécula (el

polipéptido según la invención) puede acoplarse a través de dos o 3 uniones covalentes a una matriz adecuada para ello. El acoplamiento del polipéptido a través de uno o varios grupos de acoplamiento de todos los componentes A de un polipéptido preferentemente no perjudica a la función de los componentes A individuales del TNF, sino que posibilita más bien una mejora de la inmovilización del scTNF en superficies y/o partículas. Tal como se expuso anteriormente, cada uno de los polipéptidos según la invención contiene preferentemente las subunidades necesarias para la función biológica (componentes A) en una disposición funcionalmente relevante. Mediante el acoplamiento de un polipéptido a una superficie/una partícula, según la invención es posible producir superficies o partículas con, por ejemplo, homo o heterotrímeros u homo o heteromultímeros de TNF acoplados. Sobre estas superficies/partículas, los homo o heterotrímeros u homo o heteromultímeros de TNF acoplados están inmovilizados de manera estable y bioactiva. Mediante el principio de la cadena sencilla, el estado trimérico funcionalmente relevante de los componentes A se estabiliza mediante los componentes B, con lo que se garantiza que, tras un acoplamiento covalente a una superficie/las partículas, se excluya una disociación de los componentes A individuales y con ello se impida la pérdida de la bioactividad.

Una propiedad preferida de tales polipéptidos acoplados a superficies o partículas es su actividad biomimética, que corresponde a la de los ligandos de membrana naturales de la familia de TNF. Por ejemplo, un scTNF inmovilizado consigue una elevada afinidad por TNFR2 y con ello una elevada capacidad de señalización.

Los polipéptidos que contienen componentes A modificados con un grupo de acoplamiento, tal como se describieron anteriormente, y se acoplan/están acoplados a una superficie y/o partícula, pueden utilizarse según la invención para la detección así como para la manipulación, depleción y/o eliminación de parejas de unión de TNF así como de uniones asociadas con ellos. A este respecto son de interés prioritario los procedimientos para la manipulación, depleción y/o eliminación extracorporeal de componentes contenidos en líquidos corporales, por ejemplo por medio de aféresis.

Las realizaciones siguientes con respecto a los objetos de la invención se refieren al miembro de la familia de ligados de TNF, TNF.

Los polipéptidos de la presente invención comprenden, además de los componentes A descritos, por lo menos dos componentes B, presentando el componente B la propiedad de un ligante peptídico. Como ligante peptídico en el sentido de la invención es concebible cualquier secuencia peptídica que pueda expresarse en un sistema biológico. Los ligantes peptídicos se representan en el caso de los constructos polipeptídicos por ejemplo como una unión flexible, pero que preferentemente no influye negativamente en las propiedades de trimerización intrínsecas del TNF. Preferentemente se seleccionan ligantes con propiedades tales, en particular flexibilidad y longitud, que puedan estabilizar los homotrímeros formados espontáneamente del respectivo ligando (derivado).

En una forma de realización preferida de la invención, en el caso del componente B se trata por tanto de ligantes peptídicos compuestos de 2 a 30, preferentemente entre 4 y 16 y de manera especialmente preferible entre 4 y 12 aminoácidos, que contienen preferentemente estructuras de glicina-serina repetitivas, muy preferentemente módulos Gly-Gly-Gly-Ser (módulos GGGs) en una disposición repetitiva.

Preferentemente en el caso de los ligantes peptídicos de la invención se trata por tanto de ligantes peptídicos ricos en glicina (G), es decir que la secuencia de aminoácidos de un ligante peptídico presenta un elevado porcentaje de glicina, preferentemente de desde el 60 hasta el 80%, de manera especialmente preferible del 75%.

En formas de realización especialmente preferidas de la invención, el ligante peptídico (componente B) comprende la secuencia de aminoácidos GGGSGGGSGGGs, también denominada (GGGS), o  $L_{corta}$ , o la secuencia de aminoácidos GGGSGGGSGGGSGGGs, también denominada (GGGS)<sub>4</sub> o  $L_{larga}$ . Los ligantes peptídicos se denominan según la invención entre otros L1 y L2, de modo que también resultan denominaciones tales como  $L1_{corta}$ ,  $L2_{corta}$ ,  $L1_{larga}$  y/o  $L2_{larga}$ . Es posible la utilización de dos ligantes diferentes para la estabilización de una molécula trimérica.

Preferentemente los ligantes peptídicos según la invención, es decir los componentes B, enlazan en cada caso dos de dichos por lo menos tres componentes A entre sí. Este enlace tiene lugar covalentemente a través del extremo C-terminal de un componente A y el extremo N-terminal de un componente A adicional. El polipéptido representa una molécula monocatenaria (también denominada molécula de cadena sencilla o sc). Esto significa que todos los componentes A y componentes B que comprende el polipéptido se encuentran en una única hebra de polipéptido o de proteína.

En una forma de realización preferida de la invención, los componentes A y los componentes B forman una estructura proteica trimérica. Preferentemente en este caso se trata de una estructura proteica homotrimérica, aunque la invención también comprende estructuras proteicas heterotriméricas.

La formación de esta estructura proteica trimérica se provoca preferentemente por el componente B y/o se potencia por el mismo. Dado que el componente B que conduce a la trimerización o el componente B que potencia una trimerización del polipéptido no debería formar esencialmente ningún agregado superior, el componente B normalmente no debería presentar ningún resto cisteína, que puede formar un puente disulfuro intermolecular.

Preferentemente el componente B en un polipéptido por tanto no presentará ningún resto cisteína o sólo aquellos restos cisteína que un puente disulfuro intramolecular, es decir en el propio polipéptido, para evitar que en condiciones oxidantes pueda aparecer un enlace covalente con dicho por lo menos un resto cisteína de una proteína de fusión de otro trímero.

5 Las secuencias de polipéptidos nativos o fragmentos de estos polipéptidos nativos, que se utilizan como ligantes peptídicos según la invención, pueden encontrarse también en forma de variantes funcionales biológicamente activas de los mismos en el sentido de esta invención y según la definición anterior.

10 En el caso de los componentes B según la invención puede tratarse de secuencias peptídicas idénticas o diferentes que se producen de manera natural. Pueden proceder del mismo o de diferentes organismos. En el caso de los organismos puede tratarse de vertebrados, en particular de mamíferos, por ejemplo de ratón, rata, cerdo y sobre todo de ser humano.

15 El polipéptido puede presentar además de los componentes A y B tramos de secuencia adicionales. Se prefieren en este contexto las denominadas secuencias de etiqueta, por ejemplo por lo menos una etiqueta Flag, es decir la sucesión de aminoácidos DYKDDDDK, y/o por ejemplo por lo menos una etiqueta de His (que contiene varias histidinas consecutivas, por ejemplo por lo menos 5) y/o secuencias de etiqueta o antigénicas adicionales. Un tramo de secuencia adicional especialmente preferido es una secuencia peptídica líder. Preferentemente esta secuencia peptídica líder representa una señal para la secreción del polipéptido o proteína en células eucariotas. Esta secuencia peptídica líder está dispuesta preferentemente de manera N-terminal.

25 En una forma de realización adicional de la invención, un polipéptido comprende un componente C adicional, estando éste caracterizado por una interacción específica con una molécula de la superficie celular complementaria ("antígeno"). El principio de acción de los constructos polipeptídicos es acertado en particular para todos aquellos miembros de la familia de ligandos de TNF que son eficaces para determinados receptores exclusivamente o en un grado especialmente bueno como molécula de membrana. A éstos pertenecen, además de TRAIL (TNFSF10), FasL (TNFSF6) y TNF (TNFSF2), por ejemplo también los inmunomoduladores CD40L (TNFSF5) y CD30L (TNFSF8). El componente C presenta por tanto una función de "selección como diana". Por consiguiente el componente C es un fragmento de anticuerpo, preferentemente un fragmento de anticuerpo monocatenario, un denominado scfv, o un derivado de anticuerpo que reconoce una molécula diana específica en una superficie celular. En una forma de realización adicional, el componente C es una proteína o péptido no perteneciente a los anticuerpos, pero que de manera análoga a una interacción anticuerpo-antígeno o una interacción receptor-ligando reconoce igualmente de manera selectiva una molécula diana específica sobre una superficie celular. En una forma de realización especialmente preferida, la presente invención comprende un polipéptido tal como se describió anteriormente como componente A, por lo menos un scTNF, así como como componente C un fragmento de anticuerpo tal como se describió anteriormente, por ejemplo scFv. De este modo se generan polipéptidos más pequeños con en cada caso un "dominio de selección como diana". Tales polipéptidos más pequeños son ventajosamente menos propensos a, por ejemplo, una agregación.

40 Preferentemente en el caso del componente C se trata de un fragmento de anticuerpo que se une a antígeno o un derivado de anticuerpo que se une a antígeno de un mamífero, en particular de origen murino o humano, o se trata de un fragmento de anticuerpo humanizado o un derivado de anticuerpo humanizado, por ejemplo de origen mamífero. En el caso de la derivatización y/o humanización, el componente C se compone normalmente de un derivado murino de Fv de cadena sencilla producido según el estado de la técnica, un componente C humanizado mediante injerto de CDR o se trata de un componente C de origen completamente humano que se transforma de manera correspondiente en un derivado de scFv.

50 En una forma de realización preferida adicional, en el caso del componente C se trata de un ligando proteico o peptídico, que como monómero forma una unión específica a un receptor de membrana.

55 En una forma de realización preferida adicional, en el caso del componente C se trata de una proteína o péptido con especificidad para moléculas de la superficie celular, que es en particular un receptor de citocinas, un receptor de factor de crecimiento, una integrina o molécula de adhesión celular. De manera especialmente preferible se trata de un receptor de citocinas, que se selecciona del grupo de la familia de genes de TNFR.

60 El componente C de un polipéptido presenta preferentemente especificidad para un antígeno expresado de manera selectiva o dominante en el tejido tumoral. Un antígeno tumoral de este tipo puede expresarse en general en las propias células malignas o también en la parte no maligna del tumor, las células estromales o el endotelio tumoral. Los antígenos de este tipo de partes de tejido no malignas de un tumor sólido (carcinoma) son por un lado genéticamente invariables, por otro lado aparecen en las más diversas entidades tumorales y por tanto son marcadores tumorales universales. Ejemplos de tales ligandos para la asociación tumoral, contra los que puede estar dirigido un componente C del polipéptido, son el VEGFR o el complejo VEGFR/VEGF así como la integrina  $\alpha_v\beta_3$  y la isoforma de fibronectina  $\beta$  Fn como estructuras diana ampliamente selectivas del endotelio tumoral y la proteína de activación de fibroblastos (como marcador selectivo del estroma tumoral). Todos los ejemplos mencionados anteriormente pueden detectarse eficazmente con scFv específico, por lo que los scFv de este tipo

("Fv de cadena sencilla") son especialmente adecuados como componente C de un polipéptido. También se tiene en cuenta galectina a este respecto como marcador tumoral, contra el que está dirigido el componente C.

5 Por consiguiente, se prefieren especialmente fragmentos de anticuerpo en diferentes formatos de anticuerpo, por ejemplo scFv, en particular scFv40, como componente C.

10 En otra forma de realización de la presente invención, el polipéptido reconoce a través de su componente C como molécula diana específica un receptor de membrana celular de un miembro de la familia de ligandos de TNF, preferentemente diferente del miembro de la familia de ligandos de TNF del componente A. Ejemplos, que no representan una enumeración concluyente, de tales ligandos posibles son TNFSF1 (LTalfa), TNFSF2 (TNF), TNFSF3 (LTbeta), TNFSF4 (OX40L), TNFSF5 (CD40L), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (CD27L), TNFSF8 (CD30L), TNFSF9 (4-1BBL), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF12 (TWEAKL), TNFSF13 (APRIL), TNFSF143B (BLYS), TNFSF14 (LIGHT), TNFSF15 (VEGI), TNFSF16 (CD30L) y TNFSF18 (AITRL), así como EDA, los cuales o sus fragmentos funcionales o variantes funcionales de la secuencia nativa o de los fragmentos también pueden servir como componente A en un constructo polipeptídico. En particular se dan a conocer conjuntamente a este respecto todas las proteínas de tipo II de membrana (extremo C-terminal extracelular), sus fragmentos funcionales o variantes funcionales, que requieren una organización trimérica de sus subunidades como condición para la bioactividad.

15 Se describe en Maniatis *et al.* (2001) *supra*.

20 Los procedimientos para la producción de un polipéptido que va a utilizarse según la invención comprenden normalmente las siguientes etapas (a) cultivar una célula huésped en condiciones adecuadas, (b) expresar un constructo de ácido nucleico correspondiente en condiciones adecuadas, y (c) aislar el polipéptido de las células huésped y/o del sobrenadante del cultivo.

25 Cultivar una célula huésped significa posibilitar que la célula huésped crezca en un medio de cultivo adecuado, a un pH adecuado y temperaturas adecuadas. Tales condiciones de crecimiento dependen de las células huésped utilizadas en cada caso y el experto en la materia las conoce ampliamente. Indicaciones para el cultivo de células se encuentran también en Maniatis *et al.* (2001), citado anteriormente.

30 La expresión del polipéptido puede tener lugar a este respecto normalmente según el estado de la técnica en sistemas de expresión adecuados, preferentemente como producto secretado de transfectantes estables, por ejemplo células CHO u otras células animales, tales como Cos7 o SF9 (células de insecto), o sistemas celulares eucariotas adicionales, por ejemplo *Pichia pastoris*. Preferentemente, los polipéptidos expresados presentan respectivas secuencias líder adecuadas para la secreción en el sistema celular. Por tanto, los vectores utilizados para la expresión contendrán también tramos codificantes, que codifican para una secuencia líder funcional, por ejemplo tal como se describe en Brocks *et al* (Immunotechnology 3: 173-184, 1997) para células de insecto y mamíferos o utilizando por ejemplo vectores pPIC-Zalfa (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) para la expresión y secreción en la levadura *Pichia pastoris*.

35 El aislamiento del polipéptido a partir de la célula huésped puede tener lugar mediante procedimientos convencionales, tales como procedimientos cromatográficos, procedimientos de precipitación, etc., que son adecuados para la purificación de polipéptidos y proteínas (véase también Maniatis *et al* (2001), citado anteriormente).

40 Son objeto de la presente invención procedimientos para la manipulación, depleción y/o eliminación extracorporal (*ex vivo*) de componentes contenidos en los líquidos corporales, como por ejemplo parejas de unión de un componente A tal como se definió anteriormente o células que se unen a los mismos o asociadas con los mismos. Tales procedimientos extracorporales comprenden preferentemente procedimientos tales como por ejemplo aféresis, en particular las formas básicas de la aféresis, de plasmaféresis y la citaféresis.

45 La plasmaféresis incluye según la invención la manipulación, depleción y/o eliminación extracorporal de determinados componentes solubles o suspendidos en la parte de plasma de la sangre, así como la recirculación de la sangre así tratada al paciente. Para ello se extrae sangre periférica a un paciente preferentemente por medio de una máquina de aféresis, se añaden a la sangre medios que inhiben la coagulación y se separa la sangre en sus componentes principales, partes sólidas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas sanguíneas) y líquidas (plasma). Tras la separación en estos componentes principales, los componentes de la sangre solubles o suspendidos contenidos en la fracción de plasma así obtenida pueden manipularse, agotarse y/o eliminarse en una etapa de procedimiento adicional, por ejemplo utilizando polipéptidos descritos según la invención. A continuación, el plasma sanguíneo así tratado puede combinarse con los componentes sanguíneos sólidos separados anteriormente y reinyectarse al paciente. La pérdida de volumen condicionada por la plasmaféresis puede sustituirse en el procedimiento según la invención además por solución salina isotónica. La plasmaféresis se realiza según la invención preferentemente utilizando procedimientos tales como intercambio terapéutico de plasma (TPE), inmuoabsorción (IA), precipitación (HELP), filtración por membrana diferencial y otros medios. A modo de ejemplo se mencionan en este caso columnas de filtración de plasma (véase por ejemplo el documento US 4.619.639, Asahi Medical Company, incorporado en la presente memoria mediante referencia). Igualmente pueden utilizarse sistemas

de filtración por membrana (MDF) utilizando diferentes partículas y superficies, por ejemplo filtros tales como filtros de sangre RheoFilter®AR2000 y PlasmaFlo®OP-05(W)L (fabricados por Asahi Medical Company, Ltd. de Japón). Alternativamente, en los procedimientos de plasmaféresis según la invención pueden utilizarse todas las superficies y partículas adecuadas.

5 En el caso de la citaféresis, según la invención, a diferencia de la plasmaféresis descrita anteriormente, se manipulan, agotan y/o eliminar de manera extracorporal los componentes celulares que circulan en la sangre y/o unidos a la médula ósea (glóbulos rojos, glóbulos blancos, células madre o trombocitos) o subpoblaciones específicas de estas células, para conseguir un efecto clínico. También en este caso se extrae preferentemente  
10 sangre periférica a un paciente por medio de una máquina de aféresis. Después se le añaden a la sangre opcionalmente medios que inhiben la coagulación y se separa la sangre en sus componentes principales. A continuación, en la fracción de la sangre que contiene los componentes celulares, pueden manipularse, agotarse y/o eliminarse estos componentes celulares en una etapa de procedimiento adicional, preferentemente también  
15 utilizando polipéptidos descritos según la invención. La fracción así obtenida puede reinyectarse finalmente de nuevo al paciente. Preferentemente, en el caso de la citaféresis según la invención, la separación de la sangre en diferentes fracciones así como eventualmente la separación de determinados componentes celulares de la sangre se produce por medio de procedimientos tales como centrifugación, filtración por membrana diferencial u otros  
20 medios. Pueden utilizarse además sistemas de filtración por membrana (MDF) utilizando diferentes partículas y superficies, por ejemplo filtros tales como filtros de sangre RheoFilter®AR2000 y PlasmaFlo®OP-05(W)L (fabricados por Asahi Medical Company, Ltd. de Japón).

En una tercera alternativa según la invención, los procedimientos de plasmaféresis y citaféresis descritos anteriormente pueden combinarse entre sí, por ejemplo para manipular, agotar y/o eliminar tanto componentes solubles o suspendidos en la parte de plasma de la sangre como componentes celulares que circulan en la sangre  
25 y/o unidos a la médula ósea (glóbulos rojos, glóbulos blancos, células madre o trombocitos) o subpoblaciones específicas de estas células, para conseguir un efecto clínico. Una combinación de este tipo de plasmaféresis y citaféresis se produce utilizando los polipéptidos descritos.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento (de aféresis) según la reivindicación 1.

En una forma de realización especial del procedimiento de aféresis según la invención, antes de la separación de la sangre que eventualmente tiene lugar, puede realizarse opcionalmente una extracción de sangre en un paciente. Además opcionalmente la sangre tratada con el procedimiento según la invención o la fracción sanguínea así tratada  
35 sanguíneas separadas anteriormente y eventualmente tratadas de diferente manera con otros componentes sólidos y/o líquidos no tratados de la sangre. Las pérdidas de volumen generadas mediante el procedimiento según la invención pueden compensarse mediante la adición de líquidos adecuados, por ejemplo mediante la adición de una solución salina isotónica.

40 La etapa incluida en el procedimiento de aféresis según la invención para la unión de los componentes solubles, suspendidos o celulares de la sangre a una superficie o partícula acoplada con un polipéptido según la invención puede realizarse según sea necesario una vez o varias veces, para conseguir una selectividad deseada.

45 En el procedimiento de aféresis según la invención se utilizan aquellas superficies y/o partículas que se acoplaron covalentemente con un polipéptido según la invención, tal como se definió anteriormente. Para ello preferentemente el polipéptido se acopla covalentemente, a través del(de los) grupo(s) de acoplamiento A contenido(s) en el polipéptido, a la superficie y/o las partículas.

50 Un acoplamiento de los polipéptidos utilizados según la invención a través de los componentes A individuales tiene lugar preferentemente tal como se describe en el documento DE 101 44 252 A1. El acoplamiento de los polipéptidos utilizados según la invención tiene lugar preferentemente a este respecto a una superficie o partículas (vehículos) a través de una unión entre primeros grupos funcionales presentes en la superficie de los vehículos y en el polipéptido a través de los grupos de acoplamiento contenidos en componentes A. Estos grupos de acoplamiento son preferentemente complementarios a los grupos funcionales del vehículo y pueden formar con éstos una unión afín,  
55 preferentemente covalente. Preferentemente el grupo funcional del componente A está situado dentro del componente A de tal manera que está dispuesto fuera de los dominios del polipéptido responsables de la bioactividad a una distancia adecuada. De esta manera es posible, según la invención, inmovilizar TNF, de manera dirigida y manteniendo sus actividades biológicas, en el vehículo. Tras la inmovilización, el polipéptido está fijado preferentemente sobre la superficie del vehículo de tal manera que la estructura tridimensional del(de los) dominio(s)  
60 necesarios para la bioactividad no está modificada con respecto al polipéptido no inmovilizado, y de tal manera que el(los) dominio(s) en caso de contacto con parejas de reacción celulares está(n) accesibles libremente para las mismas. En una forma de realización preferida de la invención, el grupo funcional de la superficie del vehículo se selecciona del grupo compuesto por grupo amino, grupo carboxilo, grupo epoxi, grupo maleinimido, grupo alquilcetona, grupo aldehído, grupo hidrazina, grupo hidrazida, grupo tiol y grupo tioéster.

65 Según la invención los grupos de acoplamiento de los componentes A del polipéptido que deben inmovilizarse se

seleccionan de un grupo que contiene las mismas especies que para el grupo funcional de la superficie del vehículo. Una superficie/partícula (= vehículo) que puede utilizarse en el procedimiento de aféresis según la invención presenta por tanto en su superficie un grupo funcional que está enlazado covalentemente con un grupo de acoplamiento del polipéptido que debe inmovilizarse, siendo el grupo de acoplamiento del polipéptido un grupo distinto a la proteína funcional del vehículo. Los dos grupos funcionales y grupos de acoplamiento que se unen entre sí deben ser a este respecto complementarios entre sí, es decir deben poder formar una unión covalente entre sí. Si según la invención se utiliza como grupo funcional del vehículo por ejemplo un grupo amino, entonces el grupo de acoplamiento del componente A del polipéptido según la invención es un grupo carboxilo. Si, a la inversa, según la invención se utiliza un grupo carboxilo como grupo funcional del vehículo, entonces según la invención el grupo de acoplamiento del componente A del polipéptido es un grupo amino. Si según la invención se selecciona como grupo funcional del vehículo un grupo tiol, entonces según la invención el grupo de acoplamiento complementario del componente A del polipéptido es un grupo maleinimido. Si, a la inversa, se selecciona un grupo maleinimido como grupo funcional del vehículo, entonces según la invención el grupo de acoplamiento complementario del componente A del polipéptido es un grupo tiol. Si según la invención se utiliza como grupo funcional del vehículo un grupo alquilcetona, en particular un grupo metilcetona o aldehído, entonces el grupo de acoplamiento complementario funcional del componente A del polipéptido es un grupo hidracina o hidrazida. Si, a la inversa, según la invención se utiliza un grupo hidracina o hidrazida como grupo funcional del vehículo, entonces según la invención el grupo de acoplamiento complementario funcional del componente A del polipéptido es un grupo alquilcetona, en particular metilcetona o aldehído. Según la invención, de manera especialmente preferible en el caso del grupo funcional en la superficie del vehículo se trata de un grupo maleinimido y en el caso del grupo de acoplamiento del componente A del polipéptido, de un grupo tiol.

La inmovilización tiene lugar a este respecto preferentemente de manera dirigida. En relación con la presente invención, el término "inmovilizado de manera dirigida" o "inmovilización dirigida" significa que un scTNF está inmovilizado en un vehículo en posiciones definidas dentro del scTNF de tal manera que la estructura tridimensional del(de los) dominio(s) necesario(s) para la bioactividad no está modificada con respecto al estado no inmovilizado y de tal manera que este(estos) dominio(s) de TNF, por ejemplo cavidades de unión para parejas de reacción celulares, en caso de contacto con parejas de reacción celulares está(n) accesible(s) libremente para las mismas. "Inmovilizado de manera dirigida" significa también que el acoplamiento del polipéptido sobre la superficie del vehículo tiene lugar de tal manera que la proteína inmovilizada, en caso de una utilización posterior en un entorno celular o similar a una célula, no puede degradarse o sólo muy lentamente mediante enzimas degradadores de proteínas. Es decir, la molécula de TNF inmovilizada está orientada sobre la superficie del vehículo de tal manera que ofrece el menor número posible de puntos de ataque para proteasas. Adicionalmente, el polipéptido puede hacerse resistente frente a proteasas antes del acoplamiento mediante procedimientos de biología molecular, tal como se describió por ejemplo anteriormente para miembros de TNF en el caso de la proteasa TACE.

El polipéptido conserva por medio de su(s) componente(s) A acoplado(s) su función biológica y la capacidad para crear una interacción con otros compuestos/sustancias. Si un polipéptido contiene por ejemplo tres componentes A (trímero), entonces normalmente todos, dos o preferentemente sólo uno de los tres componentes A se unen covalentemente a la superficie/a la partícula.

Las superficies y/o partículas adecuadas para el acoplamiento pueden comprender todas las superficies y/o partículas adecuadas, a las que pueden acoplarse los polipéptidos. Se prefieren en particular placas de cultivo o las denominadas microperlas, por ejemplo Dynabeads (Dynal Biotech GMBH), nanopérlas, nanopartículas o fases sólidas tales como por ejemplo lana de nailon, Sepharose, Sephadex, etc. Según la invención está previsto además que en el caso de los sistemas de vehículo utilizados según la invención se trate de nanopartículas compactas o huecas con tamaños de entre 25 y 1000 nm. Éstas están compuestas por materiales particulados o bien orgánicos o bien inorgánicos. El tipo del material puede variarse según la invención conforme a la aplicación posterior, estando compuesto del vehículo de las nanopartículas preferentemente por materiales biológicamente compatibles y/o biodegradables. En relación con la presente invención, por "nanopartículas" se entienden además matrices de unión, que comprenden un vehículo con una superficie en la que están dispuestos grupos funcionales químicamente reactivos, que forman con grupos funcionales complementarios de moléculas que van a unirse, en particular polipéptidos, uniones afines, es decir uniones covalentes y/o no covalentes y de esta manera pueden fijar los polipéptidos a sus superficies de manera estable. Los vehículos de las nanopartículas están compuestos por materiales inorgánicos u orgánicos químicamente inertes y presentan un tamaño de menos de 1  $\mu\text{m}$ , preferentemente de desde 25 hasta 500 nm.

Una forma de realización especial del procedimiento de aféresis según la invención incluye una superficie biofuncionalizada (plana o como partículas) con el polipéptido scTNF, que se inmovilizó de la manera descrita anteriormente covalentemente y de manera dirigida sobre la superficie. Una superficie biofuncionalizada de este tipo, que incluye por ejemplo varias moléculas de scTNF inmovilizadas o variantes de las mismas, posibilita una afinidad elevada por las respectivas parejas de unión complementarias, por ejemplo TNFR1 y TNFR2. Los receptores TNFR1 y en particular TNFR2 se encuentran en concentraciones muy elevadas como moléculas procesadas, solubles, en la sangre de pacientes con tumor y en el caso de otras enfermedades. La eliminación de TNFR de la sangre de pacientes con tumor conduce, como puede comprobarse, a regresiones tumorales documentadas clínicamente, lo que se atribuye a la reconstitución de la defensa propia del cuerpo (véase por ejemplo Lentz M R, (1999)

Therapeutics Apheresis, vol. 3, n.º 1). Un procedimiento de aféresis con scTNF posibilita que preferentemente ambos receptores de TNF puedan eliminarse al mismo tiempo y de manera eficaz de las muestras. Una ventaja adicional de este procedimiento es el hecho, descrito anteriormente, de que no es posible una disociación de componentes A individuales del polipéptido, es decir no se espera ni una pérdida de actividad de la superficie funcionalizada ni una contaminación de la sangre tratada con sustancias disociadas.

El procedimiento de aféresis según la invención puede realizarse como procedimiento continuo o como procedimiento discontinuo. Como procedimiento continuo, el procedimiento según la invención se realiza de manera preferible directamente a continuación de la extracción de sangre o el fraccionamiento de la sangre extraída y antes de la recirculación de la sangre al paciente sin un almacenamiento intermedio de la sangre o de las fracciones sanguíneas obtenidas. Por el contrario, en un procedimiento discontinuo la sangre extraída o las fracciones de la sangre extraída pueden almacenarse tras cada etapa durante un determinado periodo de tiempo.

La temperatura en procedimientos de aféresis según la invención se encuentra preferentemente a 0-40°C. En el caso de un procedimiento continuo, la temperatura se encuentra preferentemente a de 25 a 40°C, de manera especialmente preferible en un intervalo de entre 36 y 38°C. En el caso de un procedimiento discontinuo, la temperatura puede encontrarse entre 0-40°C.

El procedimiento de aféresis según la invención tal como se describió anteriormente se utiliza preferentemente para el diagnóstico, la terapia y/o la profilaxis en enfermedades asociadas con TNF, en particular en enfermedades tumorales, en particular tumores sólidos o linfáticos, en particular tumores sólidos y linfáticos. El restablecimiento de la homeostasis del sistema inmunitario con sus componentes humorales y celulares se considera clave para la eficacia de los procedimientos de aféresis. Por tanto, en una aplicación adicional, el sistema de aféresis según la invención también puede utilizarse para el restablecimiento de la homeostasis inmunitaria en el caso de enfermedades no malignas. A éstas pertenecen las enfermedades inflamatorias, enfermedades artríticas y reumáticas o enfermedades del sistema inmunitario, así como para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, estados inflamatorios, enfermedades hiperproliferativas, enfermedades autoinmunitarias, en particular enfermedades reumatoides/artríticas, necrólisis epidérmica tóxica (TEN), esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, GvHD, hepatitis viral (VHB, VHC), hepatitis inducida por alcohol, reacciones de rechazo en trasplante de hígado, enfermedades que se basan en reacciones hiperapoptóticas, enfermedades degenerativas, en particular enfermedades neurodegenerativas.

En el caso de las enfermedades tumorales están comprendidas en particular carcinomas de colon, melanomas, carcinomas renales, linfomas, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), tumores gastrointestinales, carcinomas pulmonares, gliomas, tumores de la tiroides, carcinomas de mama, tumores de próstata, hepatomas, diversos tumores inducidos por virus tales como por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo carcinoma de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus del herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por VEB), tumores inducidos por hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por VLTH-1 y VLTH-2, neurinoma acústico, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, linfomas, carcinoma de recto, astrocitoma, tumores cerebrales, cáncer de estómago, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer de vagina, cáncer de páncreas, cáncer de testículos, melanoma, carcinoma de tiroides, cáncer de vejiga, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberg, carcinoma de bronquios, tumor de la hipófisis, micosis fungoide, cáncer de esófago, cáncer de mama, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer renal, timoma, carcinoma endometrial, cáncer de huesos, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome de CUP, tumores de cabeza y cuello, oligodendroglioma, cáncer de vulva, cáncer de intestino, carcinoma de colon, carcinoma de esófago, participación en verrugas, tumores del intestino delgado, craneofaringeomas, carcinoma ovárico, tumores de partes blandas, cáncer de las trompas de falopio, cáncer de hígado, carcinoma de páncreas, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de endometrio, metástasis de hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de la vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, cáncer de útero, tumor de párpado, cáncer de próstata, etc.

Las enfermedades artríticas comprenden en particular monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis aguda (sobre todo artritis reactiva, inducida por cristales, séptica y sarcoidosis aguda), artritis subaguda, artritis crónica (sobre todo artritis reumatoide, artritis en el caso de espondiloartritis seronegativa), artritis infecciosa, artritis para- o posinfecciosa, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis en el caso de enfermedades del tejido conjuntivo inflamatorias y vasculitis, artritis alérgica, artritis en relación con enfermedades metabólicas y alteraciones dependientes de la alimentación, artritis en el caso de trastornos endocrinos, artritis en el caso de enfermedades granulomatosas, artritis en el caso de enfermedades del sistema hematopoyético, artritis en el caso de hemorragias en las articulaciones como consecuencia de alteraciones de la coagulación sanguínea, artritis neoplásica, artritis paraneoplásica, artritis (pos)traumática, artritis en el caso de enfermedades del cartilago articular, artritis en el caso de neuropatías, artritis en el caso de dermatosis pustulosa que forma abscesos, necrotizante o asociada a neutrofilia tisular, artritis en el caso de otras enfermedades primarias extraarticulares, así como artritis alérgica, artritis inducida por clamidia, artritis disintérica, artritis gonorreica, artritis mutilante, artritis psoriásica, artritis seca, artritis sifilítica, artritis tuberculosa, artritis úrica, etc.

En resumen puede establecerse que en la presente memoria se da a conocer un polipéptido que presenta estabilidad aumentada, porque la molécula entera se compone de una hebra de proteína o de polipéptido (scTNF), de modo que los monómeros (componentes A) ya no pueden disociarse. scTNF, cuya bioactividad en la técnica no muestra diferencia cualitativa con el sTNF soluble normal (también TNF de tipo natural o wtTNF), es sin embargo mucho más estable y muestra por tanto mayor bioactividad, es decir es activo a concentraciones más bajas. Igual que TNF soluble normal (wtTNF), scTNF consigue provocar la apoptosis en células sensibles, activar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, activar el receptor TNFR1, pero no el TNFR2, así como, en presencia de determinados anticuerpos (por ejemplo 80M2) también activar el receptor TNFR2. En caso de una utilización de los polipéptidos con un grupo de acoplamiento para la producción de superficies biofuncionalizadas y utilización de los mismos por ejemplo para aféresis, no se observa pérdida del polipéptido o una reducción de ligandos perjudiciales en el sistema. Además, scTNF representa un material de partida ideal para la producción de moléculas bifuncionales nuevas. Por un lado, scTNF, o fragmentos funcionales del mismo, puede unirse covalentemente a superficies celulares. Esto presenta la ventaja de que en este caso sólo debe establecerse un único enlace covalente para la unión estable de la molécula. En el caso de un miembro de tipo natural soluble normal de la familia de ligandos de TNF, por ejemplo sTNF soluble, deben enlazarse covalentemente los tres monómeros del homotrímero individual a la superficie, para obtener una construcción estable, porque de lo contrario los monómeros unidos no covalentemente se disocian. En esta forma de realización es especialmente ventajosa una aplicación en la aféresis con scTNF como principio activo biofuncional para la eliminación de receptores de TNF de los líquidos corporales.

Igualmente es posible mediante la presente invención, debido al enlace covalente de los monómeros (componentes A) del polipéptido, insertar mutaciones de manera dirigida en sólo uno o también dos o más de dichos por lo menos tres monómeros (componentes A) de manera estable. Así, por ejemplo se conocen mutaciones puntuales, que fuerzan una selectividad por receptor, es decir por ejemplo en el caso de TNF se logra una unión sólo a uno de los dos receptores de TNF (TNFR1 y TNFR2). Según la invención por primera vez es posible producir un mutante de por ejemplo TNF, que por ejemplo consigue unir de manera controlada una molécula de TNFR1 y dos moléculas de TNFR2 al mismo tiempo, es decir se originan complejos de receptor heteroméricos. A este respecto por primera vez es posible producir miembros heteroméricos, estables y de cadena sencilla, de la familia de ligandos de TNF, que unen y activan de manera dirigida sólo uno de varios receptores posibles.

La presente invención se explicará en detalle mediante las figuras a continuación:

La figuras 1 a 3 muestran resultados de diferentes pruebas de citotoxicidad biológicas, en las que se estudian y comparan las características, en particular la especificidad, de distintas variantes de scTNF con las de TNF de tipo natural soluble clásico, es decir el dominio extracelular soluble del TNF humano (NCBI gi:25952111, 17,09 kDa como monómero de la forma soluble, abreviado con TNFhum o sTNF, AA 79-181).

Para estos ensayos se utilizaron tanto fibroblastos de ratón transferidos como células Kym1 humanas. Se representan resultados a modo de ejemplo de los análisis, en los que se someten a prueba variantes de scTNF, que presentan ligantes peptídicos de longitudes diferentes entre los módulos de TNF individuales (es decir monómeros de TNF). Los ligantes peptídicos consisten en cada caso en la repetición de secuencia de aminoácidos GGGS triple o cuádruple (o también GlyGlyGly-Ser) (denominada como "TNF3x de cadena sencilla" o "TNF4x de cadena sencilla" o como "scTNF3x" o "scTNF4x").

La figura 1 muestra el resultado de una prueba de citotoxicidad típica de TNF. Como células diana se utilizaron fibroblastos de ratón (MF) de ratones deficientes dobles para TNFR1/TNFR2, que expresan la quimera de receptor TNFR1 (TNFR1-Fas) estable (células TNFR1-Fas de MF). Tales células expresan una molécula híbrida, que extracelularmente consiste en la parte correspondiente del TNFR1, y por consiguiente se une a TNF, e intracelularmente presenta el dominio intracelular de acción apoptótica fuerte del receptor Fas. Estas células TNFR1-Fas de MF pueden activarse mediante estímulos específicos para TNFR1, sin embargo transmiten una señal de muerte específica de Fas. El recuento de células supervivientes se cuantificó tras 24 horas mediante tinción con un colorante mediante su absorción. Como control negativo se utilizó un lisado de bacterias control, que se trató de un lisado de bacterias que no expresa scTNF, que se procesó de manera idéntica a las proteínas de scTNF recombinantes. En los resultados se establece que tanto el TNF soluble humano convencional (TNFhum) como las variantes de scTNF recombinantes conducen a la muerte celular. Puede reconocerse un efecto citotóxico comparable, dependiente de la dosis, de TNFhum o scTNF (véanse las tres curvas inferiores de la gráfica), siendo la actividad específica de scTNF por lo menos equivalente, sino incluso mayor, que la de TNF de tipo natural. Tal como se esperaba, el control negativo no mostró efecto tóxico.

En un enfoque de ensayo adicional se sometió a prueba el efecto de anticuerpos específicos de TNF neutralizados sobre la citotoxicidad de TNF de tipo natural (TNFhum) o scTNF. Se utilizaron diluciones recién preparadas de TNF humano soluble (TNFhum) o de las variantes de scTNF descritas anteriormente con ligantes peptídicos de glicina-serina triples (3x) o cuádruples (3x) (scTNF3x: GGGS-GGGS-GGGS / scTNF4x: GGGS-GGGS-GGGS-GGGS). Se utilizaron series de concentraciones con diluciones 1:3 en presencia y ausencia de anticuerpos específicos para TNF neutralizados ( $\alpha$ TNF-AK) [1 $\mu$ g/ml]. Como control negativo se utilizó el lisado de bacterias control descrito anteriormente. Como resultado se reconoce que el efecto citotóxico de TNF de tipo natural humano soluble o scTNF puede anularse mediante anticuerpos específicos para TNF neutralizados (véanse las tres curvas superiores de la

gráfica) y concretamente en un intervalo de concentración amplio (0,03-10 ng/ml). No se establecieron diferencias entre la reacción de scTNF con ligantes peptídicos triples y scTNF con ligantes peptídicos cuádruples.

5 La figura 2 muestra el resultado de una prueba de citotoxicidad en la que se estudia el efecto de sTNF y variantes de scTNF sobre células que expresan quimeras de receptor TNFR2 (TNFR2-Fas). En este enfoque de ensayo se utilizan fibroblastos de ratón, que expresan quimeras de receptor estables, que consisten en TNFR2 y Fas (TNFR2-Fas, en las que la parte extracelular de TNFR2 procede de la parte intracelular de receptor Fas), (células TNFR2-Fas de MF). Las células TNFR2-Fas de MF (al igual que de TNFR2 de tipo natural) únicamente pueden activarse mediante un estímulo de TNFR2 adecuado, por ejemplo mediante TNF de membrana, pero no mediante TNF soluble. Resultado: Tal como se esperaba, ni el TNF humano soluble (TNF humano) ni las variantes de scTNF muestran efecto tóxico con ligantes peptídicos triples y cuádruples (scTNF3x, scTNF4x) sobre las células TNFR2-Fas de MF. En otras palabras, sTNF y las variantes de scTNF no pueden activar, de la misma manera, células que expresan quimeras de TNFR2 (TNFR2-Fas), es decir no provocan en estas células la muerte celular. Igualmente, tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo (tal como se describió anteriormente) no mostró efecto tóxico.

20 La figura 3 muestra el resultado de una prueba de citotoxicidad en la que se estudió el efecto de TNF de tipo natural humano soluble y una variante de scTNF en combinación con un anticuerpo específico para TNFR2 especial, 80M2, sobre células que expresan quimeras de TNFR2 (FNFR2-Fas). El enfoque de ensayo corresponde al de la figura 2 con la diferencia de que se añadió el TNF de tipo natural soluble o el scTNF con ligantes peptídicos triples (scTNF3x) junto con el anticuerpo 80M2. A este respecto se conoce que el anticuerpo 80M2 confiere al TNF soluble normal la capacidad de señalización especial de TNF unido a membrana. El resultado muestra que tanto TNF de tipo natural soluble como scTNF en combinación con el anticuerpo 80M2 logran un fuerte efecto citotóxico sobre las quimeras de receptores TNFR2-Fas. Un motivo para esto es que TNF soluble en combinación con determinados anticuerpos específicos para TNFR2, tal como por ejemplo 80M2, puede desarrollar la actividad de TNF unido a membrana. Las células TNFR-2-Fas de MF se destruyen tras la incubación con TNF soluble o el scTNF en presencia de un anticuerpo estabilizador del complejo ligando-receptor de este tipo (80M2-AK). Es decir, en presencia de este anticuerpo, TNF soluble así como scTNF provocan en la misma medida un efecto tóxico en las células TNFR2/FAS de MF, igual al que sólo puede lograrse mediante TNF de membrana. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo (tal como se describió anteriormente en la figura 1) no mostró efecto tóxico.

35 Las figuras 4 a 10 muestran resultados de diferentes pruebas de estabilidad, que corroboran que las variantes de scTNF según la invención, debido a su estructura, disponen de una estabilidad notablemente mejor que TNF de tipo natural soluble.

40 Se incubaron sTNF o las variantes de scTNF en medio de cultivo que contiene suero en concentraciones de desde 3,0 hasta 0,01 ng/ml a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante diferentes tiempos. A continuación se sometió a prueba la funcionalidad de sTNF o variantes de scTNF (scTNF3x, scTNF4x) en pruebas de citotoxicidad, basadas en células TNFR1-Fas de MF y células Kym1. Para estas pruebas de citotoxicidad se utilizaron diluciones 1:3, partiendo de una muestra de TNF 3,0 ng/ml. Como control negativo se utilizó el lisado de bacterias control utilizado en las pruebas de citotoxicidad descritas anteriormente (lisado de bacterias que no expresan scTNF, que se procesó de manera idéntica a las proteínas de scTNF recombinantes).

45 La figura 4 muestra la bioactividad de las moléculas utilizadas antes de las pruebas de estabilidad sobre células TNFR1-Fas de MF de fibroblastos de ratón. Se prepararon nuevas diluciones de TNF de tipo natural humano soluble (TNFhuman) y scTNF y se diluyeron con las células. Tanto el TNF control soluble como las variantes de scTNF condujeron tras la incubación con las MF a su muerte celular. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control no mostró efecto tóxico. Los valores de DE<sub>50</sub> (mitad de la concentración activa máxima) se situaron a aproximadamente 0,2 ng/ml para el TNF de tipo natural humano soluble y a 0,1 ng/ml para las dos variantes de scTNF diferentes utilizadas. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

55 La figura 5 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con células TNFR1-Fas de MF de fibroblastos de ratón. Las diluciones de TNF de tipo natural y scTNF mostradas en la figura 5 se incubaron en este caso durante 8 días en un incubador de células antes de llevar a cabo la prueba, para poder valorar la estabilidad de las muestras. Pudo medirse una clara disminución de la bioactividad del TNF de tipo natural soluble (TNFhuman) tras 8 días a 37°C, mientras que la actividad de las dos variantes de scTNF (scTNF3x, scTNF4x; véase la explicación anteriormente) se mantuvo invariable. Para el TNF de tipo natural se obtuvo un valor de DE<sub>50</sub> de aproximadamente 2 ng/ml (recién utilizado 0,2 ng/ml, véase la figura 4). Las variantes de scTNF se mantuvieron con valores de DE<sub>50</sub> de aproximadamente 0,1 ng/ml igual de activas que las muestras recién preparadas (véase la figura 4). Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

65 La figura 6 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con células TNFR1-Fas de MF de fibroblastos de ratón. Se incubaron las disoluciones de TNF de tipo natural y scTNF tal como se explica en la figura 5 en este caso durante 14 días en un incubador de células. Pudo medirse una clara disminución adicional de la bioactividad del TNF

de tipo natural tras 14 días a 37°C, mientras que la actividad de las variantes de scTNF se mantuvo aproximadamente igual. Para sTNF se obtuvo un valor de DE<sub>50</sub> de aproximadamente 2,8 ng/ml (recién utilizado 0,2 ng/ml, véase la figura 4), las variantes de scTNF se mantuvieron con 0,13 ng/ml casi igual de activas que las muestras recién preparadas (0,1 ng/ml, véase la figura 4). Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

La figura 7 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con la línea de células humanas Kym1. Las células Kym1 expresan receptores de TNF de tipo natural humanos normales y reaccionan igualmente de manera citotóxica sobre TNF. El ensayo se llevó a cabo de manera análoga a las pruebas de estabilidad con fibroblastos de ratón según las figuras 4 a 6: Se incubaron TNF de tipo natural soluble o variantes de scTNF (scTNF3x, scTNF4x) en un medio que contenía suero a concentraciones de desde 3,0 hasta 0,01 ng/ml a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante diferentes tiempos. A continuación se sometió a prueba la funcionalidad del sTNF soluble o de las variantes de scTNF en pruebas de citotoxicidad sobre células Kym1. Partiendo de una muestra de TNF 3,0 ng/ml se utilizaron diluciones 1:3 para la prueba. Como control negativo se utilizó el lisado de bacterias control descrito anteriormente. Se prepararon nuevas diluciones de TNF de tipo natural y scTNF y se utilizaron. El resultado muestra que tanto TNF de tipo natural como las variantes de scTNF presentan fuerte actividad citotóxica. Los valores de DE<sub>50</sub> se sitúan a aproximadamente 0,1 ng/ml para el TNF de tipo natural y a aproximadamente 0,06 ng/ml para las variantes de scTNF. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

La figura 8 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con la línea de células humanas Kym1. Las disoluciones de TNF de tipo natural y scTNF se incubaron en este caso durante 16 días en un incubador de células. A continuación se llevó a cabo la prueba de citotoxicidad de células Kym1. Pudo medirse una clara disminución de la actividad de sTNF tras 16 días a 37°C, mientras que por el contrario la toxicidad, es decir la bioactividad, de las variantes de scTNF se mantuvo aproximadamente igual. Para TNF de tipo natural se obtuvo un valor de DE<sub>50</sub> de aproximadamente 1,2 ng/ml. Las variantes de scTNF se mantuvieron con 0,06 ng/ml igual de activas que las muestras recién preparadas. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

La figura 9 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con la línea de células humanas Kym1. Se incubaron las disoluciones de sTNF y scTNF en este caso durante 22 días en un incubador de células. Pudo medirse una clara disminución adicional de la actividad de sTNF tras 22 días a 37°C. Las variantes de scTNF eran igual de estables antes y después. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

La siguiente tabla 1 muestra los datos de los resultados de las pruebas de estabilidad según las figuras 7 y 9 en comparación:

Tabla 1: Comparación de los valores de ED<sub>50</sub> de las figuras 7+9

	DE <sub>50</sub> recién valorado (figura 7)	DE <sub>50</sub> tras 22 días (figura 9)	Pérdida de actividad
sTNF	0,1 ng/ml	1,50 ng/ml	>90%
scTNF	0,06 ng/ml	0,07 ng/ml	Apenas comprobable

La figura 10 muestra el resultado de una prueba de estabilidad con la línea de células humanas Kym1. Se valoraron diluciones de 3 ng/ml tras 16 días a 37°C. Al contrario que en las figuras 4 a 9 anteriores, en este ensayo se confeccionó una curva de valoración partiendo de una dilución de TNF 3 ng/ml que se almacenó 16 días, mientras que en el caso de las curvas de valoración mostradas anteriormente se produjeron las diluciones en cada caso y después se almacenaron durante el tiempo determinado. Queda por determinar que una comparación de los datos de la figura 8 (ensayo análogo con tiempo de incubación de 16) y la figura 10 no da diferencias importantes. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo no mostró efecto tóxico.

La figura 11 muestra el resultado de una prueba de estabilidad en suero humano. Para someter a prueba la estabilidad de TNF de tipo natural y scTNF en suero humano, en un primer enfoque de ensayo se diluyó el TNF de tipo natural soluble y la variante de scTNF4x en suero al 100% y se valoró inmediatamente. Como resultado, para TNF de tipo natural se midió un valor de DE<sub>50</sub> de 0,004 ng/ml y para la variante de scTNF, un valor de DE<sub>50</sub> de 0,007ng/ml.

La figura 12 muestra el resultado de una prueba de estabilidad en suero humano. Para someter a prueba la estabilidad de TNF de tipo natural y scTNF en suero humano, en un enfoque de ensayo adicional se almacenaron TNF de tipo natural y la variante de scTNF4x en suero no inactivado por calor recién preparado al 100% durante 8 días a 37°C y a continuación se valoró en células Kym1. Como resultado, para TNF de tipo natural se midió un valor de DE<sub>50</sub> de 0,40 ng/ml y para la variante de scTNF, un valor de DE<sub>50</sub> de 0,03 ng/ml. Las consecuencias del almacenamiento de 8 días en suero al 100% se representan tal como sigue: en comparación con scTNF valorado inmediatamente, el scTNF almacenado 8 días mostró una pérdida de actividad alrededor del factor de aproximadamente 4,3, mientras que para el scTNF soluble mostró una pérdida de actividad drástica alrededor del

factor 100 durante el almacenamiento en suero al 100%. Por consiguiente, el scTNF según la invención mostró, en comparación con sTNF, una bioactividad notablemente más alta tras la incubación de 8 días en suero y por consiguiente se confirma como muy estable en suero humano a temperaturas fisiológicas.

- 5 En la siguiente tabla 2 se ponen a disposición los datos de los resultados de las figuras 11 y 12 una vez más como aclaración.

Tabla 2: Comparación de los valores de ED<sub>50</sub> de las figuras 11+12

	DE <sub>50</sub> recién valorado (figura 11)	DE <sub>50</sub> tras 8 días (figura 12)	Pérdida de actividad
TNF soluble	0,004 ng/ml	0,40 ng/ml	100 veces
TNF de cadena sencilla	0,007 ng/ml	0,03 ng/ml	4,3 veces

10 La figura 13 muestra el resultado de un análisis mediante electroforesis en gel de poliácridamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se representa un gel de plata de TNF de tipo natural purificado y las variantes de scTNF purificadas, scTNF3x y scTNF4x. En cada caso se incuban las muestras con β-mercaptoetanol (concentración final del 5%) a 95°C durante 5 min. Sobre el gel de plata se cargaron aproximadamente 500 ng de sTNF y scTNF4x y aproximadamente 150 ng de scTNF3x por carril. El resultado del gel de plata de las variantes de scTNF separadas en un SDS-PAGE al 15% muestra que las dos variantes de scTNF también en condiciones reductoras presentan un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, que se corresponde con su estructura. También puede establecerse que las diferentes cantidades de las proteínas scTNF3x y scTNF4x cargadas no tuvieron ninguna influencia sobre el resultado. Esto prueba la estabilidad de las proteínas o polipéptidos según la invención en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Por el contrario, el resultado para sTNF muestra que la proteína se divide en sus monómeros de aproximadamente 17 kDa.

15 La figura 14 muestra el resultado de una prueba de estabilidad en condiciones reductoras y desnaturalizantes. En este enfoque de ensayo se realizó una inmunotransferencia de tipo Western de las muestras separadas en un SDS-PAGE al 15% de TNF de tipo natural y de las variantes de scTNF, scTNF3x y scTNF4x. Se realizaron dos enfoques paralelos, en los que las muestras en un enfoque en se incubaron cada caso con β-mercaptoetanol (concentración final al 5%) a 95°C durante 5 min., mientras que en el otro enfoque no se llevó a cabo incubación en β-mercaptoetanol. La detección tras la ejecución de la electroforesis se llevó a cabo con un anticuerpo anti-TNF. Como resultado puede reconocerse que el anticuerpo detecta de manera específica la proteína de las dos variantes de scTNF en bandas claras a aproximadamente 50 kDa. Para TNF de tipo natural se detecta de manera específica la proteína a aproximadamente 17 kDa. De nuevo, esto prueba la estabilidad de las variantes scTNF3x y scTNF4x según la invención en condiciones reductoras y desnaturalizantes y tal como se esperaba coincide igualmente con los resultados de la figura 13.

20 La figura 15 muestra el resultado de un ensayo de degradación de IκappaB. IκappaB (I-κB) es un inhibidor del factor de transcripción del factor nuclear kappa B (NF-κB), que se suministra de manera conocida mediante TNF para la degradación, mediante lo cual se activa NF-κB. Para comprobar la degradación de I-κB se produjeron lisados de células 0, 30 y 60 minutos tras la estimulación con en cada caso TNF de tipo natural, scTNF3x y scTNF4x 10 ng/ml y a continuación se analizaron en inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos específicos para I-κB. El resultado muestra que se indujo la degradación transitoria de I-κB tanto por TNF de tipo natural como por las dos variantes de scTNF, correspondiendo el comportamiento de reacción de las variantes de scTNF con el de TNF de tipo natural. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo (tal como se describió anteriormente un lisado de bacterias que no expresa scTNF, que se procesó de manera idéntica a las proteínas de scTNF recombinante) no mostró efecto sobre la degradación de I-κB.

25 La figura 16 muestra el resultado de un ensayo de JNK. JNK (cinasa N-terminal de c-jun) es una cinasa inducida por estrés, que se activa muy fuertemente mediante TNF de manera conocida. Tras la estimulación de células Kym-1 durante 0, 30 o 60 minutos con en cada caso TNF de tipo natural, scTNF3x y scTNF4x 10 ng/ml se produjeron lisados de células y se sometió a prueba la actividad de JNK a través de inmunoprecipitación de JNK con anticuerpos específicos para JNK y posterior ensayo de cinasa con GST c-Jun como sustrato. Tal como se esperaba, el lisado de bacterias control utilizado como control negativo (tal como se describió anteriormente) no mostró activación de cinasa JNK. El resultado muestra que se llevó a cabo una activación de JNK tanto mediante las dos variantes de scTNF como mediante el TNF de tipo natural, correspondiendo el comportamiento de reacción de las variantes de scTNF con el de TNF de tipo natural.

30 La figura 17 muestra el resultado de un ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA). Una comprobación adicional típica de la actividad de TNF representa la translocación del factor de transcripción NF-κB en el núcleo celular desarrollada tras la inducción llevada a cabo de la degradación de I-κB. Para ello se produjeron preparaciones de núcleos celulares de células control KYM-1 no estimuladas (cero minutos de estimulación) y de células estimuladas (30 y 60 minutos de estimulación), respectivamente. La estimulación de las células se llevó a cabo en cada caso con TNF de tipo natural, scTNF3x y scTNF4x. El factor de transcripción NF-κB translocado en los

núcleos celulares se comprobó con ayuda de oligonucleótidos marcados radiactivamente, específicos para NF-κB. El resultado muestra que NF-κB se translocó en el núcleo celular. A este respecto, el comportamiento de reacción de las variantes de scTNF se corresponde con el de TNF de tipo natural.

5 La figura 18 muestra un esquema de constructo a modo de ejemplo de los polipéptidos según la invención, representado mediante TNF (como un miembro de la familia de ligandos de TNF). Las denominaciones presentan los siguientes significados:

10 los constructos AI/AII y BI/BI presentan una utilización de codones optimizada para la expresión de las proteínas en *E. coli*, y representan moléculas que están enlazadas con en cada caso ligantes triples o ligantes cuádruples de GlyGlyGlySer. Todas las moléculas portan en el extremo N-terminal una etiqueta de histidina para una purificación más fácil, las moléculas BI/BIII portan adicionalmente una cadena de aminoácidos corta con un resto cisteína para un enlace covalente dirigido.

15 los constructos de C a H son adecuados para la expresión de las proteínas en células eucariotas, portan la correspondiente secuencia peptídica líder N-terminal.

sc = es la abreviatura para cadena sencilla,

20 cys = denomina un ligante peptídico N-terminal con cisteína interna para un acoplamiento covalente,

L1<sub>largo</sub> o L2<sub>largo</sub> = denomina el ligante 1 o 2, en cada caso con la secuencia de aminoácidos (GGGS-GGGS-GGGS-GGGS) o (GGGS)<sub>4</sub>,

25 L1<sub>corto</sub> o L2<sub>corto</sub> = denomina el ligante 1 o 2 en cada caso con la secuencia de aminoácidos (GGGS-GGGS-GGGS) o (GGGS)<sub>3</sub>,

secuencia peptídica líder = es la secuencia de aminoácidos para la secreción de la proteína a partir de células (huésped) eucariotas.

30 scFv40 = representa la secuencia del fragmento de anticuerpo 40 de cadena individual (scFv), que es específico para el antígeno FAP de estroma tumoral,

35 AMAIze = es la abreviatura para "citocinas de inducción de la apoptosis mediada por anticuerpos" y

Etiqueta de His/Flag = representa la secuencia peptídica para la purificación por afinidad de las proteínas expresadas

40 La figura 19 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scTNF-L<sub>corto</sub> (constructo A-II)

#### Características del constructo A-II

45 • Secuencia peptídica de etiqueta de His para la purificación por afinidad de la proteína formada: aminoácidos (abreviado a continuación en las figuras 19 a 26 con "AA") AA 5-10, nucleótidos (abreviado a continuación en las figuras 19 a 26 con "NT") NT 13-30

50 • Secuencia del módulo 1 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 11-169, NT 31-507

• Secuencia del ligante 1 (GGGS)<sub>3</sub>: AA 170- 181, NT 508- 543

55 • Secuencia del módulo 2 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 182-335, NT 544-1005

• Secuencia del ligante 2 (GGGS)<sub>3</sub>: AA 336-347, NT 1006-1041

60 • Secuencia del módulo 3 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 348-501, NT 1042-1503

• Codón de parada: NT 1504-1506

65 La figura 20 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de cys-scTNFL<sub>corto</sub> (constructo B-II)

Características del constructo B-II

- Aminoácido cisteína para el acoplamiento covalente: AA 9, NT 25-27
- 5 • Secuencia peptídica de etiqueta de His para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 15-20, NT 43-60
- Secuencia del módulo 1 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 21-181, NT 61-543
- 10 • Secuencia del ligante 1 (GGGS)<sub>3</sub>: AA 182-193, NT 544-579
- Secuencia del módulo 2 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 194-347, NT 580-1041
- 15 • Secuencia del ligante 2 (GGGS)<sub>3</sub>: AA 348- 359, NT 1042-1077
- Secuencia del módulo 3 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural, secuencia con utilización de codones de *E. coli* optimizada): AA 360-513, NT 1078-1539
- 20 • Codón de parada: NT 1540-1542

La figura 21 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scFasL (constructo C)

- 25 • Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-15, NT 1-45

Características del constructo C

- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-15, NT 1-45
- 30 • Secuencia peptídica de etiqueta Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 19-26, NT 55-78
- Secuencia del módulo 1 de FasL humano (dominio extracelular AA 139-281 de la molécula de FasL humano natural): AA 30-173, NT, 90-519
- 35 • Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 174-189, NT 520-567
- Secuencia del módulo 2 de FasL humano (dominio extracelular AA 139-281 de la molécula de FasL humano natural): AA 190-332, NT 568-996
- 40 • Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 333- 348, NT 997-1044
- Secuencia del módulo 3 de FasL humano (dominio extracelular AA 139-281 de la molécula de FasL humano natural): AA 349-491, NT 1045-1473
- 45 • Codón de parada: NT 1474-1476

La figura 22 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scTRAIL (constructo D)

- 50 • Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-15, NT 1-45

Características del constructo D

- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-15, NT 1-45
- 55 • Secuencia peptídica de etiqueta Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 19-26, NT 55-78
- Secuencia del módulo 1 de TRAIL humano (dominio extracelular AA 95-281 de la molécula de TRAIL humano natural): AA 30-216, NT 88-648
- 60 • Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 217-232, NT 649-696
- Secuencia del módulo 2 de TRAIL humano (dominio extracelular AA 95-281 de la molécula de TRAIL humano natural): AA 233-419, NT 697-1257
- 65 • Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 420-435, NT 1258-1305

- Secuencia del módulo 3 de TRAIL humano (dominio extracelular AA 95-281 de la molécula de TRAIL humano natural): AA 436-622, NT 1306-1866

- 5
- Codón de parada: NT 1861-1863

La figura 23 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scTNF (constructo E)

10 Características del constructo E

- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-15, NT 1-45
- Secuencia peptídica de etiqueta de Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 19-26, NT 55-78
- Secuencia del módulo 1 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural): AA 30-184, NT 88-552
- Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 85-200, NT 553-600
- Secuencia del módulo 2 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural): AA 201-355, NT 601-1065
- Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 356-371, NT 1066-1113
- Secuencia del módulo 3 de TNF humano (dominio extracelular de la molécula de TNF humano natural): AA 372-526, NT 1114-1581
- Codón de parada: NT 1799-1581

La figura 24 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scFasL-AMAIze (constructo F)

35 Características del constructo F

- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-19, NT 1-57
- Secuencia del fragmento de anticuerpo 40 monocatenario (scFv) específico para el antígeno FAP de estroma tumoral: AA 20-267, NT 58-801
- Secuencia peptídica de etiqueta Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 278-285, NT 832-855
- Secuencia del módulo 1 de FasL humano (dominio extracelular, AA 139-281, de la molécula de FasL humano natural): AA 290-432, NT 868-1296
- Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 433-448, NT 1297-1344
- Secuencia del módulo 2 de FasL humano (dominio extracelular, AA 139-281, de la molécula de FasL humano natural): AA 449-591, NT 1345-1773
- Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 592-607, NT 1774-1821
- Secuencia del módulo 3 de FasL humano (dominio extracelular, AA 139-281, de la molécula de FasL humano natural): AA 608-750, NT 1822-2250
- Codón de parada: NT 2251-2253

60 La figura 25 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scTRAIL-AMAIze (constructo G)

Características del constructo G

- 65
- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-19, NT 1-57

- Secuencia del fragmento de anticuerpo 40 monocatenario (scFv) específico para el antígeno FAP de estroma tumoral: AA 20-267, NT 58-801
- 5 • Secuencia peptídica de etiqueta Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 278-285, NT 832-855
- Secuencia del módulo 1 de TRAIL humano (dominio extracelular, AA 95-281, de la molécula de TRAIL humano natural): AA 289-475, NT 865-1426
- 10 • Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 476-491, NT 1427-1476
- Secuencia del módulo 2 de TRAIL humano (dominio extracelular, AA 95-281, de la molécula de TRAIL humano natural): AA 492-678, NT 1477-2034
- 15 • Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 679-694, NT 2035-208
- Secuencia del módulo 3 de TRAIL humano (dominio extracelular, AA 95-281, de la molécula de TRAIL humano natural): AA 695-, NT 2083-2643
- 20 • Codón de parada: NT 2644-2646

La figura 26 muestra la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos correspondiente de scTNF-AMAIze (constructo H)

25 Características del constructo H

- Secuencia peptídica líder para la secreción de la proteína en células eucariotas: AA 1-19, NT 1-57
- 30 • Secuencia del fragmento de anticuerpo 40 monocatenario (scFv) específico para el antígeno FAP de estroma tumoral: AA 20-267, NT 58-801
- Secuencia peptídica de etiqueta Flag para la purificación por afinidad de la proteína formada: AA 278-285, NT 832-855
- 35 • Secuencia del módulo 1 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural): AA 289-443, NT 865-1329
- Secuencia del ligante 1 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 444- , NT 1330-1377
- 40 • Secuencia del módulo 2 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural): AA 460-614, NT 1378-1842
- Secuencia del ligante 2 de (GGGS)<sub>4</sub>: AA 615-630, NT 1843-1890
- 45 • Secuencia del módulo 3 de TNF humano (dominio extracelular, AA 79-181, de la molécula de TNF humano natural): AA 631-785, NT 1891-2353
- Codón de parada: NT 2356-2358

50 La figura 27 muestra la farmacocinética de TNF de tipo natural humano y scTNF humano (véase el ejemplo 2). Los datos en la figura 27 muestran un claro aumento de la semivida *in vivo* de las variantes de scTNF. Por consiguiente, para scTNF frente a TNF, se espera una duración de la acción *in vivo* claramente elevada, que por consiguiente destaca el valor de scTNF, en particular de scTNF-L<sub>2</sub>, como posible producto terapéutico.

55 La figura 28 muestra CysHis-scTNF acoplado covalentemente a partículas (sílice). Este CysHis-scTNF acoplado covalentemente es bioactivo y presenta la actividad especial del TNF unido a membrana, es decir activa TNFR2. La figura 28 muestra que las células de fibroblastos de ratón, que están transfectadas con el constructo TNFR2-Fas y que se han tratado con diluciones en serie de los reactivos indicados, son completamente resistentes frente a wtTNF soluble. Tras el acoplamiento covalente de CysHis-scTNF reducido a micropartículas de sílice (perlas) según protocolos establecidos (DPA 2001, n.º DE10144252) éstas provocan una fuerte respuesta citotóxica (círculos), similar a un control positivo que se compone de CysHis-scTNF y un anticuerpo unido a TNFR2, Acm 80M2 (triángulos). Tal como se esperaba, el CysHis-scTNF no acoplado no muestra actividad sobre células positivas para TNFR2 (cuadrados).

65 La presente invención se ilustra a continuación mediante los ejemplos:

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Producción de diferentes constructos polipeptídicos

5 Se realizaron todas las clonaciones según protocolos convencionales. A continuación se exponen las condiciones de las mismas.

#### PCR convencional:

10 Se amplificaron 60 ng de molde, 0,5 µl de cebador 100 µM, 1 µl de dNTPs 10 mM así como 5 µl de tampón 10x y 2 U de Taq-polimerasa en un volumen de reacción de 50 µl con el siguiente programa de PCR. Desnaturalización: 94°C, 3 min.; 15 ciclos: desnaturalización 94°C, 30 s, hibridación 55°C, 30 s, alargamiento 72°C, 90 s; alargamiento final: 72°C, 7 min.

#### Digestión de productos de PCR:

15 Se purificó el producto de PCR sobre un gel de agarosa y se eluyó y a continuación se digirió con las respectivas enzimas de restricción (véanse los datos precisos) en una mezcla básica de reacción de 40 µl a una temperatura de escisión óptima (facilitada por el fabricante) durante 2 horas.

20 Digestión de vectores:  
Se digirió 1 µg de vector con 5 U de la enzima de restricción correspondiente en un volumen de reacción de 20 µl durante 2 horas a una temperatura de escisión óptima (ésta depende de la enzima utilizada y la facilitará el fabricante). Para la desfosforilación de los vectores se añadieron 10 U de fosfatasa alcalina durante 1 hora para la digestión de reacción.

#### Reacción de "relleno":

25 Se mezcló la mezcla básica de una digestión de vector con dNTPs 33 µM y fragmento de Klenow de ADN 1 U/1 µg de la ADN polimerasa I y se incubó 15 min. a 25°C. Se detuvo esta reacción con EDTA 10 mM durante 20 min. a 75°C.

#### Ligación:

30 Se ligaron el vector y el inserto en una razón molar de 1:5 junto con 400 U de ligasa en un volumen de 10 µl durante la noche a 16°C.

#### I. Producción de scTNF<sub>humano</sub> (scTNF) con ligantes cuádruples o triples:

35 Se produjeron dos variantes de scTNF, que se diferencian por la longitud del ligante peptídico entre los módulos individuales. Se utilizaron cebadores con secuencia de ligante peptídico cuádruple o triple: ligante<sub>largo</sub> con secuencia (GGGS)<sub>4</sub> o ligante<sub>corto</sub> con secuencia (GGGS)<sub>3</sub>. Por tanto, los constructos producidos contenían o bien sólo dos ligantes cuádruples (L1 o L2 con (GGGS)<sub>4</sub> denominado "largo") o sólo dos ligantes triples (L1 o L2 con (GGGS)<sub>3</sub> denominado "corto").

40 1. Con los cebadores V y I o II (para el ligante<sub>largo</sub>) y el vector pQE-9 con un módulo de TNF (pQE9-HisTNF) como molde, se realizó una PCR convencional. El vector porta una secuencia de etiqueta de His para la purificación por afinidad posterior de la proteína producida.

45 2. A continuación, se digirió el producto de PCR I obtenido con 20 U de la respectiva enzima de restricción StuI y HindIII a 37°C. Se realizó la misma digestión así como una reacción de desfosforilación con el vector pQE9-HisTNF y se insertó mediante una ligación el producto de PCR I en el vector pQE9-HisTNF. El resultado de esta etapa fue una etiqueta de His-módulo 1 de TNF con un ligante 1<sub>corto</sub> o largo o el siguiente constructo en el vector pQE9:

#### **EcoRI-etiqueta de His-módulo 1 de TNF-Ligante 1<sub>corto</sub> o largo-BamHI**

50 3. A través de una PCR adicional con los cebadores III y I o II (para ligante<sub>largo</sub>) y el vector pQE9-HisTNF como molde, se produjo el producto de PCR II. A continuación, se cortó el producto de PCR II con en cada caso 20 U de la enzima de restricción EcoRI y HindIII y se insertó en el vector pQE9-HisTNF, que se había cortado y desfosforilado con las mismas enzimas. El resultado de esta clonación fue un vector pQE9, que se era tal como sigue:

**Módulo 2 de TNF-Ligante 2<sub>corto o largo</sub>-BamHI**

Este constructo no portaba ninguna secuencia para una etiqueta de His antes de la secuencia de TNF.

5 4. Se cortó del vector el producto de PCR II clonado de la etapa 3 en primer lugar con la enzima de restricción HindIII y a continuación parcialmente con BamHI (1 U/μg de ADN). Igualmente, se cortó, se desfosforiló secuencialmente el vector pQE9-etiqueta de His-módulo 1 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub> con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y se ligó el producto de PCR II en este vector. El resultado fue un vector pQE9 con el siguiente constructo:

10 **etiqueta de His-módulo 1 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub>-módulo 2 de TNF-ligante 2<sub>corto o largo</sub>**

15 5. Con el vector pQE9-HisTNF como molde y los cebadores III y IV se realizó una PCR adicional en condiciones convencionales y se digirió secuencialmente el producto de PCR III obtenido con las enzimas de restricción BamHI (40 U) y HindIII (40 U). Entonces se ligó este fragmento en un vector pBluescript SKII, que igualmente se cortó con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El resultado de esta clonación fue un vector pBluescript SKII, que contenía el módulo 3 de TNF sin ligante.

20 6. Se cortó el vector pQE9 con el constructo **etiqueta de His-módulo 1 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub>-módulo 2 de TNF-ligante 2<sub>corto o largo</sub>** con la enzima de restricción EcoRI, a continuación se trató este vector con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, para realizar una reacción de "relleno". Tras esta etapa se realizó una digestión de restricción parcial con la enzima BamHI (1 U/μg de ADN).

25 7. De forma paralela a la etapa 6 se cortó el vector pBluescript SKII, que contiene el módulo 3 de TNF, con la enzima de restricción XbaI, a continuación se trató este vector con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, para realizar una reacción de "relleno". Tras esta etapa se realizó una segunda digestión de restricción con la enzima BamHI en condiciones convencionales con desfosforilación adicional.

30 8. A continuación, se ligó el fragmento obtenido mediante la digestión de restricción de la etapa 6 en el vector lineal generado en la etapa 7. Los constructos se encontraban en orden inverso tal como se indica a continuación:

35 HindIII-módulo 3 de TNF-ligante 2<sub>corto o largo</sub>-módulo 2 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub>-módulo 1 de TNF-etiqueta de His-EcoRI

9. Se cortó el constructo de TNF inverso de la etapa 8 con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII del vector pBluescript SKII y se ligó en el vector pQE9-HisTNF tratado con las mismas enzimas así como desfosforilado. Mediante esto se generó el siguiente constructo con el scTNF completo en la orientación correcta:

40 **EcoRI-etiqueta de His-módulo 1 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub>-módulo 2 de TNF-ligante 2<sub>corto o largo</sub>-módulo 3 de TNF-HindIII**

45 10. Para la producción de un scTNF con una cisteína N-terminal, se hibridaron los oligo cys-scTNF VI y VII (se calentaron en cada caso 20 μl de Oligo VI o VII 100 μM juntos durante 5 min. a 95°C y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente) y así se formó el oligo1. Se digirió el constructo del punto 9 con las enzimas de restricción EcoRI y BbsI y se ligó el Oligo1, que dispone de los mismos puntos de corte, en el vector. Alternativamente se insertó la cisteína a través de mutagénesis de PCR. El resultado de esta clonación fue el siguiente constructo:

50 **EcoRI-cisteína-etiqueta de His-módulo 1 de TNF-ligante 1<sub>corto o largo</sub>-módulo 2 de TNF-ligante 2<sub>corto o largo</sub>-módulo 3 de TNF-HindIII**

Se verificaron todos los constructos por medio de secuenciación.

55 La expresión tuvo lugar en la cepa XL-1 blue de *E. coli*. La purificación de las variantes de scTNF expresadas tuvo lugar con ayuda de métodos cromatográficos (cromatografía de intercambio aniónico y de afinidad por la etiqueta de His).

A continuación se indican las secuencias de los cebadores utilizados:

60 Secuencias de ligantes peptídicos a nivel de proteínas

Ligante GGGs triple (corto) = (GGGS)<sub>3</sub>: GGGs GGGs GGGs  
Ligante GGGs cuádruple (largo) = (GGGS)<sub>4</sub>: GGGs GGGs GGGs GGGs

65

Secuencias de ligantes peptídicos a nivel de nucleótidos

Ligante GGGS triple (corto) =5'GGT GGC GGT TCT GGT GGC CGT GGT TCT GGT GGC GGA TCC3'

Ligante GGGS cuádruple (largo) = 5'GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGA TCC3'

Cebadores para las clonaciones

**Cebador de scTNF I**

5'- TCG ATT AAG CTT CCC GGG GGA TCC GCC ACC AGA ACC GCC ACC AGA  
ACC GCC ACC CAG AGC GAT GAT ACC GAA GTA AAC CTG ACC -3'

**Cebador de scTNF II**

5'- ATC GAT TAA GCT TCC CGG GGG ATC CGC CAC CAG AAC CGC CAC CAG  
AAC CGC CAC CAG AAC CGC CAC CCA GAG CGA TGA TAC CGA AGT AAA CCT  
GAC C -3'

**Cebador de scTNF III**

5'- CCC CGA ATT CGG ATC CTC TTC TCG TAC CCC GTC TGA CAA ACC G -3'

**Cebador de scTNF IV**

5'- GGG GGG GAA GCT TAT CGA TAG TTA GAT ATC ATC ACA GAG CGA TGA  
TAC CGA AG -3'

**Cebador de scTNF V**

5'- CCT GTA CCT GAT CTA CTC CCA GGT TCT GTT CAA AGG CCA GG -3'

Oligo para la inserción de CysHis:

Cebador de cys-scTNF VI

AAT TCA TTA AAG AGG AGA AAT TAA CTA TGG GAG AGC TCA TCG AAG  
GTC GCT GCG CCG GTG GAT CTG GTC ATC ATC ATC ACC ATC ACG GCT CAG  
ACG G

Cebador de cys-scTNF VII

CGC TCC GTC TGA GCC GTG ATG GTG ATG ATG ATG ACC AGA TCC ACC  
GGC GCA GCG ACC TTC GAT GAG CTC TCC CAT AGT TAA TTT CTC CTC TTT  
AAT G

II. Producción de scFasL en constructos de pcDNA3 y AMAiZe:

Para la siguiente clonación se utilizaron las condiciones convencionales indicadas en el ejemplo 1.

A. Generación de señal HA en pcDNA3

1. Digestión del vector pcDNA3 con KpnI y NotI.

2. Producción del oligo-HA con la secuencia KpnI-símbol HA-NotI a través de la hibridación del cebador HA-IF y HA-IIR para la secuencia peptídica líder:

3. Ligación del oligo-HA (contiene el punto de corte de KpnI y NotI) en el vector pcDNA3.

B. Producción de scFasL en el vector pcDNA3(+)

1. PCR con cebador FasL#1F y FasL#2R sobre el vector de FasL-AMAIZE de molde. La producción de este tipo de constructos se describe en la solicitud de patente DE 10045591.3, que por la presente se incluye en su totalidad en el contenido dado a conocer de la presente invención. El producto de esta PCR 1 era un constructo **NotI-etiqueta Flag-módulo 1 de FasL-ligante 1-BamHI-XbaI**.

2. A través de los puntos de corte de restricción de NotI y XbaI, se clonó este constructo en el vector de la secuencia pcDNA3-HA digerido con las mismas enzimas, de modo que se produce el siguiente constructo:

**Secuencia de HA-etiqueta Flag-módulo 1 de FasL-ligante 1-BamHI-XbaI**

3. Con ayuda de una PCR adicional, en el vector FasL-AMAIZE de molde y los cebadores FasL#3 y FasL#1 se generó el siguiente producto de PCR 2:

**Extremo romo-módulo 2 de FasL- ligante 2-BamHI-XbaI**

4. En la siguiente etapa se digirió el vector pcDNA3 del punto 2 con BamHI, se rellenó este punto de corte con la enzima de Klenow y a continuación se cortó con XbaI, de modo que se produjo un "extremo romo" y un "extremo cohesivo". A continuación, en este vector así modificado, se clonó el producto de PCR 2, mediante lo cual se formó el siguiente constructo:

**Secuencia de HA-etiqueta Flag-módulo 1 de FasL-ligante 1-módulo 2 de FasL-ligante 2-BamHI-XbaI**

5. Para el tercer módulo se realizó una PCR adicional con el vector FasL-AMAIZE de molde y los cebadores FasL#4 y FasL#5. A continuación se digirió el producto de PCR formado con las enzimas de restricción BamHI y XbaI y se ligó en el vector cortado con las mismas enzimas del punto 4. El resultado de esta clonación fue el siguiente constructo en el vector pcDNA3:

**Secuencia de HA-NotI-etiqueta Flag-módulo 1 de FasL-ligante 1-módulo 2 de FasL-ligante 2-módulo 3 de FasL-parada-XbaI.**

Para la producción de los constructos de scFasL o scTNF-AMAIZE se digirieron los respectivos scFasL o scTNF con las enzimas de restricción NotI o EcoRI y XbaI y se insertaron los insertos como casete en los vectores AMAIZE correspondientes (véase la solicitud de patente DE 10045591.3), cortándose estos vectores igualmente con las enzimas NotI o EcoRI y XbaI. Sobre esto se produjeron los siguientes constructos:

**Péptido líder-scFv40-etiqueta Flag-módulo 1 de FasL-ligante 1-módulo 2 de FasL-ligante 2-módulo 3 de FasL**

**Péptido líder-scFv40-etiqueta Flag-módulo 1 de TNF-ligante 1-módulo 2 de TNF-ligante 2-módulo 3 de TNF**

A continuación se indican las secuencias de los cebadores utilizados:

FasL#1R:

5'ATCGATTCTAGACCCGGGGGATCCGCCACCAGAACCGCCACCAGAACCGCC  
ACCAGAACCGCCACCGAGCTTATATAAGCCGAAAAACGTCTGAGATTCT3'

FasL#2F:

5'GGGGTAGCGGCCGCGCTGTCGACGATTACAAAGAC3'

FasL#3F:

5'AGAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGG3'

FasL#4F:

5'GGGGCGGATCCGAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGG3'

FasL#5R:

5'GGGGCCTCTAGAATCGATGGTCAGAGCTTATATAAGCCGAAAAACGTCTG3'

HA-IF

5'CGCCAT GGCTATCATC TACCTCATCC TCCTGTTCAC CGCTGTGCGG  
GGAGC3'

5 HA-IIR

5'GGC CGC TGC CCC GCA CAG CGG TGA ACA GGA GGA TGA GGT AGA TGA  
TAG CCA TGG CGG TAC3'

III. Clonación de scTRAIL y producción de constructos de scTRAIL AMAIze

10

Para las siguientes clonaciones se utilizaron las condiciones convencionales indicadas en el ejemplo 1.

15 1. PCR con cebadores TRAIL#1 y TRAIL#2 sobre pcDNA3-sc40-TRAIL de molde (véase la solicitud de patente DE 10045591.3). Se cortó el producto de PCR 1 con EcoRI y XbaI y se ligó en el vector pcDNA3-scFasL digerido con las mismas enzimas de restricción. Esta digestión delecionó la secuencia FasL, manteniéndose la secuencia de HA y de la etiqueta Flag y ahora se produjo el siguiente constructo:

**Secuencia de HA - etiqueta Flag-módulo 1 de TRAIL-ligante 1-BamHI-XbaI**

20 2. Con ayuda del cebador TRAIL#1R y TRAIL#2F, se generó con el TRAIL-AMAIze de molde (véase la solicitud de patente DE 10045591.3) el producto de PCR 2. Éste se cortó sólo con XbaI, produciéndose un extremo romo y un extremo cohesivo. Se digirió el constructo del punto 1 con BamHI y a continuación se trató con la enzima de Klenow, de modo que se rellenaron los extremos. A continuación de esto se realizó una digestión con XbaI y se clonó el producto de PCR 2 en este vector. El resultado fue el siguiente constructo:

25

**Secuencia de HA-etiqueta Flag-módulo 1 de TRAIL-ligante 1-módulo 2 de TRAIL-ligante 2-BamHI-XbaI**

30 3. Para la clonación del módulo 3 de TRAIL, se realizó una PCR con los cebadores TRAIL#4 y TRAIL#5 sobre el TRAIL-AMAIze de molde, a continuación se digirió el producto con BamHI y XbaI y se clonó en el constructo del punto 2, digerido igualmente con BamHI y XbaI, mediante lo cual se produjo el siguiente constructo:

**Secuencia de HA-etiqueta Flag-módulo 1 de TRAIL-ligante 1-módulo 2 de TRAIL-ligante 2-módulo 3 de TRAIL-parada-XbaI**

35 Para la producción de los constructos scTRAIL-AMAIze se digirieron los respectivos vectores scTRAIL con las enzimas de restricción NotI o EcoRI y XbaI y se insertaron los insertos como casete en los vectores AMAIze correspondientes (véase la solicitud de patente DE 10045591.3), cortándose estos vectores igualmente con las enzimas NotI o EcoRI y XbaI. Sobre esto se produjeron los siguientes constructos:

40 HA-svFv40-etiqueta Flag-módulo 1 de TRAIL-ligante 1-módulo 2 de TRAIL-ligante 2-módulo 3 de TRAIL

A continuación se indican las secuencias de los cebadores utilizados:

Cebadores para la clonación de scTRAIL

45

TRAIL#1R:

5'ATCGATTTCTAGACCCGGGGATCCGCCACCAGAACCGCCACCAGAACCGCC  
ACCAGAACCGCCACCGCCAACTAAAAAGGCCCGAAAAAACTGGCTT-  
CATGGTC3'

50 TRAIL#2F:

5'GGGGTAGAATTCGGAACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAGTTCAAG3'

55 TRAIL#3F:

5'AACCTCTGAGGAAACCATTTCTACAG3'

TRAIL#4F:

5'GGGGCGGATCCACCTCTGAGGAAACCATTCTACAG3'

TRAIL#5R:

5  
5'GGGGCCTCTAGAATCGATGGTCAGCCAACTAAAAAGGCCCCGAAAAAACTGG  
C3'

**Ejemplo 2: Farmacocinética de TNF de tipo natural humano y scTNF humano.**

10 A ratones Balb/c de 6 semanas de edad se les inyectaron por vía i.v. 12 µg de TNF o scTNF (en cada caso 3 ratones). Cada 45 min. se extrajo sangre, se recogió y se determinó la concentración de TNF en suero por medio de un kit de ELISA específico para TNF humano. Los datos en la figura 27 muestran un claro aumento de la semivida *in vivo* de las variantes de scTNF. Por tanto, para scTNF se espera que presente una duración del efecto biológico *in vivo* claramente elevada, destacando por consiguiente el valor de scTNF como potencial producto terapéutico.

**Ejemplo 3: CysHis-scTNF acoplado covalentemente a partículas (sílice).**

20 Se trataron fibroblastos de ratón, que están transfectados con el constructo TNFR2-Fas, con diluciones en serie de los reactivos indicados. Estas células son completamente resistentes frente a wtTNF soluble. Tras el acoplamiento covalente de CysHis-scTNF reducido en micropartículas de sílice (perlas) según protocolos establecidos (DPA 2001, n.º DE10144252) éstas provocan una fuerte respuesta citotóxica (círculos), similar a un control positivo compuesto de CysHis-scTNF y un anticuerpo unido a TNFR2, Acm 80M2 (triángulos). Tal como se esperaba, el CysHis-scTNF no acoplado no muestra actividad sobre células positivas para TNFR2 (cuadrados). El CysHis-scTNF acoplado covalentemente es bioactivo y presenta la actividad especial de TNF unido a membrana, es decir activa TNFR2.

**Ejemplo 4: Comparación de (rh)TNF humano recombinante convencional y scTNF en modelos de necrosis tumoral *in vivo* y actividad citotóxica de L929 *in vitro***

Ratones: C3H/HeJ (hembras), 17-19 g de Charles River

Células tumorales: Línea de células de fibrosarcoma inducido por metilcolantreno CFS-1 de C3H/HeN derivadas de ratón (Referencia: Hafner M., P. Orosz, A. Krüger, y D.N. Männel. 1996 TNF promotes metastasis by impairing natural killer cell activity. Internat. J. Cancer 66:388-392);

35 Experimento de necrosis tumoral: Los ratones recibieron  $1,6 \times 10^7$  células CFS-1 en 50 µl de medio (RPMI, FCS al 10%) por vía intradérmica en el lomo; se dejaron crecer los tumores 12 días, hasta que alcanzaron un tamaño de aproximadamente 5-6 mm de diámetro, antes de la inyección intraperitoneal con TNF (10 µg por ratón) en 200 µl de PBS o PBS solo como control. Se midió a diario el tamaño tumoral y se estudió macroscópicamente. Se sacrificaron los ratones en el 6º día tras el tratamiento y se extirparon los tumores para histología. Se cortaron los tumores, se fijaron durante la noche en formalina tamponada con PBS al 4% y se incrustaron en parafina. Se tiñeron cortes verticales ecuatoriales (4 µm) con hematoxilina y eosina y se estudiaron microscópicamente para determinar necrosis (tal como se describe por ejemplo en: Lucas R. *et al*, 2001, Int J Cancer, 91:543-549).

TNF: actividad específica de rhTNF  $6,6 \times 10^6$  U/mg (48 h prueba de L929 sin Act D) scTNF

Experimento *in vitro*, actividad de LD50 en ensayo de citotoxicidad de L929 con Act.D para:

rhTNF= 391 pg/ml  
scTNF= 39 pg/ml

(sometido a prueba con las mismas muestras de TNF que se utilizaron para los experimentos *in vivo*) scTNF muestra en este experimento *in vitro* un actividad aumentada 10 veces.

Experimento de necrosis tumoral *in vivo*

Grupo	n	Diámetro tumoral		Necrosis		
		d0	d4	macroscópica*	<5%	microscópica** >10%
PBS	6	5,2+1	7,4+0,5	1	2	0
rhTNF	7	5,2+0,9	6,6+1,7	3	6	1
scTNF	7	5,9+0,5	7,3+0,3	5	0	7

\* = necrosis superficial claramente distinguible macroscópicamente

\*\* = necrosis hemorrágica central en el estudio microscópico, <5% o >10% del tejido tumoral

Conclusión:

5 Tras 4 días de tratamiento con dosis individuales, no se estableció ninguna diferencia en el tamaño tumoral (véase una visión general de TNF como producto terapéutico antitumoral por ejemplo en Eggermont *et al*, Lancet Oncol. 4.429 (2003)).

10 rhTNF indujo una pequeña necrosis hemorrágica (<5% del área tumoral) , macroscópicamente sólo puede verse en 3/7 de los animales.

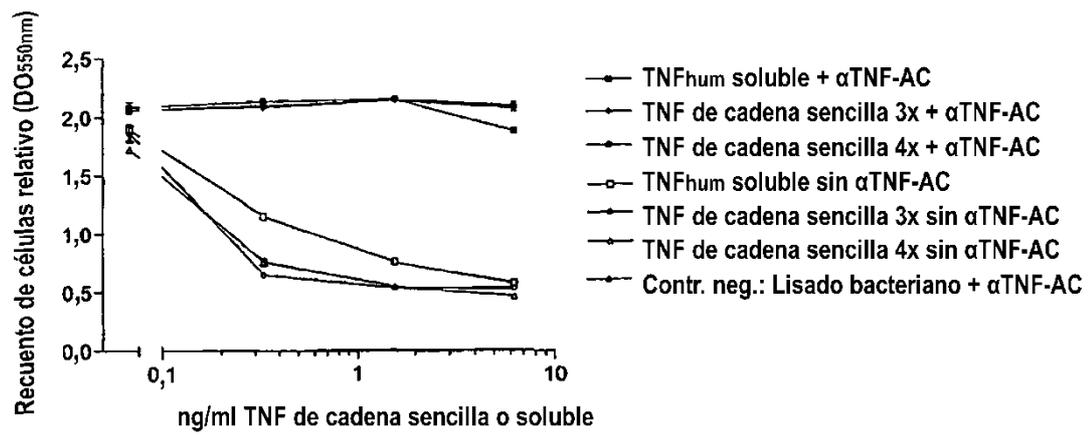
10 scTNF indujo una mayor necrosis hemorrágica (> 10% del área tumoral) en todos los tumores (7/7), pueden observarse macroscópicamente 5/7 de éstos.

15 scTNF >> rhTNF con respecto a la citotoxicidad tumoral *in vitro* y la inducción de necrosis.

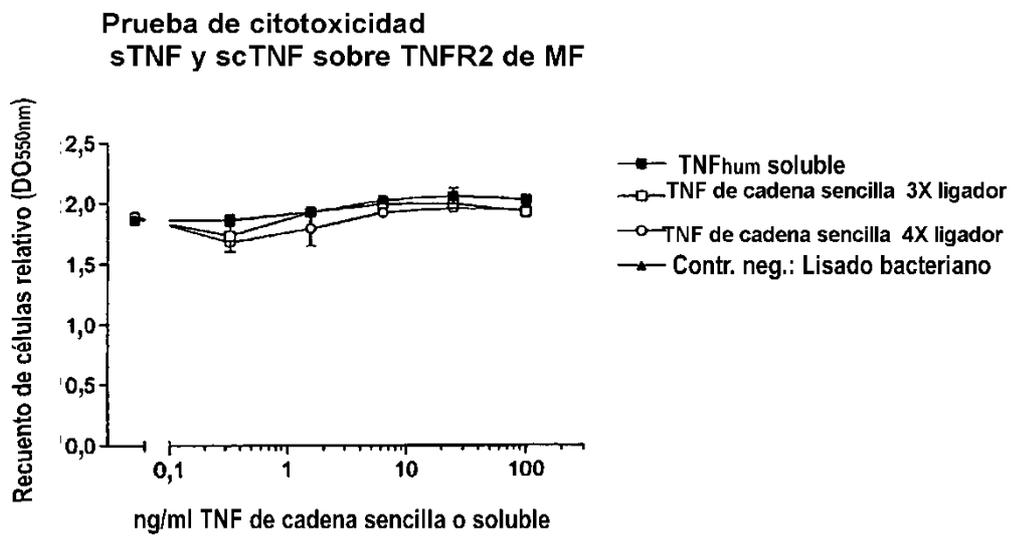
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la depleción y/o eliminación extracorporal de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) de la sangre o fracciones sanguíneas, que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) eventualmente, separar la sangre en una o varias fracciones con componentes sólidos y/o líquidos;
- b) unir la sangre o las fracciones sanguíneas a una partícula o superficie acoplada con un polipéptido, comprendiendo el polipéptido por lo menos tres componentes A y por lo menos dos componentes B, siendo cada componente A un monómero de TNF o un fragmento y/o una variante del mismo, que presenta una propiedad de unión y trimerización, y siendo cada componente B un ligante peptídico, y
- 15 c) separar el TNFR unido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los componentes A son idénticos o diferentes.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los componentes A proceden del mismo organismo o de organismos diferentes.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los componentes B enlazan, respectivamente, dos de dichos por lo menos tres componentes A entre sí.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de los componentes B presenta la secuencia de aminoácidos (GGGS)<sub>3</sub> o (GGGS)<sub>4</sub>.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los componentes A y los componentes B forman una estructura proteica trimérica.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los componentes A y los componentes B forman una estructura proteica homotrimérica.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que los componentes A y los componentes B forman una estructura proteica heterotrimérica.
- 35 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los componentes B son idénticos o diferentes.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los componentes B proceden del mismo organismo o de organismos diferentes.
- 40 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido presenta una secuencia de etiqueta, preferentemente N-terminal, en particular una secuencia de etiqueta de His o una secuencia de etiqueta Flag.
- 45 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido presenta una secuencia peptídica líder, preferentemente N-terminal.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido contiene por lo menos un componente C adicional, que es un fragmento de anticuerpo u otra proteína o péptido, que reconoce selectivamente una molécula diana específica sobre una superficie celular.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el componente C es un fragmento de anticuerpo de un mamífero, en particular de origen murino o humano, o un fragmento de anticuerpo humanizado.
- 55 15. Procedimiento según la reivindicación 13 o 14, en el que el fragmento de anticuerpo puede estar presente en diferentes formatos de anticuerpo, por ejemplo como scFv, en particular scFv40.
- 60 16. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el componente C es una proteína o un péptido con especificidad para una molécula de la superficie celular, en particular un receptor de citocinas, un receptor de factor de crecimiento, una integrina o una molécula de adhesión celular.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el receptor de citocinas se selecciona de entre el grupo de la familia de genes de TNFR.

**Prueba de citotoxicidad  
sTNF y scTNF con Ac neutralizante**

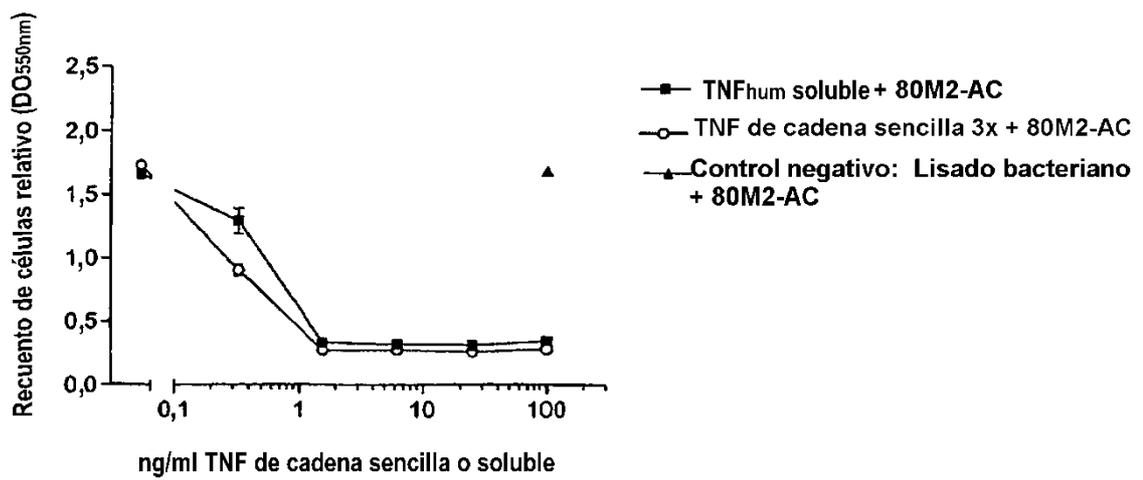


**Figura 1**



**Figura 2**

**Prueba de citotoxicidad  
sTNF y scTNF sobre TNFR2 de MF + 80M2**



**Figura 3**

Prueba de estabilidad con MF – recién valorado

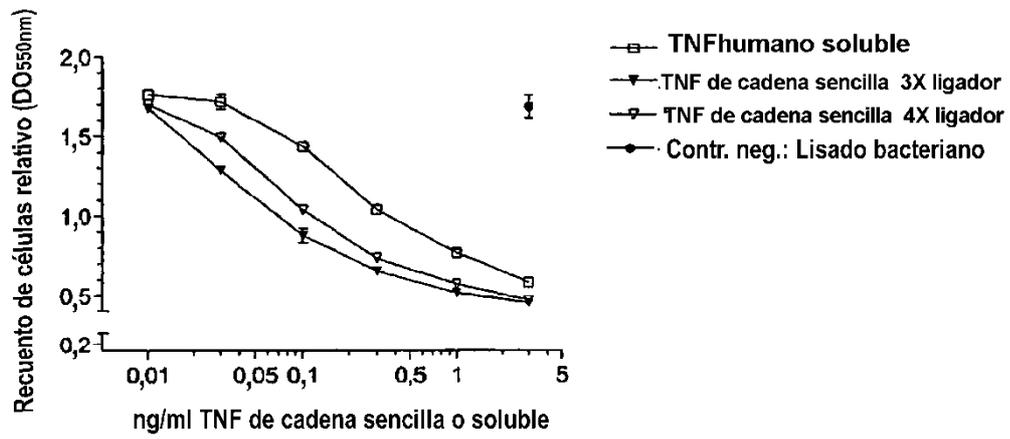


Figura 4

Prueba de estabilidad con MF-incubado 8 días

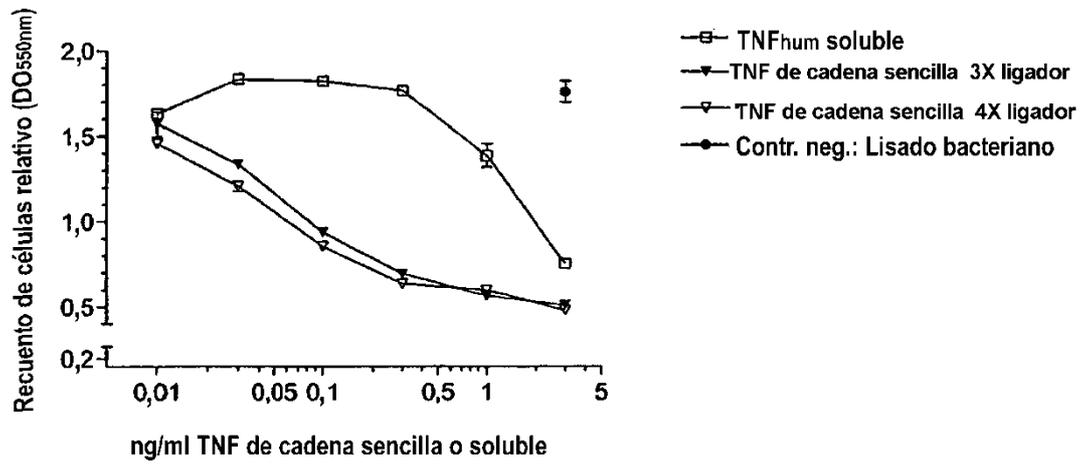


Figura 5

Prueba de estabilidad con MF-incubado 14 días

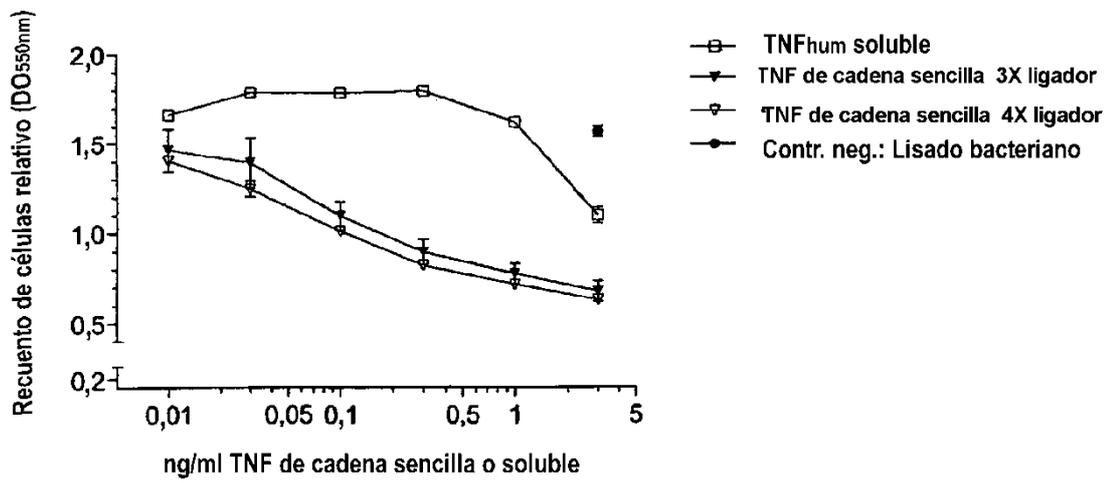


Figura 6

Prueba de estabilidad con Kym 1-recién valorado

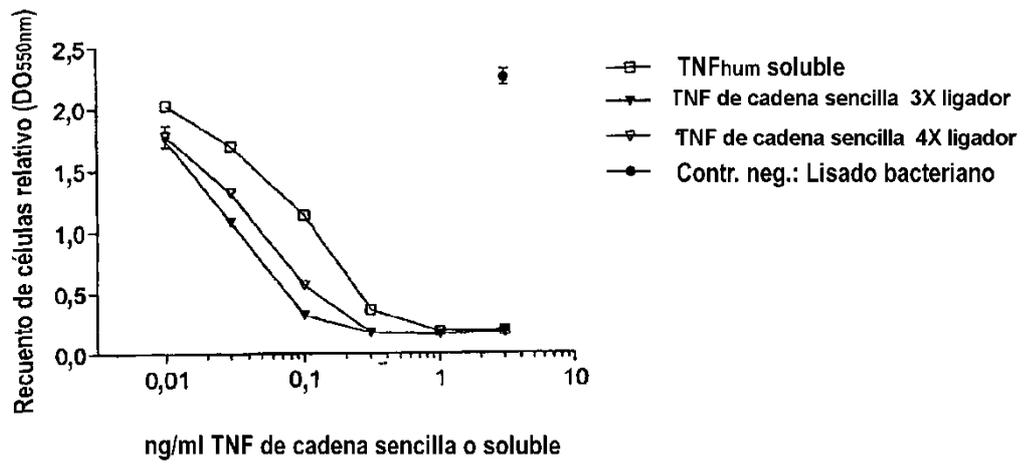


Figura 7

Prueba de estabilidad con Kym1-incubado 16 días

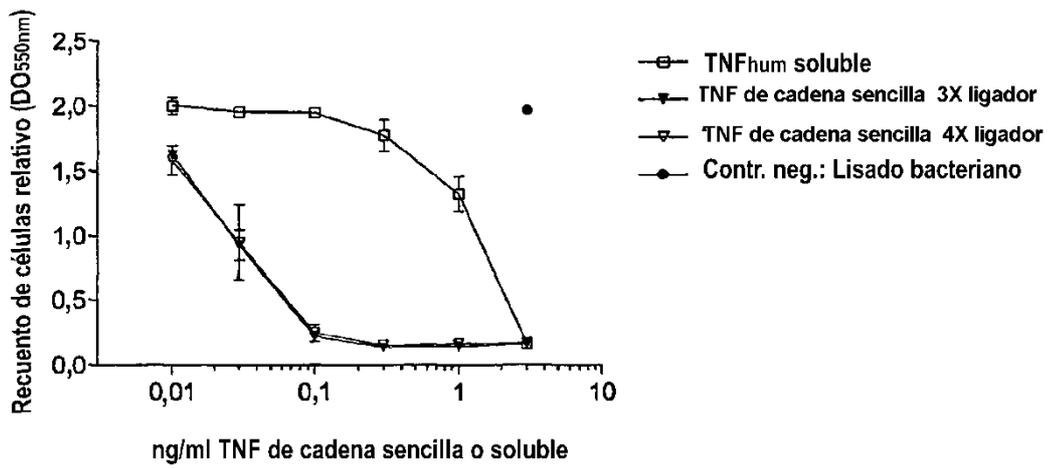
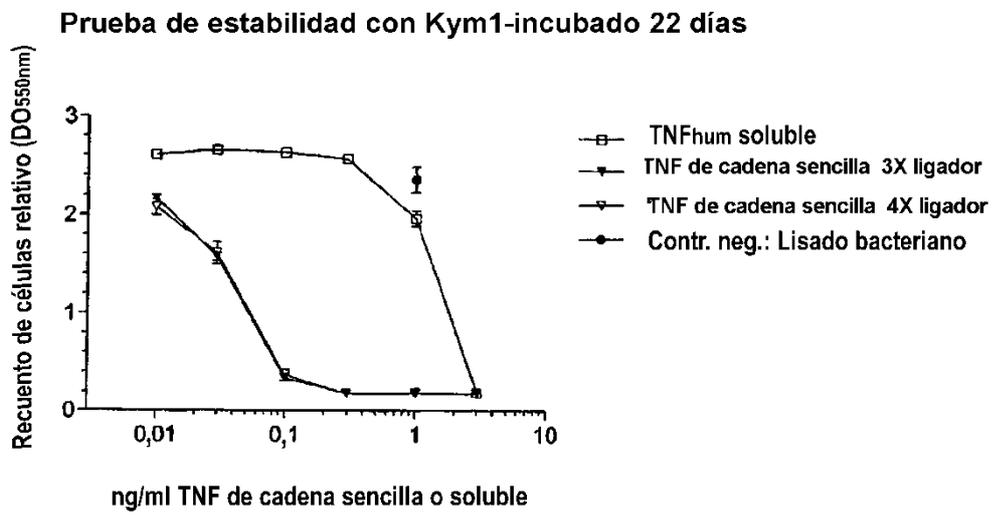


Figura 8



**Figura 9**

Prueba de estabilidad con Kym1-valorado a partir de disolución madre

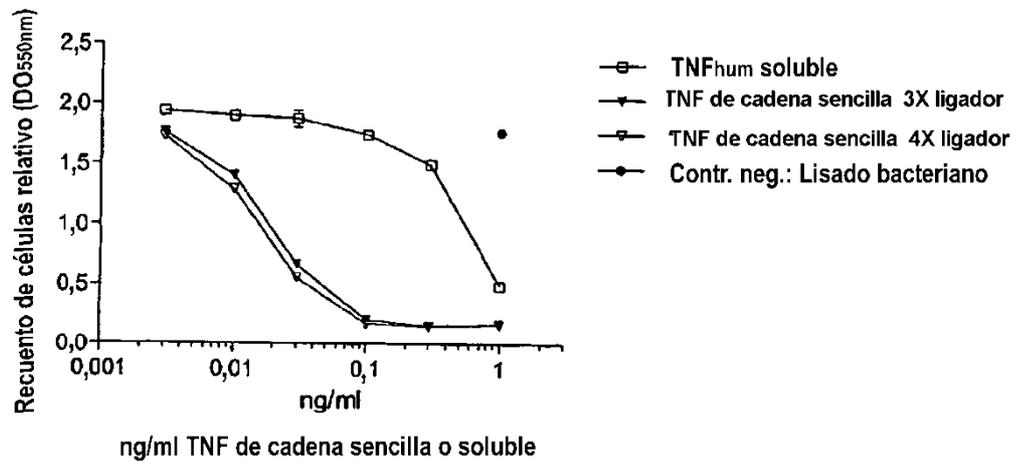
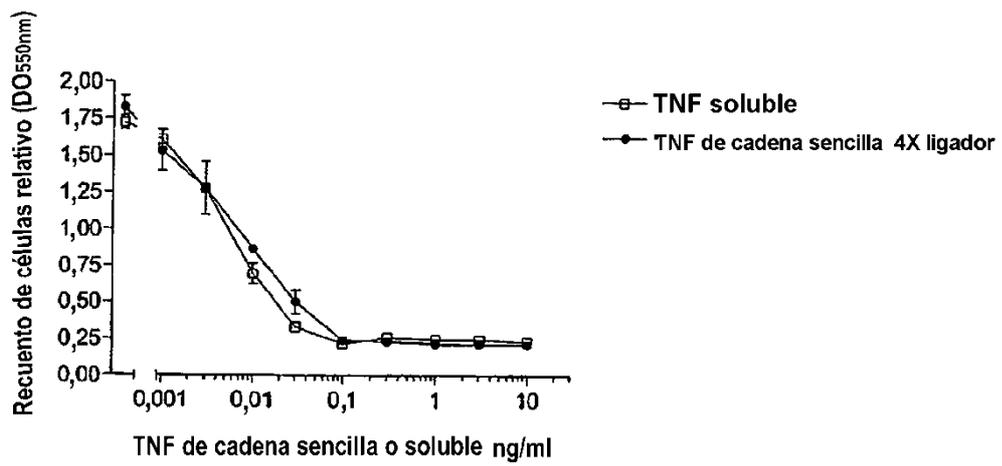


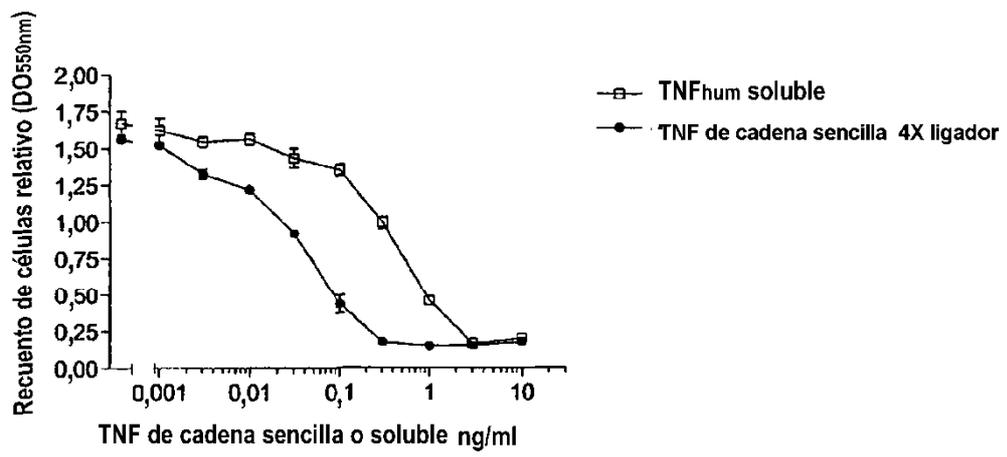
Figura 10

**Prueba de estabilidad con suero humano**  
**Estabilidad en suero-recién valorado**



**Figura 11**

**Prueba de estabilidad con suero humano**  
**Estabilidad en suero-8 días**



**Figura 12**

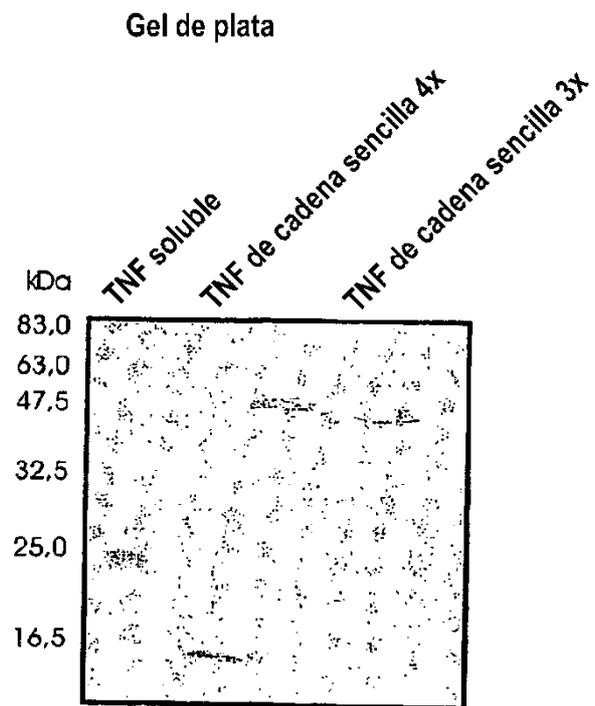


Figura 13

Inmunotransferencia de tipo Western

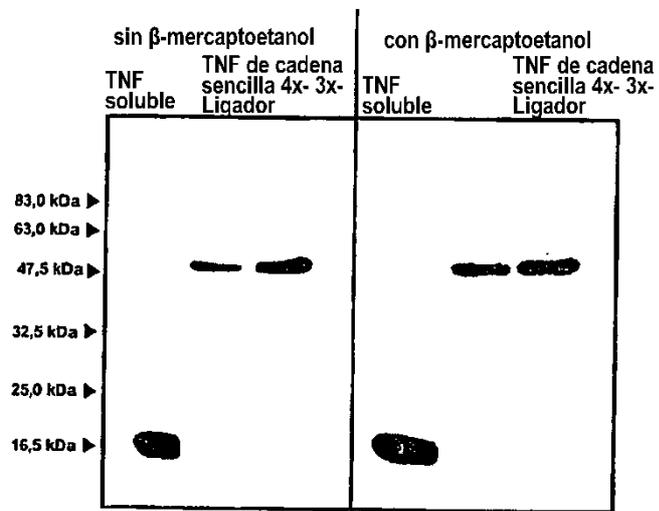


Figura 14

Ensayo de degradación de IκB

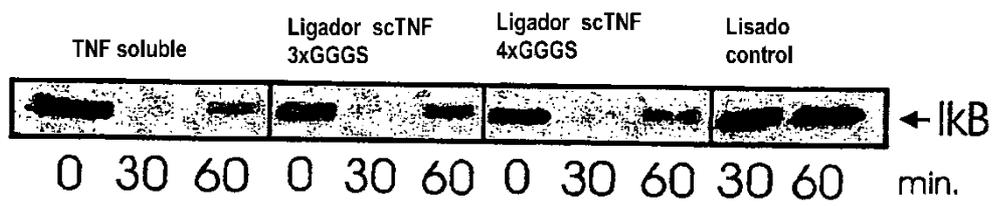


Figura 15

Ensayo de JNK

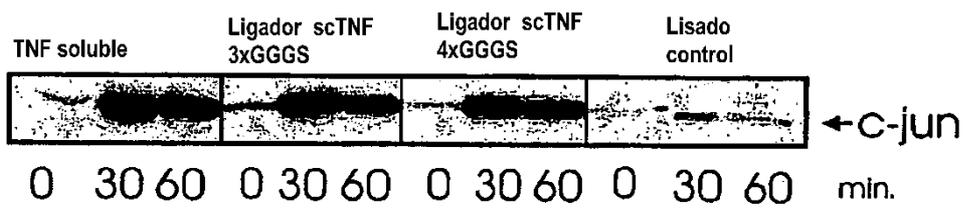


Figura 16

Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

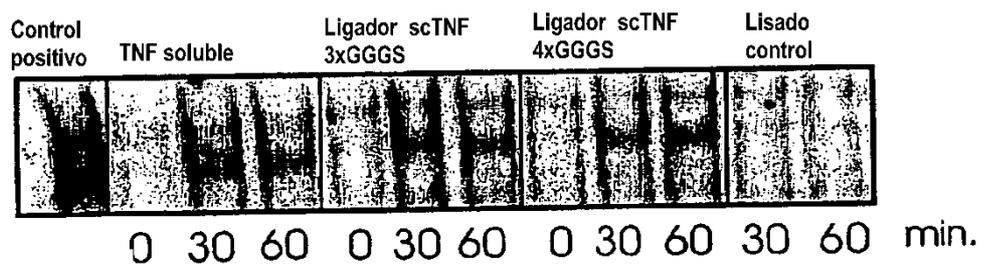


Figura 17

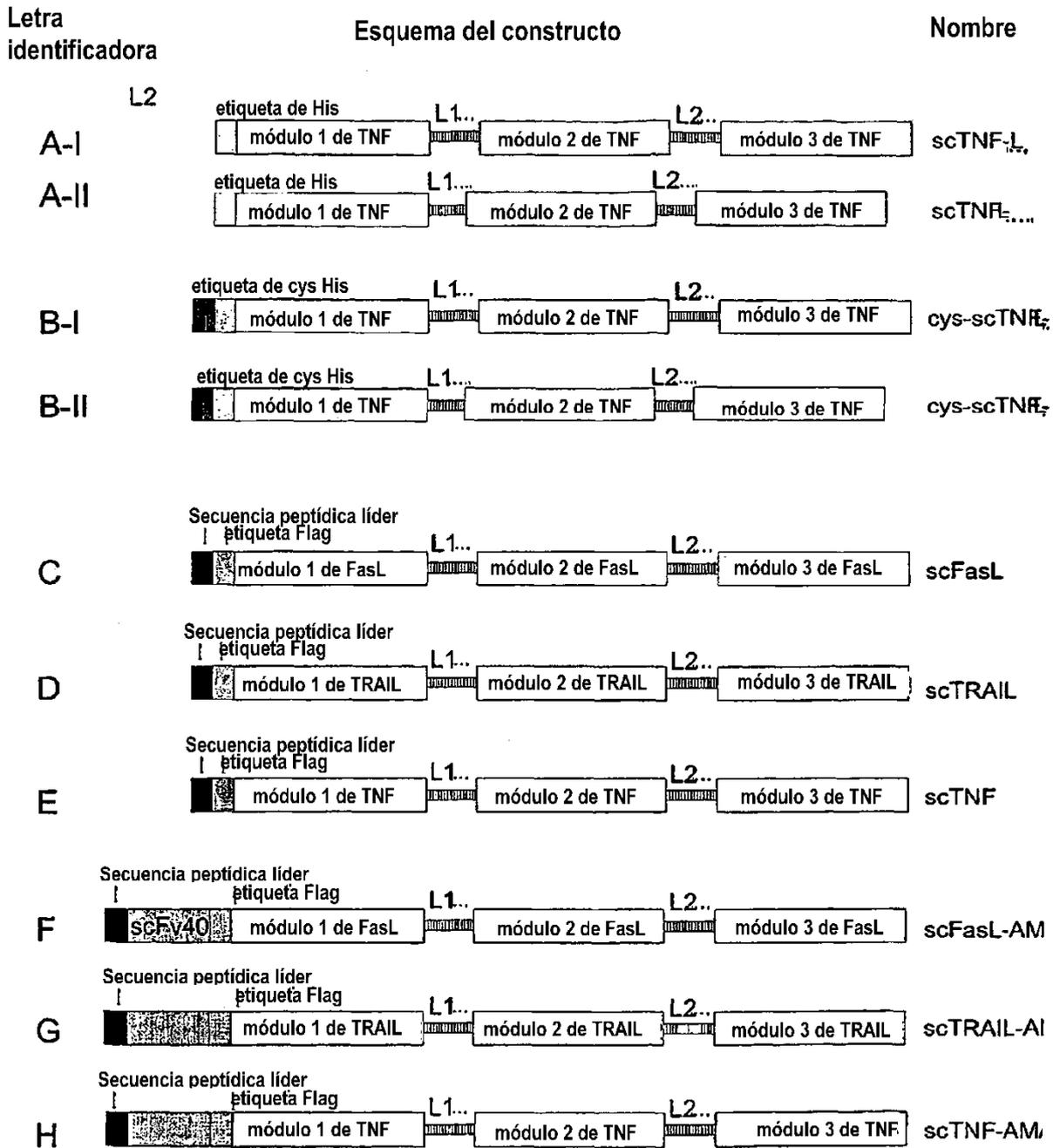


Figura 18

Figura 19

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scTNF-Lcorto  
Construcoto A-II

1	ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCA	GCG	TCG	TCT	45
1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	A	S	S	15
46	TCT	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	GCA	90
16	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	30
91	AAC	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	GCT	135
31	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	45
136	AAC	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	CTG	180
46	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	60
181	GTT	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	CTG	225
61	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	75
226	TTC	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	CAC	270
76	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	90
271	ACC	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	CTG	315
91	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	105
316	CTG	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	GGT	360
106	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	120
361	GCT	GAA	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	GTT	405
121	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	135
406	TTT	CAA	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	CGT	450
136	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	150
451	CCG	GAC	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	TTC	GGT	495
151	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	165
496	ATC	ATC	GCT	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	540
166	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	180
541	TCC	TCT	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	585
181	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	195
586	GCA	AAC	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	630
196	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	210
631	GCT	AAC	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	675
211	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	225
676	CTG	GTT	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	720
226	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	240
721	CTG	TTC	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	765
241	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	255
766	CAC	ACC	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	810
256	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	270
811	CTG	CTG	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	855
271	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	285

Continuación de la figura 19

856	GGT	GCT	GAA	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	900
286	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	300
901	GTT	TTT	CAA	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	945
301	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	315
946	CGT	CCG	GAC	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	TTC	990
316	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	330
991	GGT	ATC	ATC	GCT	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	1035
331	G	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	345
1036	GGA	TCC	TCT	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	1080
346	G	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	360
1081	GTT	GCA	AAC	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	1125
361	V	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	375
1126	CGT	GCT	AAC	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	1170
376	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	390
1171	CAG	CTG	GTT	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	1215
391	Q	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	405
1216	GTT	CTG	TTC	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	1260
406	V	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	420
1261	ACC	CAC	ACC	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	1305
421	T	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	435
1306	AAC	CTG	CTG	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	1350
436	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	450
1351	GAA	GGT	GCT	GAA	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	1395
451	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	465
1396	GGC	GTT	TTT	CAA	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	1440
466	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	480
1441	AAC	CGT	CCG	GAC	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	1485
481	N	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	495
1486	TTC	GGT	ATC	ATC	GCT	CTG	TGA									1506
496	F	G	I	I	A	L	*									501

Figura 20

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de  
scTNF-Lcorto  
Construceto B-II

1	ATG GGA GAG CTC ATC GAA GGT CGC TGC GCC GGT GGA TCT GGT CAT	45
1	M G E L I E G R C A G G S G H	15
46	CAT CAT CAC CAT CAC GGC TCA GAC GGA GCG TCG TCT TCT TCT CGT	90
16	H H H H H G S D G A S S S S R	30
91	ACC CCG TCT GAC AAA CCG GTT GCT CAC GTT GTT GCA AAC CCG CAG	135
31	T P S D K P V A H V V A N P Q	45
136	GCT GAA GGT CAA CTG CAA TGG CTG AAC CGT CGT GCT AAC GCT CTG	180
46	A E G Q L Q W L N R R A N A L	60
181	CTG GCT AAC GGT GTT GAA CTG CGT GAC AAC CAG CTG GTT GTT CCG	225
61	L A N G V E L R D N Q L V V P	75
226	TCT GAA GGC CTG TAC CTG ATC TAC TCC CAG GTT CTG TTC AAA GGC	270
76	S E G L Y L I Y S Q V L F K G	90
271	CAG GGC TGC CCG TCC ACC CAC GTT CTG CTG ACC CAC ACC ATC TCT	315
91	Q G C P S T H V L L T H T I S	105
316	CGT ATC GCT GTT TCC TAC CAG ACC AAA GTA AAC CTG CTG TCT GCA	360
106	R I A V S Y Q T K V N L L S A	120
361	ATC AAA TCT CCG TGC CAG CGT GAA ACC CCG GAA GGT GCT GAA GCT	405
121	I K S P C Q R E T P E G A E A	135
406	AAA CCG TGG TAC GAA CCG ATC TAC CTG GGT GGC GTT TTT CAA CTG	450
136	K P W Y E P I Y L G G V F Q L	150
451	GAG AAA GGT GAC CGT CTG TCT GCA GAA ATT AAC CGT CCG GAC TAC	495
151	E K G D R L S A E I N R P D Y	165
496	CTG GAC TTC GCA GAA TCT GGT CAG GTT TAC TTC GGT ATC ATC GCT	540
166	L D F A E S G Q V Y F G I I A	180
541	CTG GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGA TCC TCT TCT	585
181	L G G G S G G G S G G G S S S	195
586	CGT ACC CCG TCT GAC AAA CCG GTT GCT CAC GTT GTT GCA AAC CCG	630
196	R T P S D K P V A H V V A N P	210
631	CAG GCT GAA GGT CAA CTG CAA TGG CTG AAC CGT CGT GCT AAC GCT	675
211	Q A E G Q L Q W L N R R A N A	225
676	CTG CTG GCT AAC GGT GTT GAA CTG CGT GAC AAC CAG CTG GTT GTT	720
226	L L A N G V E L R D N Q L V V	240
721	CCG TCT GAA GGC CTG TAC CTG ATC TAC TCC CAG GTT CTG TTC AAA	765
241	P S E G L Y L I Y S Q V L F K	255
766	GGC CAG GGC TGC CCG TCC ACC CAC GTT CTG CTG ACC CAC ACC ATC	810
256	G Q G C P S T H V L L T H T I	270

Continuación de la figura 20

811	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	CTG	CTG	TCT	855
271	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	285
856	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	GGT	GCT	GAA	900
286	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	300
901	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	GTT	TTT	CAA	945
301	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	Q	315
946	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	CGT	CCG	GAC	990
316	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D	330
991	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	TTC	GGT	ATC	ATC	1035
331	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	I	345
1036	GCT	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCC	TCT	1080
346	A	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	S	360
1081	TCT	CGT	ACC	CCG	TCT	GAC	AAA	CCG	GTT	GCT	CAC	GTT	GTT	GCA	AAC	1125
361	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	375
1126	CCG	CAG	GCT	GAA	GGT	CAA	CTG	CAA	TGG	CTG	AAC	CGT	CGT	GCT	AAC	1170
376	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	390
1171	GCT	CTG	CTG	GCT	AAC	GGT	GTT	GAA	CTG	CGT	GAC	AAC	CAG	CTG	GTT	1215
391	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	405
1216	GTT	CCG	TCT	GAA	GGC	CTG	TAC	CTG	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT	CTG	TTC	1260
406	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	420
1261	AAA	GGC	CAG	GGC	TGC	CCG	TCC	ACC	CAC	GTT	CTG	CTG	ACC	CAC	ACC	1305
421	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	435
1306	ATC	TCT	CGT	ATC	GCT	GTT	TCC	TAC	CAG	ACC	AAA	GTA	AAC	CTG	CTG	1350
436	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	450
1351	TCT	GCA	ATC	AAA	TCT	CCG	TGC	CAG	CGT	GAA	ACC	CCG	GAA	GGT	GCT	1395
451	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	465
1396	GAA	GCT	AAA	CCG	TGG	TAC	GAA	CCG	ATC	TAC	CTG	GGT	GGC	GTT	TTT	1440
466	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	480
1441	CAA	CTG	GAG	AAA	GGT	GAC	CGT	CTG	TCT	GCA	GAA	ATT	AAC	CGT	CCG	1485
481	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	495
1486	GAC	TAC	CTG	GAC	TTC	GCA	GAA	TCT	GGT	CAG	GTT	TAC	TTC	GGT	ATC	1530
496	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	510
1531	ATC	GCT	CTG	TGA												1542
511	I	A	L	*												513

Figura 21

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scFasL  
 Constructo C

1	ATG	GCT	ATC	ATC	TAC	CTC	ATC	CTC	CTG	TTC	ACC	GCT	GTG	CGG	GGC	45
1	M	A	I	I	Y	L	I	L	L	F	T	A	V	R	G	15
46	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	GAA	TTC	ACG	CGT	90
16	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	E	F	T	R	30
91	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	135
31	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	S	45
136	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	180
46	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	60
181	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	225
61	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	75
226	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	270
76	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	90
271	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	315
91	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	105
316	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	360
106	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	120
361	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	405
121	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	135
406	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	450
136	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	150
451	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	495
151	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	165
496	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	540
166	T	F	F	G	L	Y	K	L	G	G	G	S	G	G	G	180
541	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	585
181	S	G	G	G	S	G	G	G	S	E	K	K	E	L	R	195
586	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	630
196	K	V	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	210
631	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	675
211	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	225
676	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	720
226	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	240
721	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	765
241	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	255

Continuación de la figura 21

766	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	810
256	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	270
811	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	855
271	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	285
856	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	900
286	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	300
901	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	945
301	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	315
946	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	990
316	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	330
991	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1035
331	K	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	345
1036	GGC	GGA	TCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	1080
346	G	G	S	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	360
1081	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	1125
361	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	375
1126	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	1170
376	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	390
1171	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	1215
391	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	405
1216	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	1260
406	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	420
1261	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	1305
421	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	435
1306	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	1350
436	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	450
1351	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	1395
451	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	465
1396	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	1440
466	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	480
1441	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	TGA				1476
481	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	*				491

Figura 22

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scTRAIL

Construeto D

1	ATG GCT ATC ATC TAC CTC ATC CTC CTG TTC ACC GCT GTG CGG GGC	45
1	M A I I Y L I L L F T A V R G	15
46	GCG GCC GCG GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA GAA TTC GGA ACC	90
16	A A A D Y K D D D D K E F G T	30
91	TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA GTT CAA GAA AAG CAA CAA AAT ATT	135
31	S E E T I S T V Q E K Q Q N I	45
136	TCT CCC CTA GTG AGA GAA AGA GGT CCT CAG AGA GTA GCA GCT CAC	180
46	S P L V R E R G P Q R V A A H	60
181	ATA ACT GGG ACC AGA GGA AGA AGC AAC ACA TTG TCT TCT CCA AAC	225
61	I T G T R G R S N T L S S P N	75
226	TCC AAG AAT GAA AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC TCC TGG GAA	270
76	S K N E K A L G R K I N S W E	90
271	TCA TCA AGG AGT GGG CAT TCA TTC CTG AGC AAC TTG CAC TTG AGG	315
91	S S R S G H S F L S N L H L R	105
316	AAT GGT GAA CTG GTC ATC CAT GAA AAA GGG TTT TAC TAC ATC TAT	360
106	N G E L V I H E K G F Y Y I Y	120
361	TCC CAA ACA TAC TTT CGA TTT CAG GAG GAA ATA AAA GAA AAC ACA	405
121	S Q T Y F R F Q E E I K E N T	135
406	AAG AAC GAC AAA CAA ATG GTC CAA TAT ATT TAC AAA TAC ACA AGT	450
136	K N D K Q M V Q Y I Y K Y T S	150
451	TAT CCT GAC CCT ATA TTG TTG ATG AAA AGT GCT AGA AAT AGT TGT	495
151	Y P D P I L L M K S A R N S C	165
496	TGG TCT AAA GAT GCA GAA TAT GGA CTC TAT TCC ATC TAT CAA GGG	540
166	W S K D A E Y G L Y S I Y Q G	180
541	GGA ATA TTT GAG CTT AAG GAA AAT GAC AGA ATT TTT GTT TCT GTA	585
181	G I F E L K E N D R I F V S V	195
586	ACA AAT GAG CAC TTG ATA GAC ATG GAC CAT GAA GCC AGT TTT TTC	630
196	T N E H L I D M D H E A S F F	210
631	GGG GCC TTT TTA GTT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT	675
211	G A F L V G G G G S G G G S G	225
676	GGC GGT TCT GGT GGC GGA TCA ACC TCT GAG GAA ACC ATT TCT ACA	720
226	G G S G G G S T S E E T I S T	240
721	GTT CAA GAA AAG CAA CAA AAT ATT TCT CCC CTA GTG AGA GAA AGA	765
241	V Q E K Q Q N I S P L V R E R	255

Continuación de la figura 22

766	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	810
256	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	270
811	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	855
271	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	285
856	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	900
286	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	300
901	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	945
301	F	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	315
946	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	990
316	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	330
991	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	1035
331	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	345
1036	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	1080
346	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	360
1081	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	1125
361	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	375
1126	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	1170
376	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	390
1171	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	1215
391	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	405
1216	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	GGT	1260
406	M	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	G	420
1261	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCC	1305
421	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	435
1306	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	1350
436	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	450
1351	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	1395
451	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	465
1396	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	1440
466	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	480
1441	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	1485
481	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	495
1486	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	1530
496	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	510
1531	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	1575
511	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	525
1576	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	1620
526	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	540

Continuación de la figura 22

1621	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	1665
541	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	555
1666	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	1710
556	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	R	N	S	570
1711	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	1755
571	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	585
1756	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	1800
586	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	600
1801	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	1845
601	V	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	E	A	S	F	615
1846	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	TGA								1866
616	F	G	A	F	L	V	G	*								622

Figura 23

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scTNF  
Construeto E

1	ATG GCT ATC ATC TAC CTC ATC CTC CTG TTC ACC GCT GTG CGG GGC	45
1	M A I I Y L I L L F T A V R G	15
46	GCG GCC GCG GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA GAA TTC GGA TCA	90
16	A A A D Y K D D D D K E F G S	30
91	TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA	135
31	S S R T P S D K P V A H V V A	45
136	AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC	180
46	N P Q A E G Q L Q W L N R R A	60
181	AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG	225
61	N A L L A N G V E L R D N Q L	75
226	GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC	270
76	V V P S E G L Y L I Y S Q V L	90
271	TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC	315
91	F K G Q G C P S T H V L L T H	105
316	ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC	360
106	T I S R I A V S Y Q T K V N L	120
361	CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG	405
121	L S A I K S P C Q R E T P E G	135
406	GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC	450
136	A E A K P W Y E P I Y L G G V	150
451	TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG	495
151	F Q L E K G D R L S A E I N R	165
496	CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG	540
166	P D Y L D F A E S G Q V Y F G	180
541	ATC ATT GCC CTG GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT	585
181	I I A L G G G S G G G S G G G	195
586	TCT GGT GGC GGA TCA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT	630
196	S G G G S S S S R T P S D K P	210
631	GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG	675
211	V A H V V A N P Q A E G Q L Q	225
676	TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG	720
226	W L N R R A N A L L A N G V E	240
721	CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC	765
241	L R D N Q L V V P S E G L Y L	255

Continuación de la figura 23

766	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	810
256	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	270
811	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	855
271	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	285
856	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	900
286	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	300
901	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	945
301	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	315
946	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	990
316	I	Y	L	G	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	330
991	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	1035
331	S	A	E	I	N	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	345
1036	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1080
346	G	Q	V	Y	F	G	I	I	A	L	G	G	G	S	G	360
1081	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	TCA	TCT	TCT	CGA	1125
361	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	S	S	S	R	375
1126	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	1170
376	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	Q	390
1171	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	1215
391	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	L	405
1216	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	1260
406	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	420
1261	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	1305
421	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	435
1306	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	1350
436	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	450
1351	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	1395
451	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	465
1396	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	1440
466	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	480
1441	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG	1485
481	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	Q	L	495
1486	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	1530
496	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D	Y	510
1531	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC	ATT	GCC	1575
511	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	I	A	525
1576	CTG	TGA														1581
526	L	*														526

Figura 24

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scFasL-  
AMAIZe

Construeto F

1	ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT	45
1	M D W T W R V F C L L A V A P	15
46	GGG GCC CAC AGC CAG GTA CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC ATG	90
16	G A H S Q V Q L V Q S G G G M	30
91	GTA GAG CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	135
31	V E P G G S L R L S C A A S G	45
136	TTC ACT TTC AGT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA	180
46	F T F S N A W M S W V R Q A P	60
181	GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATA AAA AGC AAA GCT GGT	225
61	G K G L E W V G R I K S K A G	75
226	GGT GGG ACA GCA GAG TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC	270
76	G G T A E Y' A A P V K G R F T	90
271	ATC TCA AGA GAT GAT TCA CAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC	315
91	I S R D D S Q N T L Y L Q M N	105
316	AGC CTG AAA ACC GAC GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA CAT	360
106	S L K T D D T A V Y Y C T T H	120
361	GTC TAC GGT GCC CCC CGG AAC TGG GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC	405
121	V Y G A P R N W G Q G S L V T	135
406	GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA	450
136	V S S A S T K G P K L E E G E	150
451	TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG TCT GTG TTG ACT CAG CCG CCC TCA	495
151	F S E A R V Q S V L T Q P P S	165
496	GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA	540
166	V S A A P G Q K V T I S C S G	180
541	AGC AGC TCC AAC ATT GGA AAT AAT TAT GTC TCC TGG TAC GTT CAA	585
181	S S S N I G N N Y V S W Y V Q	195
586	CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT AAT AAG	630
196	L P G T A P K L L I Y D N N K	210
631	CGA TTC TCA GGA GTT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC	675
211	R F S G V P D R F S G S K S G	225
676	ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGG CTC CAG ACT GGG GAC GAG	720
226	T S A T L G I T G L Q T G D E	240
721	GCC GAT TAT TAC TGC GGA GCA TGG GAT GGC AGC CTG CGT GAA GCG	765
241	A D Y Y C G A W D G S L R E A	255

Continuación de la figura 24

766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	gcg	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	ACG	CGT	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	900
286	E	F	T	R	E	K	K	E	L	R	K	V	A	H	L	300
901	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	945
301	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	W	E	D	315
946	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	990
316	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	330
991	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	1035
331	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	345
1036	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	1080
346	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	L	S	H	360
1081	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	1125
361	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	375
1126	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	1170
376	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	390
1171	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	1215
391	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	T	S	A	405
1216	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	1260
406	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	V	N	F	420
1261	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	1305
421	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	G	G	G	435
1306	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	GAA	AAA	1350
436	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	E	K	450
1351	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	1395
451	K	E	L	R	K	V	A	H	L	T	G	K	S	N	S	465
1396	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	1440
466	R	S	M	P	L	E	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	480
1441	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	1485
481	L	S	G	V	K	Y	K	K	G	G	L	V	I	N	E	495
1486	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	1530
496	T	G	L	Y	F	V	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	510
1531	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	1575
511	S	C	N	N	L	P	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	525
1576	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	1620
526	S	K	Y	P	Q	D	L	V	M	M	E	G	K	M	M	540

Continuación de la figura 24

1621	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	1665
541	S	Y	C	T	T	G	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	555
1666	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	1710
556	G	A	V	F	N	L	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	570
1711	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	1755
571	V	S	E	L	S	L	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	585
1756	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1800
586	F	G	L	Y	K	L	G	G	G	S	G	G	G	S	G	600
1801	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCC	GAA	AAA	AAG	GAG	CTG	AGG	AAA	GTG	1845
601	G	G	S	G	G	G	S	E	K	K	E	L	R	K	V	615
1846	GCC	CAT	TTA	ACA	GGC	AAG	TCC	AAC	TCA	AGG	TCC	ATG	CCT	CTG	GAA	1890
616	A	H	L	T	G	K	S	N	S	R	S	M	P	L	E	630
1891	TGG	GAA	GAC	ACC	TAT	GGA	ATT	GTC	CTG	CTT	TCT	GGA	GTG	AAG	TAT	1935
631	W	E	D	T	Y	G	I	V	L	L	S	G	V	K	Y	645
1936	AAG	AAG	GGT	GGC	CTT	GTG	ATC	AAT	GAA	ACT	GGG	CTG	TAC	TTT	GTA	1980
646	K	K	G	G	L	V	I	N	E	T	G	L	Y	F	V	660
1981	TAT	TCC	AAA	GTA	TAC	TTC	CGG	GGT	CAA	TCT	TGC	AAC	AAC	CTG	CCC	2025
661	Y	S	K	V	Y	F	R	G	Q	S	C	N	N	L	P	675
2026	CTG	AGC	CAC	AAG	GTC	TAC	ATG	AGG	AAC	TCT	AAG	TAT	CCC	CAG	GAT	2070
676	L	S	H	K	V	Y	M	R	N	S	K	Y	P	Q	D	690
2071	CTG	GTG	ATG	ATG	GAG	GGG	AAG	ATG	ATG	AGC	TAC	TGC	ACT	ACT	GGG	2115
691	L	V	M	M	E	G	K	M	M	S	Y	C	T	T	G	705
2116	CAG	ATG	TGG	GCC	CGC	AGC	AGC	TAC	CTG	GGG	GCA	GTG	TTC	AAT	CTT	2160
706	Q	M	W	A	R	S	S	Y	L	G	A	V	F	N	L	720
2161	ACC	AGT	GCT	GAT	CAT	TTA	TAT	GTC	AAC	GTA	TCT	GAG	CTC	TCT	CTG	2205
721	T	S	A	D	H	L	Y	V	N	V	S	E	L	S	L	735
2206	GTC	AAT	TTT	GAG	GAA	TCT	CAG	ACG	TTT	TTC	GGC	TTA	TAT	AAG	CTC	2250
736	V	N	F	E	E	S	Q	T	F	F	G	L	Y	K	L	750
2251	TGA															2253
751	*															751

Figura 25

**Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente de scTRAIL-AMAIZe  
Construceto G**

1	ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT	45
1	M D W T W R V F C L L A V A P	15
46	GGG GCC CAC AGC CAG GTA CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC ATG	90
16	G A H S Q V Q L V Q S G G G M	30
91	GTA GAG CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	135
31	V E P G G S L R L S C A A S G	45
136	TTC ACT TTC AGT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA	180
46	F T F S N A W M S W V R Q A P	60
181	GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATA AAA AGC AAA GCT GGT	225
61	G K G L E W V G R I K S K A G	75
226	GGT GGG ACA GCA GAG TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC	270
76	G G T A E Y A A P V K G R F T	90
271	ATC TCA AGA GAT GAT TCA CAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC	315
91	I S R D D S Q N T L Y L Q M N	105
316	AGC CTG AAA ACC GAC GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA CAT	360
106	S L K T D D T A V Y Y C T T H	120
361	GTC TAC GGT GCC CCC CGG AAC TGG GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC	405
121	V Y G A P R N W G Q G S L V T	135
406	GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA	450
136	V S S A S T K G P K L E E G E	150
451	TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG TCT GTG TTG ACT CAG CCG CCC TCA	495
151	F S E A R V Q S V L T Q P P S	165
496	GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA	540
166	V S A A P G Q K V T I S C S G	180
541	AGC AGC TCC AAC ATT GGA AAT AAT TAT GTC TCC TGG TAC GTT CAA	585
181	S S S N I G N N Y V S W Y V Q	195
586	CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT AAT AAG	630
196	L P G T A P K L L I Y D N N K	210
631	CGA TTC TCA GGA GTT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC	675
211	R F S G V P D R F S G S K S G	225
676	ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGG CTC CAG ACT GGG GAC GAG	720
226	T S A T L G I T G L Q T G D E	240

Continuación de la figura 25

721	GCC	GAT	TAT	TAC	TGC	GGA	GCA	TGG	GAT	GGC	AGC	CTG	CGT	GAA	GCG	765
241	A	D	Y	Y	C	G	A	W	D	G	S	L	R	E	A	255
766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	GGA	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	900
286	E	F	G	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	K	300
901	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	945
301	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	R	315
946	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	990
316	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	L	330
991	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	1035
331	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	I	345
1036	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	1080
346	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	N	360
1081	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	1125
361	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	F	375
1126	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	1170
376	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	I	390
1171	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	1215
391	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	405
1216	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	1260
406	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	A	420
1261	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	1305
421	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	S	435
1306	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	1350
436	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	I	450
1351	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	1395
451	F	V	S	V	T	N	E	R	L	I	D	M	D	H	E	465
1396	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	1440
466	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	G	G	G	S	G	480
1441	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	ACC	TCT	GAG	GAA	1485
481	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	T	S	E	E	495
1486	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	1530
496	T	I	S	T	V	Q	E	K	Q	Q	N	I	S	P	L	510
1531	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	1575
511	V	R	E	R	G	P	Q	R	V	A	A	H	I	T	G	525

## Continuación de la figura 25

1576	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	1620
526	T	R	G	R	S	N	T	L	S	S	P	N	S	K	N	540
1621	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	1665
541	E	K	A	L	G	R	K	I	N	S	W	E	S	S	R	555
1666	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	1710
556	S	G	H	S	F	L	S	N	L	H	L	R	N	G	E	570
1711	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	1755
571	L	V	I	H	E	K	G	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	585
1756	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	1800
586	Y	F	R	F	Q	E	E	I	K	E	N	T	K	N	D	600
1801	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	1845
601	K	Q	M	V	Q	Y	I	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	615
1846	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	1890
616	P	I	L	L	M	K	S	A	R	N	S	C	W	S	K	630
1891	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	1935
631	D	A	E	Y	G	L	Y	S	I	Y	Q	G	G	I	F	645
1936	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	1980
646	E	L	K	E	N	D	R	I	F	V	S	V	T	N	E	660
1981	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	2025
661	H	L	I	D	M	D	H	E	A	S	F	F	G	A	F	675
2026	TTA	GTT	GGC	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	2070
676	L	V	G	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	690
2071	GGT	GGC	GGA	TCC	ACC	TCT	GAG	GAA	ACC	ATT	TCT	ACA	GTT	CAA	GAA	2115
691	G	G	G	S	T	S	E	E	T	I	S	T	V	Q	E	705
2116	AAG	CAA	CAA	AAT	ATT	TCT	CCC	CTA	GTG	AGA	GAA	AGA	GGT	CCT	CAG	2160
706	K	Q	Q	N	I	S	P	L	V	R	E	R	G	P	Q	720
2161	AGA	GTA	GCA	GCT	CAC	ATA	ACT	GGG	ACC	AGA	GGA	AGA	AGC	AAC	ACA	2205
721	R	V	A	A	H	I	T	G	T	R	G	R	S	N	T	735
2206	TTG	TCT	TCT	CCA	AAC	TCC	AAG	AAT	GAA	AAG	GCT	CTG	GGC	CGC	AAA	2250
736	L	S	S	P	N	S	K	N	E	K	A	L	G	R	K	750
2251	ATA	AAC	TCC	TGG	GAA	TCA	TCA	AGG	AGT	GGG	CAT	TCA	TTC	CTG	AGC	2295
751	I	N	S	W	E	S	S	R	S	G	H	S	F	L	S	765
2296	AAC	TTG	CAC	TTG	AGG	AAT	GGT	GAA	CTG	GTC	ATC	CAT	GAA	AAA	GGG	2340
766	N	L	H	L	R	N	G	E	L	V	I	H	E	K	G	780
2341	TTT	TAC	TAC	ATC	TAT	TCC	CAA	ACA	TAC	TTT	CGA	TTT	CAG	GAG	GAA	2385
781	F	Y	Y	I	Y	S	Q	T	Y	F	R	F	Q	E	E	795
2386	ATA	AAA	GAA	AAC	ACA	AAG	AAC	GAC	AAA	CAA	ATG	GTC	CAA	TAT	ATT	2430
796	I	K	E	N	T	K	N	D	K	Q	M	V	Q	Y	I	810

Continuación de la figura 25

2431	TAC	AAA	TAC	ACA	AGT	TAT	CCT	GAC	CCT	ATA	TTG	TTG	ATG	AAA	AGT	2475
811	Y	K	Y	T	S	Y	P	D	P	I	L	L	M	K	S	825
2476	GCT	AGA	AAT	AGT	TGT	TGG	TCT	AAA	GAT	GCA	GAA	TAT	GGA	CTC	TAT	2520
826	A	R	N	S	C	W	S	K	D	A	E	Y	G	L	Y	840
2521	TCC	ATC	TAT	CAA	GGG	GGA	ATA	TTT	GAG	CTT	AAG	GAA	AAT	GAC	AGA	2565
841	S	I	Y	Q	G	G	I	F	E	L	K	E	N	D	R	855
2566	ATT	TTT	GTT	TCT	GTA	ACA	AAT	GAG	CAC	TTG	ATA	GAC	ATG	GAC	CAT	2610
856	I	F	V	S	V	T	N	E	H	L	I	D	M	D	H	870
2611	GAA	GCC	AGT	TTT	TTC	GGG	GCC	TTT	TTA	GTT	GGC	TGA				2646
871	E	A	S	F	F	G	A	F	L	V	G	*				881

## Figura 26

Secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos correspondiente  
de scTNF-AMAIZe  
Construeto H

1	ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC GTG GCT CCT	45
1	M D W T W R V F C L L A V A P	15
46	GGG GCC CAC AGC CAG GTA CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC ATG	90
16	G A H S Q V Q L V Q S G G G M	30
91	GTA GAG CCT GGG GGG TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	135
31	V E P G G S L R L S C A A S G	45
136	TTC ACT TTC AGT AAT GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA	180
46	F T F S N A W M S W V R Q A P	60
181	GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATA AAA AGC AAA GCT GGT	225
61	G K G L E W V G R I K S K A G	75
226	GGT GGG ACA GCA GAG TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC	270
76	G G T A E Y A A P V K G R F T	90
271	ATC TCA AGA GAT GAT TCA CAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC	315
91	I S R D D S Q N T L Y L Q M N	105
316	AGC CTG AAA ACC GAC GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA CAT	360
106	S L K T D D T A V Y Y C T T H	120
361	GTC TAC GGT GCC CCC CGG AAC TGG GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC	405
121	V Y G A P R N W G Q G S L V T	135
406	GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA AAG CTT GAA GAA GGT GAA	450
136	V S S A S T K G P K L E E G E	150
451	TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG TCT GTG TTG ACT CAG CCG CCC TCA	495
151	F S E A R V Q S V L T Q P P S	165
496	GTG TCT GCG GCC CCA GGA CAG AAG GTC ACC ATC TCC TGC TCT GGA	540
166	V S A A P G Q K V T I S C S G	180
541	AGC AGC TCC AAC ATT GGA AAT AAT TAT GTC TCC TGG TAC GPT CAA	585
181	S S S N I G N N Y V S W Y V Q	195
586	CTC CCA GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT GAC AAT AAT AAG	630
196	L P G T A P K L L I Y D N N K	210
631	CGA TTC TCA GGA GTT CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC	675
211	R F S G V P D R F S G S K S G	225
676	ACG TCA GCC ACC CTG GGC ATC ACC GGG CTC CAG ACT GGG GAC GAG	720
226	T S A T L G I T G L Q T G D E	240
721	GCC GAT TAT TAC TGC GGA GCA TGG GAT GGC AGC CTG CGT GAA GCG	765
241	A D Y Y C G A W D G S L R E A	255

Continuación de la figura 26

766	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	GTC	ACC	GTC	CTA	GGT	GCG	GCC	GCA	810
256	V	F	G	G	G	T	K	V	T	V	L	G	A	A	A	270
811	GTT	GAG	CTC	GAG	GCG	GCC	GCG	GAT	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAT	AAA	855
271	V	E	L	E	A	A	A	D	Y	K	D	D	D	D	K	285
856	GAA	TTC	GGA	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	900
286	E	F	G	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	300
901	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	945
301	H	V	V	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	315
946	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	990
316	N	R	R	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	330
991	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	1035
331	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	345
1036	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	1080
346	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	360
1081	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	1125
361	L	L	T	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	375
1126	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	1170
376	K	V	N	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	390
1171	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	1215
391	T	P	E	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	405
1216	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	1260
406	L	G	G	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	420
1261	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	1305
421	E	I	N	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	435
1306	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	1350
436	V	Y	F	G	I	I	A	L	G	G	G	S	G	G	G	450
1351	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	1395
451	S	G	G	G	S	G	G	G	S	S	S	S	R	T	P	465
1396	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	1440
466	S	D	K	P	V	A	H	V	V	A	N	P	Q	A	E	480
1441	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	1485
481	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	A	N	A	L	L	A	495
1486	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	1530
496	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	L	V	V	P	S	E	510
1531	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	1575
511	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	L	F	K	G	Q	G	525
1576	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	1620
526	C	P	S	T	H	V	L	L	T	H	T	I	S	R	I	540

Continuación de la figura 26

1621	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	1665
541	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	L	L	S	A	I	K	555
1666	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	1710
556	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	G	A	E	A	K	P	570
1711	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	1755
571	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	V	F	Q	L	E	K	585
1756	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	1800
586	G	D	R	L	S	A	E	I	N	R	P	D	Y	L	D	600
1801	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG	GGT	1845
601	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	G	I	I	A	L	G	615
1846	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGT	TCT	GGT	GGC	GGA	TCA	1890
616	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	G	G	G	S	630
1891	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA	1935
631	S	S	S	R	T	P	S	D	K	P	V	A	H	V	V	645
1936	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG	1980
646	A	N	P	Q	A	E	G	Q	L	Q	W	L	N	R	R	660
1981	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG	2025
661	A	N	A	L	L	A	N	G	V	E	L	R	D	N	Q	675
2026	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC	2070
676	L	V	V	P	S	E	G	L	Y	L	I	Y	S	Q	V	690
2071	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC	2115
691	L	F	K	G	Q	G	C	P	S	T	H	V	L	L	T	705
2116	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC	2160
706	H	T	I	S	R	I	A	V	S	Y	Q	T	K	V	N	720
2161	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG	2205
721	L	L	S	A	I	K	S	P	C	Q	R	E	T	P	E	735
2206	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG	2250
736	G	A	E	A	K	P	W	Y	E	P	I	Y	L	G	G	750
2251	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT	2295
751	V	F	Q	L	E	K	G	D	R	L	S	A	E	I	N	765
2296	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	2340
766	R	P	D	Y	L	D	F	A	E	S	G	Q	V	Y	F	780
2341	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG	TGA										2358
781	G	I	I	A	L	*										785

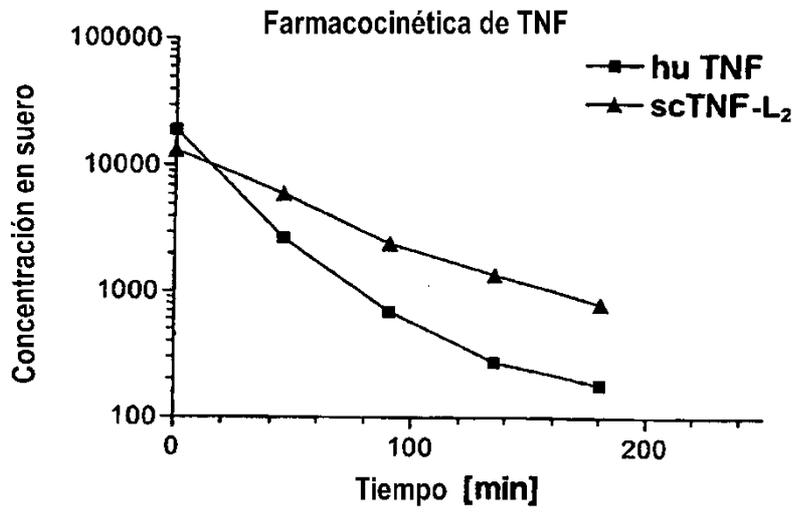


Figura 27

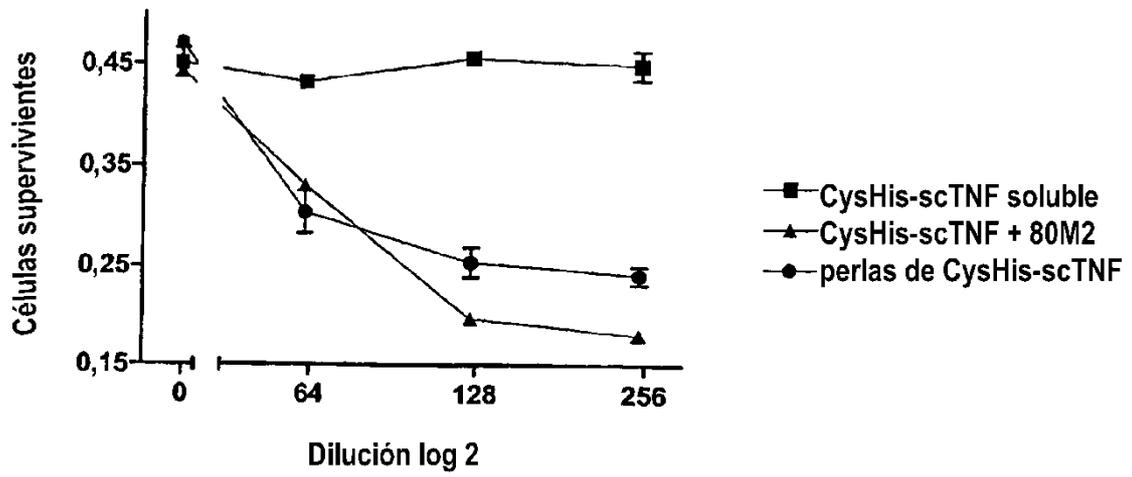


Figura 28