

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 122**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C07K 14/525** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2009 E 09780803 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2310509**

54 Título: **Moléculas de una sola cadena de TNFSF**

30 Prioridad:

**21.07.2008 EP 08013112**

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

**17.06.2015**

73 Titular/es:

**APOGENIX GMBH (100.0%)  
Im Neuenheimer Feld 584  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**HILL, OLIVER;  
GIEFFERS, CHRISTIAN y  
THIEMANN, MEINOLF**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 538 122 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

Moléculas de una sola cadena de TNFSF

5 La presente invención se refiere a proteínas de fusión de una sola cadena que comprenden tres dominios de citoquinas de la superfamilia del TNF soluble (TNFSF) y moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión. Las proteínas de fusión son sustancialmente no agregantes y son adecuadas para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o de investigación.

### Estado de la Técnica

10 Se sabe que se requiere una trimerización de citoquinas de TNFSF, p. ej., el ligando CD95 (CD95L), para una unión y activación eficaces del receptor. Complejos triméricos de citoquinas de la superfamilia del TNF, sin embargo, son difíciles de preparar a partir de unidades monoméricas recombinantes.

Los documentos WO 01/49866 y WO 02/09055 describen proteínas de fusión recombinantes que comprenden una citoquina TNF y un componente de multimerización, en particular una proteína de la familia de proteínas C1q o una colectina. Una desventaja de estas proteínas de fusión es, sin embargo, que el dominio de trimerización tiene habitualmente un gran peso molecular y/o que la trimerización es bastante ineficiente.

15 Schneider et al. (J Exp Med 187 (1989), 1205-1213) describen que trímeros de citoquinas TNF se estabilizan por motivos de estabilización situados en posición N-terminal. En CD95L, la estabilización del trímero del dominio de unión al receptor es presumiblemente provocada por dominios de aminoácidos N-terminales que están situados cerca de la membrana citoplasmática.

20 Shiraishi et al. (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) describen que el dominio de unión al receptor de CD95L puede ser estabilizado por motivos enrollados en espiral  $\alpha$ -helicoidal (cremallera de leucina) artificiales situados en posición N-terminal. Se encontró, sin embargo, que apenas se puede predecir la orientación de las cadenas de polipéptidos entre sí, p. ej., orientación paralela o antiparalela. Además, el número óptimo de repeticiones heptad en el motivo de cremallera enrollado en espiral son difíciles de determinar. Además, las estructuras enrolladas en espiral tienen la tendencia a formar agregados macromoleculares después de la alteración del pH y/o la fuerza iónica.

30 WO 01/25277 se refiere a polipéptidos oligoméricos de cadena sencilla que se unen a un dominio de unión a ligando extracelular de un receptor celular, en donde el polipéptido comprende al menos tres sitios de unión al receptor de los cuales al menos uno es capaz de unirse a un dominio de unión a ligando del receptor celular y al menos uno es incapaz de unirse con eficacia a un dominio de unión a ligando del receptor celular, por lo cual los polipéptidos oligoméricos de cadena sencilla son capaces de unirse al receptor, pero son incapaces de activar el receptor. Por ejemplo, los monómeros se derivan de ligandos de citoquinas de la familia de TNF, en particular de TNF- $\alpha$ .

35 El documento WO 2005/103077 describe polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden al menos tres monómeros de un miembro de ligando de la familia de TNF y al menos dos conectores peptídicos que unen entre sí los monómeros de los miembros de la familia de ligandos de TNF. Experimentos recientes, sin embargo, han demostrado que estos polipéptidos de fusión de cadena sencilla muestran una agregación no deseada.

Era un objeto de la presente invención proporcionar proteínas de fusión de cadena sencilla que comprendan al menos tres dominios de citoquinas TNF que permitan la fabricación recombinante eficiente combinada con una buena estabilidad relativa a la agregación.

### Compendio de la Invención

40 La presente invención se refiere a un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende:

- (i) un primer dominio de citoquinas de la familia de TNF soluble,
- (ii) un primer enlazador peptídico,
- (iii) un segundo dominio de citoquinas de la familia TNF soluble,
- (iv) un segundo enlazador peptídico, y

(v) un tercer dominio de citoquinas de la familia TNF soluble

que es sustancialmente no-agregante, en donde el dominio de citoquinas de la familia TNF soluble se selecciona de dominios TRAIL. La invención se refiere, además, a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según se describe en esta memoria y a una célula o un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico según se describe en esta memoria. La invención se refiere también a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula según se describe en esta memoria. La invención también se refiere a una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico o una célula según se describe en esta memoria para su uso en terapia, p. ej., el uso de una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula según se describe en esta memoria para la preparación de una composición farmacéutica en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos causados por, asociados con y/o acompañados de la disfunción de citoquinas de TNFSF, en particular trastornos proliferativos tales como tumores, p. ej., tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades metabólicas; trastornos autoinmunes, p. ej., enfermedades reumatoides y/o artríticas; enfermedades degenerativas, p. ej., enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a la apoptosis o rechazos de trasplantes.

### Descripción de las Figuras

- Figura 1 Estructura del dominio del polipéptido de fusión de cadena sencilla de la invención. I., II., III. dominios de citoquinas de la familia de TNF solubles.
- Figura 2 Imagen esquemática que representa la estructura general de proteínas de la TNF-SF. ■ ■ ■ membrana celular, extremo N situado dentro de la célula, 1. Pliegue  $\beta$  anti-paralelo del dominio de unión al receptor (RBD), 2. Interfaz de RBD y membrana celular, 3 sitio de escisión de proteasa.
- Figura 3 Imagen esquemática que representa la estructura del trímero de la TNF-SF nativo. Las estructuras cilíndricas representan RBDs, Los extremos N conectan RBD con la membrana celular.
- Figura 4 Imagen esquemática que representa la estructura de tres dominios solubles que comprenden el dominio de unión al receptor de una citoquina TNF. I., II., III. dominios de citoquinas de la familia TNF solubles.
- Figura 5 Trimerización de los dominios solubles que comprenden el RBD de una citoquina TNF, caracterizado porque los extremos N y C de los tres dominios solubles forman una superficie.
- Figura 6 Imagen esquemática que representa la estructura de la TNF-SF de una sola cadena que comprende toda o una parte de la región de tallo que ilustra el requisito de enlazadores más largos para compensar la distancia al extremo N del siguiente dominio soluble.
- Figura 7 Proteína de fusión scFv-TNF-SF conocida de la técnica.
- Figura 8 Proteína de fusión Fc-TNF-SF conocida de la técnica.
- Figura 9 9A Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento adicional de anticuerpo Fab. 9B Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento adicional de anticuerpo scFv.
- Figura 10 Dimerización de dos polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma N-terminal a través de puentes disulfuro.
- Figura 11 Dimerización de dos polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma C-terminal a través de puentes disulfuro.
- Figura 12 Dimerización de polipéptidos de fusión de cadena sencilla a través de un enlazador.
- Figura 13 Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo Fab adicional fusionado adicionalmente a un segundo polipéptido de fusión o a un polipéptido de fusión scFv.
- Figura 14 Dimerización de dos polipéptidos de fusión scFab a través de puentes disulfuro.

- Figura 15 Polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma N-terminal que comprenden adicionalmente un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
- Figura 16 Polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma C-terminal que comprenden adicionalmente un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
- 5 Figura 17 Análisis SEC de miembros de la TNF-SF expresados de manera recombinante, purificados, en condiciones nativas. Se muestran a modo de ejemplo dos análisis SEC de los miembros de la TNF-SF purificados en una columna Superdex200 bajo condiciones nativas (p. ej.: PBS, pH 7,4). Los diagramas muestran la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La flecha en negro indica el pico de elución para la fracción que contiene proteína laq TNF-SF trimérica soluble, definida. El triángulo indica el pico de elución para la TNF-SF oligomerizada. La flecha en blanco indica el volumen vacío de la columna de la SEC que contiene agregados de proteína, que son demasiado grandes para ser separados (> 800 kDa).
- 10
- Figura 17A: Agregación de proteína de la TNF-SF El Diagrama A muestra de modo ilustrativo un análisis de una preparación de proteína de la TNF-SF que contiene una alta cantidad de proteína oligomerizada/agregada (indicada por la alta cantidad de proteína que eluye en el volumen vacío y la alta cantidad de proteína oligomérica).
- 15
- Figura 17 B: Proteína soluble definida por proteína de la TNF-SF El Diagrama B muestra de modo ilustrativo un análisis para un preparado de proteína de la TNF-SF que contiene casi exclusivamente proteína soluble definida (indicado por la ausencia de proteína que eluye en el volumen vacío y por la cantidad muy limitada de proteína que eluye como oligómero).
- 20
- Figura 18 Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SSSS purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SSSS en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 14,56 ml, correspondiente a un MW (peso molecular) aparente de 68 kDa. No hay picos de proteínas adicionales con menor volumen de retención, lo que indica que se podía observar proteína oligomerizada/agregada.
- 25
- Figura 19 Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SNSN purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SNSN en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 14,12 ml, correspondiente a un MW aparente de 87 kDa. No hay picos de proteínas adicionales con menor volumen de retención, lo que indica que se podía observar proteína oligomerizada/agregada.
- 30
- Figura 20 Análisis SEC de Fab-scTRAILwt-SNSN purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILwt-SNSN en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 13,99 ml, correspondiente a un MW aparente de 94 kDa. Se podía observar un pequeño pico de proteína adicional en 12,00 ml. El Mw aparente de este pico corresponde a aproximadamente 270 kDa, lo que indica una trimerización definida de Fab-scTRAILwt-SNSN. La cantidad de proteína total del pico a 12,00 ml representa <3% de la proteína total. Más de 97% del Fab-scTRAILwt-SNSN analizado tiene un estado soluble definido (el ensamblaje correcto de los tres módulos de unión al receptor). El pico a 16,12 ml, que corresponde a un MW de 28 kDa, contiene polipéptido Fab de cadena ligera y no se incluyó para el análisis de áreas de los picos.
- 35
- 40
- 45 Figura 21 Glicosilación del Enlazador scTRAIL Humano
- Figura 21 A Secuencia de aminoácidos del o de los enlazadores utilizada para combinar los módulos de unión al receptor de construcciones individuales TRAIL de cadena sencilla. Gly281 codifica el último aminoácido de un módulo de unión a receptor respectivo, la secuencia GSGN/SGN/SGS codifica la secuencia de enlazador, Arg121 codifica el primer aminoácido del siguiente dominio de unión al receptor de TRAIL. Las secuencias de enlazador diseñadas contienen dos sitios de glicosilación N-enlazadas putativas en la posición 1 ó 2 según se indica. Estas posiciones fueron permutadas según se indica (versión I, II, III).
- 50

- Figura 21 B      Combinación de posiciones de enlazador: Las moléculas scTRAIL contienen tres módulos homólogos (barriles grises) que están conectados con enlazador 1 y 2 enlazador según se indica. Cada uno de los dos enlazadores pueden ser diseñados para la glicosilación ligada a N según se describe en "A". Se puede diseñar un conjunto completo de 9 proteínas diferentes que contienen todas las combinaciones posibles de enlazadores sobre la base de las secuencias mostradas en B para los enlazadores 1 y 2. (Se expresaron seis de estas proteínas - véase "C").
- 5
- Figura 21 C      Nomenclatura de las construcciones scTRAIL expresadas para testar la influencia de diferentes secuencias de enlazador sobre la glicosilación.
- Figura 22      Análisis de transferencia Western de construcciones recombinantes scTRAIL
- 10      Proteínas TRAIL de una sola cadena con diferentes secuencias de enlazador se expresaron de forma recombinante, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas unidas se detectaron con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce Strep-Tag seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa. Diferentes variantes TRAIL se cargaron según se indica. Obsérvese el desplazamiento del MW que indica una glicosilación diferencial de variantes de enlazador scTRAIL.
- 15
- Figura 23      Se recogió el sobrenadante del cultivo celular de células HEK293, que expresan transitoriamente scCD95L (SEQ-ID NO: 27) y se utilizó para estimular células Jurkat a concentraciones variables. El sobrenadante se utilizó ya sea directamente sin más modificaciones o se añadió un anticuerpo anti-Streptag (2 microgramos/ml) para reticular la proteína scCD95L. Las células Jurkat se incubaron con sobrenadante de cultivo celular de HEK293 durante tres horas a 37°, se lisaron y se analizaron en cuanto a la actividad de caspasa. Sólo el sobrenadante celular que contenía scCD95L-St reticulada aumentó la actividad de caspasa en células Jurkat, lo que indica que scCD95L solo no forma agregados de orden superior capaz de ser pro-apoptóticos.
- 20
- Figura 24      La proteína scCD95L (SEQ ID NO: 27) se puede producir por transfección transitoria de células HEK293, por transfección estable de otras células eucariotas o por expresión utilizando células procariotas. La proteína recombinante puede ser purificada por afinidad mediante el uso de la matriz StrepTactin Sepharose. La proteína unida puede eluirse con un tampón que contiene destio-biotina. La Figura 2 muestra una SDS-PAGE teñida con plata de las fracciones de elución (pistas 1 a 5; la fracción 2 es positiva) de la purificación por afinidad. La fracción de elución que contiene scCD95L podría aplicarse a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se espera, que la proteína muestre sólo un bajo contenido de agregados.
- 25
- 30
- Figura 25      Se recogieron sobrenadantes de cultivo celular de las células HEK293, que expresan transitoriamente proteínas TRAIL de una sola cadena con diferentes enlazadores (derivados de SEQ ID 28) y se utilizaron para estimular células Jurkat a diluciones variables (a modo de ejemplo, en esta figura se muestra una dilución de 1: 8). Los sobrenadantes se utilizaron ya sea directamente sin más modificaciones o se añadió un anticuerpo anti-Streptag (2 microgramos/ml de Strep MAB Immo) para reticular las proteínas scTRAIL. Las células Jurkat se incubaron con sobrenadante de cultivo celular HEK293 durante tres horas a 37°, se lisaron y se analizaron en cuanto a la actividad de caspasa. Sobrenadante de cultivo celular que contenía proteínas scTRAILwt reticuladas inducía una actividad de caspasa en células Jurkat, lo que indica que las proteínas scTRAILwt solas forman sólo una pequeña cantidad de agregados de orden superior capaces de ser pro-apoptóticos.
- 35
- 40
- Figura 26      Influencia de la sucesión del módulo de componentes de construcciones scTRAIL en su tasa de expresión de proteínas de fusión Fab-scTRAIL. Transferencia Western de sobrenadantes de cultivo de células HEK293T a partir de experimentos de expresión transitoria. Las cadenas de polipéptidos necesarias para la formación de las proteínas Fab-scTRAIL se expresaron ya sea por separado (pistas 1 a 10) o, alternativamente, se realizaron experimentos de co-expresión (pistas 11 -13). Después de reducir la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron proteínas que contienen un Streptag verde, utilizando un mAB (anticuerpo monoclonal) específico anti-Streptag como AB (anticuerpo) primario. Las proteínas scTRAIL (R2-específicas) de cadena ligera se secretaron incluso en ausencia de la cadena pesada accesoria (pistas 1-4). En contraposición, las proteínas de fusión scTRAIL de cadena pesada (R2-específicas) no se secretaron en ausencia de la cadena ligera accesoria (pistas 5-8). Tal como se ejemplifica en la pista 13., las proteínas de fusión scTRAIL (R2-específicas) de cadena pesada solamente se secretaron en presencia de la cadena ligera.
- 45
- 50
- 55

Figura 27 Se recogieron sobrenadantes de cultivo celular de células HEK293T, que expresan proteínas de fusión scTRAILwt-Fc transitoriamente con diferentes enlazadores y se utilizaron para estimular las células Jurkat a diferentes diluciones. Los sobrenadantes se utilizaron directamente sin más modificaciones (Figura XX-A). Las células Jurkat se incubaron con sobrenadante de cultivo de células HEK293T durante tres horas a 37°, se lisaron y se analizaron en cuanto a la actividad de caspasa. Existía ya una capacidad proapoptótica pronunciada presente en los sobrenadantes que contienen scTRAILwt-Fc, lo que indica que las proteínas de fusión Fc-scTRAILwt solas forman conjuntos diméricos capaces de ser pro-apoptóticos.

Figura 28 Es bien sabido que el uso de un ligando artificialmente reticulado o unido a membrana de la superfamilia de TNF tiene una bioactividad superior en comparación con un ligando homotrimérico soluble. Por lo tanto, el enriquecimiento local de construcciones TRAIL de cadena sencilla (scTRAIL) en células que expresan el antígeno Her2 a través del fragmento Fab selectivo para Her2 ("Pertuzumab") fusionado a estas proteínas scTRAIL debe incrementar su bioactividad citotóxica. Del mismo modo, el bloqueo de los sitios de unión Her2 en células mediante preincubación con el fragmento Fab específico para Her2 (Pertuzumab-Fab) sólo debe disminuir la bioactividad citotóxica de las proteínas de fusión Fab-scTRAIL. Tal como se muestra en la Figura 28A, las construcciones scTRAIL inducen la muerte de células HT1080 a medida que disminuye la viabilidad con una concentración creciente de proteínas. Por consiguiente, la preincubación de células HT1080 con el fragmento Fab (Pertuzumab-Fab), seguido de co-incubación con las construcciones Fab-scTRAIL (Fab-scTRAILR2-SNSN o Fab-scTRAILwt- SNSN) durante la noche, reduce la actividad citotóxica de las construcciones Fab-scTRAIL (figura 28B), mientras que el Fab solamente inducía la no muerte celular (Pertuzumab-Fab). Esto significa que las construcciones Fab-scTRAIL se unen a células HT1080 a través del fragmento Fab, aumentando así la bioactividad citotóxica de scTRAIL.

## 25 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un polipéptido de fusión sustancialmente no agregante que comprende al menos tres dominios solubles de ligandos de la familia TNF conectados por dos enlazadores peptídicos.

El término "no-agregante" se refiere a un contenido en monómeros del preparado de  $\geq 50\%$ , preferiblemente  $\geq 70\%$  y más preferiblemente  $\geq 90\%$ . La relación de contenido en monómeros a contenido en agregados puede determinarse examinando la cantidad de la formación de agregados, utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La estabilidad relativa a la agregación puede determinarse mediante SEC después de períodos de tiempo definidos, p. ej., desde unos pocos hasta varios días, a semanas y meses en diferentes condiciones de almacenamiento, p. ej., a 4°C o 25°C. Para la proteína de fusión, con el fin de ser clasificada como sustancialmente no agregante, se prefiere que el contenido en monómeros sea como se define anteriormente después de un período de tiempo de varios días, p. ej., 10 días, más preferiblemente después de varias semanas, p. ej., 2, 3 ó 4 semanas, y lo más preferiblemente después de varios meses, p. ej., 2 ó 3 meses de almacenamiento a 4°C o 25°C.

Dado que un aumento de, p. ej., el potencial de inducción de la apoptosis en el caso de scCD95L en células Jurkat humanas se correlaciona con su estado de agregación, la estabilidad del polipéptido de fusión relativo a la agregación también se puede determinar examinando la actividad biológica del polipéptido de fusión.

El polipéptido de fusión de cadena sencilla puede comprender dominios adicionales que pueden estar situados en los extremos N y/o C de los mismos. Ejemplos de dominios de fusión adicionales son, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos u otras moléculas fijadoras de objetivo o un dominio de citoquinas adicional, p. ej., una interleuquina.

El polipéptido de fusión de cadena sencilla puede comprender dominios adicionales que pueden estar situados en los extremos N y/o C de los mismos. Ejemplos de dominios de fusión adicionales son, p. ej., anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos u otras moléculas fijadoras de objetivo o un dominio de citoquinas adicional, p. ej., una interleuquina. La proteína de fusión de cadena sencilla se compone de tres dominios solubles derivados de una citoquina de la superfamilia de TNF. Preferiblemente, esos dominios solubles se derivan de una citoquina de mamífero, en particular ser humano, incluyendo variantes alélicas y/o derivados de los mismos. Los dominios solubles comprenden la porción extracelular de una citoquina TNFSF, incluyendo el dominio de unión al receptor sin dominios de la membrana localizados. Proteínas de la superfamilia de TNF están ancladas a la membrana a través de una porción N-terminal de 15-30 aminoácidos, la denominada región del tallo. La región del tallo contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular. Sin embargo, la región del tallo no es parte del dominio de unión al receptor (RBD).

Es importante destacar que el RBD se caracteriza por una localización particular de sus aminoácidos N- y C-terminales. Dichos aminoácidos son inmediatamente adyacentes y están situados centralizados con respecto al eje del trímero. Los primeros aminoácidos N-terminales del RBD forman una hebra beta anti-paralela con los aminoácidos C-terminales del RBD (Figs. 2 y 3).

5 Por lo tanto, la hebra beta anti-paralela del RBD forma una interfase con la membrana celular, que está conectada a y anclada dentro de la membrana celular a través de los aminoácidos de la región del tallo. Es altamente preferido que los dominios solubles de la proteína de fusión de cadena sencilla comprendan un dominio de unión al receptor de la citoquina TNF-SF que carecen de cualquiera de los aminoácidos de la región del tallo (Figs. 4 y 5). De lo contrario, se requeriría un largo enlazador que conecta el extremo C de uno de los dominios solubles con el extremo N del siguiente dominio soluble para compensar la región del tallo N-terminal del siguiente dominio soluble (Figura 10 6), lo cual podría resultar en una inestabilidad y/o en la formación de agregados.

Una ventaja adicional de dominios solubles de este tipo es que los aminoácidos N- y C-terminales del RBD no son accesibles para cualquiera de los anticuerpos anti-fármaco.

15 Preferiblemente, el polipéptido de fusión de cadena sencilla es capaz de formar una estructura trimérica ordenada que comprende al menos un sitio de unión funcional para el receptor de citoquina respectivo.

El polipéptido de fusión puede comprender uno, dos o tres sitios funcionales de unión al receptor de citoquina, es decir, secuencias de aminoácidos capaces de formar un complejo con un receptor de citoquinas. Así, al menos uno de los dominios soluble es capaz de unirse al receptor de citoquina correspondiente. En una realización, al menos uno de los dominios solubles es capaz de la activación del receptor, con lo que se puede efectuar una actividad 20 apoptótica y/o proliferativa. En una realización adicional, se seleccionan uno o más de los dominios solubles que no son capaces de la activación del receptor.

Se describe que el dominio soluble se puede derivar de miembros de la superfamilia del TNF, p. ej., TNFSF-1-18 humana y EDA-A1 a -A2 según se indica en la Tabla 1, preferiblemente de LTA (SEQ ID NO: 1), TNF $\alpha$  (SEQ ID NO: 2), LTB (SEQ ID NO: 3), OX40L (SEQ ID NO: 4), CD40L (SEQ ID NO: 5), CD27L (SEQ ID NO: 7), CD30L (SEQ ID NO: 8), CD137L (SEQ ID NO: 9), RAN KL (SEQ ID NO: 11), TWEAK (SEQ ID NO: 12), APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), BAFF (SEQ ID NO: 15), LIGHT (SEQ ID NO: 16), TL1A (SEQ ID NO: 17), GITRL (SEQ ID NO: 18), EDA-A1 (SEQ ID NO: 19) y EDA-A2 (SEQ ID NO: 20). Dominios solubles preferidos de las proteínas respectivas se indican en la Tabla 1 (NH<sub>2</sub>-aa a COOH-aa) y, p. ej., comprende los aminoácidos 59-205, 60-205 ó 64-205 de LTA (SEQ ID NO: 1), 86-233 de TNF[alfa] (SEQ ID NO: 2), 82-244 u 86-244 de LTB (SEQ ID NO: 3), 52-183 ó 55-183 de OX40L (SEQ ID NO: 4), 112-261, 117-261 ó 121-261 de CD40L (SEQ ID NO: 5), 51-193 ó 56-193 de CD27L (SEQ ID NO: 7), 97-234, 98-234 ó 102-234 de CD30L (SEQ ID NO: 8), 86-254 de CD137L (SEQ ID NO: 9), 161-317 de RANKL (SEQ ID NO: 11), 103-249, 104-249, 105-249 ó 106-249 de TWEAK (SEQ ID NO: 12), 112-247 de APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), 112 a 250 de APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), 140-285 de BAFF (SEQ ID NO: 15), 91-251, 93-251 o 97-251 de TL1A (SEQ ID NO: 17), 52-177 de GITRL (SEQ ID NO: 18), 245-391 de EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), 245-389 de EDA-A2 (SEQ ID NO: 20). 30 35

El dominio soluble se puede derivar, p. ej., de LIGHT. En una realización especialmente preferida, el dominio soluble se selecciona de TRAIL, en particular a partir de los aminoácidos 120-122 y comprende, en particular, los aminoácidos 120-281, 121-281 o 122-281 de SEQ ID NO: 10. Opcionalmente, el aminoácido Lys145 de SEQ ID NO: 6 puede ser reemplazado por un aminoácido no cargado, p. ej., Ser o Gly. Opcionalmente, el aminoácido Arg121 de SEQ ID NO: 10 puede ser reemplazado por un ácido amino no cargado, p. ej., Ser o Gly. Además, se describe que los dominios solubles se seleccionan de LIGHT humano, en particular partiendo de los aminoácidos 93, 94 ó 95 de SEQ ID NO: 16 y, en particular, comprenden los aminoácidos 93-240, 94-240 ó 95-240 de SEQ ID NO: 16. 40

Como se indicó anteriormente, los dominios solubles pueden comprender las secuencias de tipo salvaje según se indica en SEQ ID NO: 1-20. Cabe señalar, sin embargo, que es posible introducir mutaciones en uno o más de estos dominios solubles, p. ej., mutaciones que alteran (p. ej., aumentan o disminuyen) las propiedades de unión de los dominios solubles. En una realización, se pueden seleccionar los dominios solubles que no pueden unirse al receptor de citoquina correspondiente. Un ejemplo de una mutación de este tipo es una sustitución del aminoácido Y218 en CD95L humano (SEQ ID NO: 6) por otro aminoácido, p. ej., R, K, S o D. Además, se puede introducir una mutación que altere la unión a los otros componentes celulares y extracelulares, p. ej., la matriz extracelular. Un ejemplo de una mutación de este tipo es una sustitución del aminoácido K177 en CD95L (SEQ ID NO: 6) por otro aminoácido, p. ej., E, D o S. 45 50

En una realización adicional preferida de la invención, el dominio de citoquina soluble (i) comprende un mutante de la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión al receptor de la misma que se une a y/o activa el

receptor de TRAIL-1 (TRAILR1) y/o el receptor de TRAIL-2 (TRAILR2). La unión y/o actividad del mutante puede determinarse, p. ej., por los ensayos como se describe en van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103: 8634-8639), Kelley et al. (J. Biol.Chem, 2005, 280:2205-2215) o MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65:11265-11270).

5 El mutante puede ser generado por cualquier técnica y es conocido por la persona experta, p. ej., las técnicas descritas en van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103: 8634-8639), Kelley et al. (J. Biol. Chem, 2005, 280:2205-2215) o MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270) y puede comprender cualquier tipo de mutaciones estructurales, p. ej., sustitución, delección, duplicación y/o inserción de un aminoácido. Una realización preferida es la generación de sustituciones. La sustitución puede afectar a al menos un aminoácido de la citoquina de la superfamilia de TNF o a un dominio de unión al receptor de los mismos según se describe en esta memoria. En una  
10 realización preferida, la sustitución puede afectar a al menos uno de los aminoácidos de TRAIL, p. ej., TRAIL humano (p. ej., SEQ ID NO: 10). Sustituciones preferidas a este respecto afectan al menos a uno de los siguientes aminoácidos de TRAIL de la SEQ ID NO: 10: R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269. Sustituciones de aminoácidos preferidas de TRAIL humano de SEQ ID NO: 10 son al menos una de las siguientes sustituciones: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R,  
15 N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R o D269K.

La o las sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, p. ej., TRAIL humano, ya sea en TRAILR1 o TRAILR2. Alternativamente, la o las sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, p. ej., TRAIL humano, en o en ambos de TRAILR1 y de TRAILR2. La unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 puede verse afectada positivamente, es decir, una unión más fuerte, más selectiva o más  
20 específica y/o más activación del receptor. Alternativamente, la unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 pueden verse afectadas negativamente, es decir, una unión más débil, menos selectiva o menos específica y/o menos activación o ninguna del receptor.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustitución o sustituciones de aminoácidos de la invención que afectan a la unión y/o activación tanto de TRAILR1 como de TRAILR2 pueden encontrarse, p. ej., en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (véase más arriba) y pueden comprender un mutante TRAIL humano con las siguientes dos sustituciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 Y213W y S215D o con la siguiente sustitución de un solo aminoácido: Y189A.  
25

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustitución o sustituciones de aminoácidos de la invención que afectan a la unión y/o activación de TRAILR1 se pueden encontrar, p. ej., en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (véase más arriba) y pueden comprender un mutante TRAIL humano con las siguientes cuatro sustituciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 N199V, K201R, Y213W y S215D o con las siguientes cinco sustituciones de aminoácidos: Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D, o se pueden encontrar en la Tabla 2 de Kelley et al. (véase más arriba) y pueden comprender un mutante TRAIL humano con las siguientes seis sustituciones de aminoácidos: Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V y K201R, o con Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R y K201R.  
30

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustitución o sustituciones de aminoácidos de la invención que afectan a la unión y/o activación de TRAILR2 puede encontrarse, p. ej., en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (véase más arriba) o en la Tabla 2 de Kelley et al. (véase más arriba) y puede comprender un mutante TRAIL humano con las siguientes seis sustituciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 10: Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L y D267Q, o se pueden encontrar en la Tabla 2 de van der Sloot et al. (véase más arriba) y pueden comprender un mutante humano TRAIL con la siguiente sustitución de un solo aminoácido: D269H, o con las siguientes dos sustituciones de aminoácidos:  
35 D269H y E195R o D269H y T214R.  
40

Por lo tanto una forma de realización preferida es una proteína de fusión según se describe en esta memoria, en la que al menos uno de los dominios solubles comprende un mutante de TRAIL o de un dominio de unión al receptor de la misma que se une y/o activa TRAILR1 y/o TRAILR2.

Ejemplos adicionales de mutantes de TRAIL, que muestran una agregación reducida del receptor inducida por TRAIL son H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q) y H177 (S, T).  
45

Una realización preferida de una proteína de fusión que comprende un mutante de TRAIL o de un dominio de unión al receptor según se describe en esta memoria es una proteína de fusión en donde el componente (i) comprende al menos una sustitución de aminoácidos, en particular como se indica a continuación.

Una sustitución de aminoácidos de este tipo afecta al menos a una de las siguientes posiciones de aminoácidos de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10): R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269.  
50



Una sustitución de aminoácidos de este tipo es al menos una de las siguientes: R130E, G160M, H168 (S, T, Q), R170 (E, S, T, Q), H177 (S, T) Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R o D269K.

5 Un dominio selectivo de TRAIL-R2 preferido comprende sustituciones de aminoácidos Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L y D267Q.

Un dominio selectivo de TRAIL-R1 preferido comprende sustituciones de aminoácidos Y189A, Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D.

10 La molécula de fusión de una sola cadena de la presente invención comprende adicionalmente tres dominios solubles de citoquinas, a saber, los componentes (i), (iii) y (v). De acuerdo con la presente invención, se encontró, sorprendentemente, que se potencia la estabilidad de un polipéptido de fusión citoquina de la familia TNF de cadena sencilla frente a la agregación, si el segundo y/o tercer dominio de citoquina de la familia TNF soluble es un dominio acortado en el extremo N que comprende opcionalmente mutaciones en la secuencia de aminoácidos. Así, preferiblemente, tanto el segundo como el tercer dominio de citoquina de la familia de TNF soluble son dominios acortados en el extremo N que comprenden opcionalmente mutaciones de secuencias de aminoácidos en las regiones N-terminales, preferiblemente dentro de los primeros cinco aminoácidos del extremo N del dominio de citoquinas soluble. Estas mutaciones pueden comprender la sustitución de aminoácidos cargados, p. ej., aminoácidos de carácter ácido o básico, por aminoácidos neutros, en particular serina o glicina.

20 En contraposición con ello, la selección del primer dominio de citoquinas de la familia TNF soluble no es tan crítica. Aquí, se puede utilizar un dominio soluble que tenga una secuencia N-terminal de longitud completa. Cabe señalar, sin embargo, que también el primer dominio de citoquina soluble puede tener una secuencia acortada en el extremo N y opcionalmente mutada.

25 También se describe que los dominios solubles de citoquina de la familia de TNF (i), (iii) y (v) son dominios solubles de CD95L, en particular los dominios solubles de CD95L humana. El primer dominio soluble de CD95L (i) se puede seleccionar de secuencias nativas, acortadas y/o mutadas. La secuencia N-terminal del primer dominio (i) puede comenzar, p. ej., entre el aminoácido Glu142 y Val146 de CD95L humana, en donde Arg144 y/o Lys145 pueden ser reemplazadas por un aminoácido neutro, p. ej., por Ser o Gly. Los segundo y tercer dominios solubles de CD95L (iii) y (v), sin embargo, se seleccionan de secuencias acortadas y/o mutadas. Al menos uno de los dominios solubles de CD95L, (iii) y (v), puede tener una secuencia N-terminal que comienza entre los aminoácidos Arg144 y Val146 de CD95L humana, y donde Arg144 y/o Lys145 pueden ser reemplazadas por un aminoácido neutro, p. ej., por Ser y/o Gly. El segundo y tercer dominios solubles de CD95L pueden comenzar con una secuencia N-terminal seleccionada de:

(a) Arg144 - (Gly/Ser) 145 - Val (146)

(b) (Gly/Ser) 144 - Lys145 - Val (146) y

(c) (Gly/Ser) 144 - (Gly/Ser) 145 -Val (146).

35 Además, el dominio de CD95L puede terminar con el aminoácido Leu 281 de CD95L humana.

40 El dominio soluble de CD95L puede comprender una secuencia de tipo salvaje de un mamífero, p. ej., un ser humano. En determinadas realizaciones, sin embargo, la secuencia de CD95L puede comprender una mutación que resulta en una reducción o inhibición completa de la unión a la matriz extracelular, p. ej., una mutación en la posición Lys177, p. ej., Lys177 → Glu, Asp o Ser y/o una mutación que reduce y/o inhibe la unión al receptor de CD95L, p. ej., una mutación en la posición Tyr218, p. ej., Tyr218 → Arg, Lys, Ser, Asp.

Una de las tres moléculas solubles de CD95L puede ser una variante de secuencia con una unión reducida al receptor. Dos de las moléculas pueden contener mutaciones que resultan en una unión reducida al receptor.

45 En una realización preferida adicional de la presente invención, los dominios solubles de citoquinas de la familia de TNF (i), (iii) y (v) son dominios solubles de TRAIL, en particular dominios solubles de TRAIL humano. El primer dominio soluble TRAIL (i) se puede seleccionar de secuencias nativas, acortadas y/o mutadas. Por lo tanto, el primer dominio soluble de TRAIL (i) tiene una secuencia N-terminal que puede comenzar entre el aminoácido Glu116 y VaM 22 de TRAIL humano, y en donde Arg121 puede ser reemplazado por un aminoácido neutro, p. ej., por Ser o Gly. Los segundo y tercer dominios solubles TRAIL (iii) y (v) tienen una secuencia N-terminal acortada que comienza preferiblemente entre el aminoácido Gly120 y VaM 22 de TRAIL humano y en donde Arg121 puede ser reemplazado por otro aminoácido, p. ej., Ser o Gly.

Preferiblemente, la secuencia N-terminal de los dominios solubles de TRAIL (iii) y (v) se selecciona de: (a) Arg121 - Val122 - Ala123 y (b) (Gly/Ser) 121.

El dominio soluble TRAIL termina preferiblemente con el aminoácido Gly281 de TRAIL humano. En determinadas realizaciones, el dominio TRAIL puede comprender mutaciones internas como se describe arriba.

5 Se describe que los dominios solubles de citoquinas de la familia de TNF (i), (iii) y (v) son dominios solubles LIGHT, p. ej., dominios solubles LIGHT humanos. El primer dominio soluble LIGHT (i) se puede seleccionar de secuencias nativas, acortadas y/o mutadas. Por lo tanto, el primer dominio soluble LIGHT (i) tiene una secuencia N-terminal que puede comenzar entre el aminoácido Glu91 y Ala95 de LIGHT humano. Los segundo y tercer dominios solubles LIGHT (iii) y (v) tienen una secuencia N-terminal acortada que comienza preferiblemente entre el aminoácido Pro94  
10 y Ala95 de LIGHT humano. El dominio soluble LIGHT termina preferiblemente con el aminoácido Val240.

Los componentes (ii) y (iv) del polipéptido de fusión de cadena sencilla son elementos enlazadores peptídicos situados entre los componentes (i) y (iii) o (iii) y (v), respectivamente. Los elementos enlazadores flexibles tienen una longitud de 3-8 aminoácidos, en particular una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos. Los elementos enlazadores son preferiblemente enlazadores de glicina/serina, es decir, enlazadores peptídicos que consisten sustancialmente  
15 en los aminoácidos glicina y serina. En los casos en los que el dominio soluble de citoquina termina con S o G (C-terminal), p. ej., TRAIL humano, el enlazador comienza después de S o G. En los casos en los que el dominio soluble de citoquina comienza con S o G (N-terminal), el enlazador termina antes de esta S o G.

Cabe señalar que el enlazador (ii) y el enlazador (iv) no necesitan ser de la misma longitud. Con el fin de disminuir la inmunogenicidad potencial, puede ser preferible utilizar enlazadores más cortos. Además resultó que enlazadores más cortos conducen a moléculas de cadena sencilla con una tendencia reducida a formar agregados. Mientras que  
20 los enlazadores que son sustancialmente más largos que los descritos aquí pueden exhibir propiedades de agregación desfavorables.

Si se desea, el enlazador puede comprender un residuo asparagina que puede formar un sitio glicosilado Asn-Xaa-Ser. En determinadas realizaciones, uno de los enlazadores, p. ej., el enlazador (ii) o el enlazador (iv) comprenden un glicosilado en el sitio. En otras realizaciones, ambos enlazadores (iv) comprenden sitios de glicosilado. Con el fin de aumentar la solubilidad de las proteínas scTNF-SF y/o con el fin de reducir la inmunogenicidad potencial, se puede preferir que enlazador (ii) o el enlazador (iv), o ambos, comprendan un sitio de glicosilación.  
25

Secuencias de enlazadores preferidos se seleccionan de GSGSGSGS (SEQ ID NO: 52), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 53), GGSGSGSG (SEQ ID NO: 21), GGSGSG (SEQ ID NO: 22), GGSG (SEQ ID NO: 23), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 24), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 25) y GGNGSG (SEQ ID NO: 26).  
30

La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal que permite el procesamiento, p. ej., la secreción extracelular, en una célula huésped adecuada. Preferiblemente, el dominio del péptido señal N-terminal comprende un sitio de escisión de proteasa, p. ej., un sitio de escisión de peptidasa de señal y, por lo tanto, puede ser separado después o durante la expresión para obtener la proteína madura. Además,  
35 la proteína de fusión puede comprender adicionalmente un elemento C-terminal, que tiene una longitud de, p. ej., 1-50, preferiblemente 10-30 aminoácidos que pueden incluir o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación, p. ej., un dominio FLAG, un dominio Strep-tag o Strep-tag II y/o un dominio poli-His.

Además, el polipéptido de fusión puede comprender adicionalmente en el extremo N y/o el extremo C un dominio adicional, p. ej., un dominio de fijación de objetivo tal como un dominio de anticuerpo de cadena sencilla o un dominio de fragmento de anticuerpo. Ejemplos específicos de anticuerpos adecuados son anticuerpos anti-tumorales, tales como anticuerpos contra miembros de la familia EGFR. Ejemplos adecuados de otras moléculas fijadoras de objetivo son citoquinas tales como interleucinas.  
40

Ejemplos de proteínas de fusión específicas de la invención son las SEQ ID NOs: 27, 28, 29, 43, 45, 47, 49 y 51. Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según se describe en esta memoria. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN, p. ej., una molécula de ADN de doble cadena o de cadena sencilla, o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión o un precursor de la misma, p. ej., una pro- o pre-proforma de la proteína de fusión que puede comprender una secuencia señal u otras porciones de aminoácidos heterólogas para la secreción o purificación que están situadas preferiblemente en el extremo N y/o C de la proteína de fusión. Las porciones de aminoácidos heterólogos pueden estar enlazadas al primer y/o segundo dominio a través de un sitio de escisión de proteasa, p. ej., un sitio de escisión de Factor X3, trombina o IgA de la proteasa.  
45  
50

Ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos específicas de la invención son SEQ ID NOs: 30, 31 32, 44, 46, 48 y 50.

5 La molécula de ácido nucleico puede estar enlazada operativamente a una secuencia de control de la expresión, p. ej., una secuencia de control de expresión que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula huésped deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar situada en un vector, p. ej., un plásmido, un bacteriófago, un vector viral, un vector de integración cromosomal, etc. Ejemplos de secuencias de control de la expresión y vectores adecuados se describen, por ejemplo, por Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, y Ausubel et al. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, o ediciones más recientes de los mismos.

10 Se pueden utilizar diversos sistemas de expresión de vector/célula huésped para expresar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de la presente invención. Células huésped adecuadas incluyen, pero no se limitan a células procariotas tales como bacterias, p. ej., *E. coli*, células huésped eucariotas tales como células de levadura, células de insectos, células vegetales o células animales, preferiblemente células de mamífero y, más preferiblemente, células humanas.

15 Además, la invención se refiere a un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como se describe anteriormente. Tales organismos transgénicos pueden generarse por métodos conocidos de transferencia genética, incluyendo la recombinación homóloga.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo al menos una proteína de fusión, un ácido nucleico respectivo que codifica la misma o una célula transformada o transfectada, todo como se describe en esta memoria.

25 Al menos una proteína de fusión, ácido nucleico respectivo que codifica la misma o célula transformada o transfectada, todos como se describen en esta memoria se pueden utilizar en terapia, p. ej., en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos provocados por, asociadas con y/o acompañados de la disfunción de citoquinas de TNF-SF, en particular trastornos proliferativos tales como tumores, p. ej., tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades metabólicas; trastornos autoinmunes, p. ej., artritis reumatoide y/o enfermedades artríticas; enfermedades degenerativas, p. ej., enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a apoptosis o rechazos de trasplantes.

30 La expresión "disfunción de citoquinas de TNF-SF", tal como se utiliza en esta memoria, ha de entenderse como cualquier función o expresión de una citoquina de TNF-SF que se desvía de la función o la expresión normal de una citoquina de TNF-SF, p. ej., la sobre-expresión del gen o proteína de TNF-SF, la expresión reducida o abolida del gen de citoquina o proteína de TNF-SF en comparación con el nivel de expresión fisiológico normal de dicha citoquina de TNF-SF, la actividad incrementada de la citoquina de TNF-SF, la actividad reducida o abolida de la citoquina de TNF-SF, la unión incrementada de la citoquina de TNF-SF a cualquier participante en la unión, p. ej., a un receptor, particularmente un receptor de CD95 o TRAIL u otra molécula de citoquina, la unión reducida o abolida a cualquier participante en la unión, p. ej., a un receptor, particularmente un receptor de TRAIL o CD95 u otra molécula de citoquinas, en comparación con la actividad fisiológica normal o unión de dicha citoquina de TNF-SF.

35 La composición se puede administrar como monoterapia o como terapia de combinación con otros medicamentos, p. ej., agentes citostáticos o quimioterapéuticos, corticosteroides y/o antibióticos.

40 La proteína de fusión se administra a un sujeto en necesidad de la misma, particularmente un paciente humano, en una dosis suficiente para el tratamiento de las afecciones específicas por medios adecuados. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede formular como una composición farmacéutica junto con soportes, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse de acuerdo con protocolos estándares. La composición farmacéutica puede administrarse sistémicamente, p. ej., por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, o localmente, p. ej., intranasal, subcutánea o intratecal. Se prefiere la administración intravenosa.

45 La dosis de la proteína de fusión administrada dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, del peso del sujeto, del tipo y la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración y del juicio del médico que prescribe. Para la administración de proteínas de fusión, es adecuada una dosis diaria de 0,001 a 100 mg/kg.

## Ejemplos

50 **1. Fabricación de una proteína de fusión CD95L de una sola cadena (scCD95L) (como referencia)**

En lo que sigue se muestra la estructura general de las proteínas recombinantes (Figura 1) ejemplificada para el dominio de unión al receptor del ligando CD95 humano.

### 1.1 Estructura del polipéptido

- 5 A) Aminoácidos Met1 -Ser21  
Péptido IgKappa señal, asumida escisión de peptidasa señal después del aminoácido Gly20
- B) Aminoácidos Glu22-Leu161  
Primer dominio soluble de citoquinas del ligando CD95 humano (CD95L; aminoácidos 142-281 de SEQ ID NO: 6, incluyendo una mutación K145S).
- 10 C) Aminoácidos Gly162-Gly169  
Primer elemento enlazador peptídico.
- D) Aminoácidos Arg170-Leu307  
Segundo dominio soluble de citoquina del ligando CD95 humano (CD95L; aminoácidos 144-182 de SEQ ID NO: 6, incluyendo una mutación K145S).
- 15 E) Aminoácidos Gly308-315  
Segundo elemento enlazador peptídico.
- F) Aminoácidos Arg316-Leu453  
Tercer dominio soluble de citoquina del ligando CD95 humano (CD95L; aminoácidos 144-281 de SEQ ID NO: 6, incluyendo una mutación K145S).
- 20 G) Aminoácido Gly457-Lys472  
Enlazador peptídico con un motivo Strep-tag II.

La secuencia de aminoácidos de sc CD95L se muestra en SEQ ID NO. 27. El polipéptido de fusión comprende primero y segundo enlazadores peptídicos que tienen la secuencia GGSGSGSG (SEQ ID NO: 21). Secuencias de enlazadores preferidas adicionales son SEQ ID NOs: 22-26 según se describe anteriormente. Cabe señalar que las primera y segunda secuencias de enlazador peptídico no necesitan ser idénticas.

- 25 La secuencia del péptido señal (A) puede ser reemplazada por cualquier otra adecuada, p. ej., secuencia del péptido señal de mamífero. El motivo Strep-tag II (G) puede ser reemplazado por otros motivos, si se desea, o puede ser eliminado.

- 30 Tal como se muestra en la Figura 23, se recogió sobrenadante de cultivo celular de células HEK293, que expresan transitoriamente scCD95L (SEQ ID NO: 27) y se utilizó para estimular células Jurkat a concentraciones variables. El sobrenadante se utilizó ya sea directamente sin más modificaciones o se añadió un anticuerpo anti-Streptag (2 microgramos/ml) para reticular la proteína scCD95L. Sólo el sobrenadante celular que contenía scCD95L-St reticulada aumentó la actividad de caspasa en células Jurkat, lo que indica que scCD95L sola no forma agregados de orden superior capaces de ser pro-apoptóticos.

### 1.2 Casete de genes que codifica el polipéptido

- 35 El gen sintético se puede optimizar a la vista de su uso de codón para la expresión en células huésped adecuadas, p. ej., células de insectos o células de mamífero. Una secuencia de ácido nucleico preferida se muestra en la SEQ ID NO: 30.

### 1.3 Estrategia de clonación

- 40 El gen sintético puede clonarse, p. ej., por medio de una hidrólisis con enzimas de restricción en un vector de expresión adecuado.

## 2. Fabricación de una proteína de fusión TRAIL de una sola cadena (sc TRAIL wt)

### 2.1 Estructura del polipéptido

- A) Aminoácidos Met1 -Gly20

Péptido señal Ig-kappa, asumida escisión de peptidasa señal después del aminoácido Gly20

B) Aminoácidos Gln21-Gly182

Primer dominio soluble de citoquinas del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 120-281 de SEQ ID NO: 10).

5 C) Aminoácidos Gly183-Ser190

Primer elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son ambos S, o uno es S y el otro es N.

D) Aminoácidos Arg191-Gly351

10 Segundo dominio soluble de citoquina del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 121-281 de SEQ ID NO: 10).

E) Aminoácidos Gly352-Ser359

Segundo elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son ambos S, o uno es S y el otro es N.

F) Aminoácidos Arg360-Lys538

15 Tercer dominio soluble de citoquina del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 121-Gly281 de SEQ ID NO: 10).

G) Aminoácido Gly521-Lys538

Elemento enlazador peptídico con un motivo Strep-tag II.

La secuencia de aminoácidos de sc TRAIL wt se muestra en SEQ ID NO: 28.

20 Los enlazadores indicados pueden ser reemplazados por otros enlazadores preferidos, p. ej., como se muestra en SEQ ID NOs: 21,26. Cabe señalar que los primero y segundo enlazadores peptídicos no necesitan ser idénticos.

La secuencia del péptido señal (A) puede ser reemplazada por cualquier otra adecuada, p. ej., la secuencia del péptido señal de mamífero. El motivo Strep-tag II (G) puede ser reemplazado por otros motivos, si se desea, o puede ser eliminado.

25 Se recogieron sobrenadantes de cultivo celular de células HEK293, que expresan transitoriamente proteínas TRAIL de una sola cadena con diferentes enlazadores (derivados de SEQ ID 28, en total nueve combinaciones de enlazadores diferentes) y se utilizaron para estimular las células Jurkat a diferentes diluciones (a modo de ejemplo, una dilución de 1:8 se muestra en la Figura 25). Los sobrenadantes se utilizaron ya sea directamente sin más modificaciones o se añadió un anticuerpo anti-Streptag (2 microgramos/ml de Strep MAB Immo) para reticular las proteínas scTRAILwt. Las células Jurkat se incubaron con sobrenadante de cultivo celular HEK293 durante tres horas a 37°, se lisaron y se analizaron en cuanto a la actividad de caspasa. Sobrenadante de cultivo celular que contenía proteínas scTRAILwt reticuladas indujo una actividad incrementada de caspasa en células Jurkat (resultados que se muestran en la parte derecha del gráfico), lo que indica que las proteínas scTRAILwt solas forman sólo una baja cantidad de agregados de orden superior capaces de ser pro-apoptóticos.

### 35 **2.2 Casete de genes que codifica el polipéptido**

El gen sintético se puede optimizar a la vista de su uso de codón para la expresión en células huésped adecuadas, p. ej., células de insectos o células de mamífero. Una secuencia de ácido nucleico preferida se muestra en la SEQ ID NO: 31.

### **3. Fabricación de una proteína de fusión TRAIL mutada de una sola cadena (sc TRAIL (específica para R2))**

40 En lo que sigue se muestra la estructura del polipéptido TRAIL de cadena sencilla que comprende una mutación para la unión selectiva al receptor R2 de TRAIL.

#### **3.1 Estructura del polipéptido**

A) Aminoácidos Met1 –Ser29

45 Péptido señal Ig-kappa, asumida escisión de peptidasa señal después del aminoácido Gly20 y el enlazador peptídico

B) Aminoácidos Arg29-Gly190  
Primer dominio soluble de citoquinas del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 121-281 de SEQ ID NO: 10, incluidas las mutaciones Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L y D267Q).

5 C) Aminoácidos Gly191-Ser198  
Primer elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son como se indica en el Ejemplo 2.

D) Aminoácidos Arg199-Gly359  
Segundo dominio soluble de citoquina del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 121-281 de SEQ ID NO: 10, incluidas las mutaciones según se indica en B).

10 E) Aminoácidos Gly360-Ser367  
Segundo elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son como se indica en el Ejemplo 2.

15 F) Aminoácidos Arg368-Gly528  
Tercer dominio soluble de citoquina del ligando TRAIL humano (TRAIL; aminoácidos 121-Gly281 de SEQ ID NO: 10, incluidas las mutaciones según se indica en B).

G) Aminoácido Gly529-Lys546  
Enlazador peptídico con un motivo Strep-tag II.

La secuencia de aminoácidos de sc TRAIL (específica para R2) se muestra en SEQ ID NO: 29.

20 Los enlazadores indicados pueden ser reemplazados por otros enlazadores preferidos, p. ej., como se muestra en SEQ ID NOs: 21-26. Cabe señalar que los primero y segundo enlazadores peptídicos no necesitan ser idénticos.

La secuencia del péptido señal (A) puede ser reemplazada por cualquier otra adecuada, p. ej., la secuencia del péptido señal de mamífero. El motivo Strep-tag II (G) puede ser reemplazado por otros motivos, si se desea, o puede ser suprimido.

### **3.2 Casete de genes que codifica el polipéptido**

25 El gen sintético se puede optimizar a la vista de su uso de codón para la expresión en células huésped adecuadas, p. ej., células de insectos o células de mamífero. Una secuencia de ácido nucleico preferida se muestra en la SEQ ID NO: 32.

## **4. Expresión y purificación**

### **a) Clonación, expresión y purificación de polipéptidos de fusión**

30 Células HEK293T cultivadas en DMEM + GlutaMAX (Gibco) suplementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido que contenía una casete de expresión para un polipéptido de fusión. En aquellos casos, en los que es necesaria una pluralidad de cadenas de polipéptidos para lograr el producto final, p. ej., para las proteínas de fusión Fab-scTNF-SF (Figura 9A), las casetes de expresión se combinaron ya sea en un plásmido o se dispusieron en diferentes plásmidos durante la transfección. Sobrenadante de cultivo celular que contiene el polipéptido de fusión recombinante se recogió tres días después de la transfección y se clarificó mediante centrifugación a 300 x g, seguido por filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Para la purificación de afinidad Streptactin Sepharose se empaquetó en una columna (lecho de gel 1 ml), se equilibró con 15 ml de tampón W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0) o PBS pH 7,4 y el sobrenadante de cultivo celular se aplicó a la columna con un caudal de 4 ml/min. Subsiguientemente, la columna se lavó con 15 ml de tampón W y el polipéptido unido se eluyó paso a paso mediante adición de 7 x 1 ml de tampón E (Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, destiobiotina 2,5 mM, pH 8,0). Alternativamente, para esta etapa puede utilizarse PBS pH 7,4 que contiene destiobiotina 2,5 mM. Se cuantificó la cantidad de proteína de las fracciones de material eluido y las fracciones pico se concentraron mediante ultrafiltración y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

45 La SEC se realizó en una columna Superdex 200 utilizando un sistema de cromatografía Akta (GE-Healthcare). La columna se equilibró con solución salina tamponada con fosfato y el polipéptido concentrado, purificado con

streptactina se cargó en la columna de la SEC a un caudal de 0,5 ml/min. El perfil de elución del polipéptido se controló mediante absorbancia a 280 nm.

5 Para la determinación del peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado bajo condiciones nativas, una columna Superdex 200 fue cargada con proteínas estándares de peso molecular conocido. Basado en el volumen de elución de las proteínas estándares se representó gráficamente una curva de calibración estándar y se determinó el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado.

## 5. Ensayo de la apoptosis

10 Se utilizó un ensayo celular con una línea de células T Jurkat A3 permanente para determinar la actividad inductora de la apoptosis de diferentes construcciones de ligando CD95 (CD95L) y construcciones de polipéptidos de fusión TRAIL. Células Jurkat se cultivaron en matraces con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco) suplementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Antes del ensayo, se sembraron 100.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La adición de diferentes concentraciones de péptidos de fusión a los pocillos fue seguida por una incubación durante 3 horas a 37°C. Las células se lisaron mediante la adición de tampón de lisis (HEPES 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 al 5%, DTT 100 mM, AEBSF 10 mM, pH 7,5) y las placas se pusieron en hielo durante 30 minutos a 2 horas. La apoptosis es paralela a un aumento de la actividad de caspasas, p. ej., Caspasa-3. Por lo tanto, se utilizó la escisión del sustrato de caspasa específico Ac-DEVD-AFC (Biomol) para determinar la extensión de la apoptosis. De hecho, la actividad de caspasa se correlaciona con el porcentaje de células apoptóticas determinado morfológicamente después de la tinción de las células con yoduro de propidio y Hoechst-33342. Para el ensayo de la actividad de caspasa, 20 µl de lisado celular se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos de color negro. Después de la adición de 80 µl de tampón que contiene HEPES 50 mM, 1% de sacarosa, CHAPS al 0,1%, Ac-DEVD-AFC 50 mM y DTT 25 mM, pH 7,5, la placa se transfirió a un lector de placas de microtitulación Tecan Infinite 500 y se vigiló el aumento en la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación 400 nm, longitud de onda de emisión 505 nm).

### 5.1 Ensayo de la muerte de la célula

25 Para la determinación de la muerte celular en células de fibrosarcoma HT1080 15.000 células se sembraron en placas de 96 pocillos durante la noche en medio RPM1 1640+ GlutaMAX (Gibco) suplementado con FBS al 10% (Biochrom). Las células se co-incubaron con cicloheximida (Sigma) a una concentración final de 2,5 g/ml. La muerte de la célula se cuantificó mediante tinción con tampón KV (0,5% de cristal violeta, 20% de metanol). Después de la tinción, los pocillos se lavaron con agua y se secaron al aire. El colorante se eluyó con metanol y la densidad óptica a 595 nm se midió con un lector de ELISA.

## 6. Ensayo de Estabilidad/Agregación

### 6.1. Principio del análisis de agregación (Definición de proteína soluble)

35 El contenido de monómeros (conjunto trimérico definido de los módulos de unión al receptor de TNF-SF) y agregados se determina mediante SEC analítica según se describe en el Ejemplo 4. Para este propósito particular, el análisis se realiza en tampones que contienen concentraciones salinas fisiológicas a pH fisiológico (p. ej., NaCl al 0,9%, pH 7,4; PBS pH 7,4). Un análisis típico de agregación se realiza sobre una columna Superdex200 (GE Healthcare). Esta columna separa proteínas en el intervalo entre 10 y 800 kDa.

40 Para la determinación del peso molecular aparente de polipéptido de fusión purificado bajo condiciones nativas, una columna Superdex 200 se carga con proteínas estándares de peso molecular conocido. Basado en el volumen de elución de las proteínas estándares se traza una curva de calibración y se calcula el peso molecular aparente del polipéptido de fusión purificado basándose en el volumen de elución.

45 Análisis SEC de proteínas solubles, no agregadas – p. ej., TNF-SF trimérica, muestra típicamente un pico de proteína única distinta a un volumen de elución definido. Este volumen de elución corresponde al peso molecular aparente nativo de la proteína particular y obedece aproximadamente al peso molecular teórico calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos primaria.

50 Si se produce la agregación de proteínas, el análisis SEC muestra picos de proteínas adicionales con volúmenes de retención inferiores. Para miembros de la familia TNF-SF la agregación de proteínas solubles se produce de una manera característica. Las proteínas tienden a formar oligómeros de los "trímeros", formando nonámeros (3 x 3) y 27meros (3 x 9). Estos oligómeros sirven como semillas de agregación y un alto contenido de oligómeros conduce en potencia a la agregación de la proteína. Oligómeros de gran peso molecular y los agregados eluyen en el volumen vacío de la columna Superdex200 y no pueden ser analizados mediante SEC con respecto a su peso

molecular nativo. En la Figura 17 se muestran ejemplos para el análisis SEC de un trimérico soluble definido y un preparado oligomerizado/agregado de proteínas de TNF-SF.

Debido a la inducción de la agregación (completa), preparados purificados de proteínas de fusión de TNF-SF deberían contener preferiblemente sólo proteínas triméricas definidas y sólo una muy baja cantidad de proteína oligomerizada.

El grado de agregación/oligomerización de un preparado de proteína TNF-SF particular se determina en base al análisis SEC mediante el cálculo de las áreas de los picos del diagrama de OD280 para el trimérico definido y la fracción de oligómero/agregado, respectivamente. Basado en el área del pico total el porcentaje de proteína trimérica definida se calcula como sigue:

$$(\% \text{ de contenido en trimero} = [\text{Trimero del área pico}] / [\text{Área total de pico}] \times 100)$$

La definición de la proteína soluble, tal como se utiliza en este texto, describe un preparado de proteína de la proteína TNF-SF purificada en un tampón de concentraciones salinas fisiológicas a pH fisiológico que contiene un contenido en proteína soluble definido (conjunto trimérico de dominios de TNF-SF) de > 90 % dentro de un intervalo de concentraciones de proteínas típico de 0,2 a 10,0 mg/ml.

## 6.2 Análisis de agregación mediante SEC de variantes sc-TRAIL purificadas

Tres variantes sc-TRAIL diferentes fueron transfectadas y purificadas por afinidad según se describe. Las proteínas purificadas se analizaron subsiguientemente en cuanto a su contenido de proteína soluble definida utilizando el análisis SEC según se describe en 6.1. En el caso particular de proteínas de fusión de cadena sencilla un trimero describe un conjunto trimérico de tres dominios de TNF-SF codificados por una cadena polipeptídica sencilla. (Proteínas de TNF-SF formalmente de cadena sencilla son monómeros, ya que los conjuntos de cadena sencilla sólo forman interacciones intramoleculares [todos los dominios de proteínas son codificados por una sola cadena polipeptídica] y no forman interacciones intermoleculares entre cadenas de polipéptidos individuales distintos).

Las proteínas analizadas mediante SEC eran:

- 1.) Fab-sc-TRAIL (específica para R2) -SNSN (Figura 19):  
Proteína de fusión que comprende un dominio Fab fusionado N-terminal a una proteína de fusión de cadena sencilla de TRAIL específica para la interacción con el receptor 2 de TRAIL, glicosilada
- 2.) Fab-sc-TRAIL (específica para R2) -SSSS (Figura 18):  
Proteína de fusión que comprende un dominio Fab fusionado N-terminal a una proteína de fusión de cadena sencilla de TRAIL específica para la interacción con el receptor 2 de TRAIL, no glicosilada
- 3.) Fab-sc-TRAIL-wt-SNSN (Figura 20):  
Proteína de fusión que comprende un dominio Fab fusionado N-terminal a una cadena sencilla de TRAIL, glicosilada

El análisis SEC para las tres construcciones Fab-sc purificadas de TRAIL reveló un solo pico de proteína para todas las proteínas que indican fracciones definidas solubles de proteínas (> 95% de trimeros). El MW aparente calculado para las proteínas (basado en la calibración de la columna) indica fuertemente una asociación trimérica de los dominios de TNF-SF para las proteínas purificadas. Ninguna de las proteínas analizadas mostró indicios de agregación (Figuras 18, 19, 20).

Comparando el "Fab-sc-TRAIL-R2-SNSN" potencialmente glicosilado con el "Fab-sc-TRAIL-R2-SSSS" no glicosilado indica una diferencia significativa del MW nativo evidente que se debe a la glicosilación de Fab-sc-TRAIL -SNSN (específico para R2).

Se conoce la expresión de los miembros sc-TNF-SF como proteína de fusión con un fragmento fv de anticuerpo para facilitar la agregación de la proteína. El principio de construcción de las variantes de Fab-sc-TRAIL no reveló agregación alguna de las variantes TRAIL expresadas y, por lo tanto, es beneficioso con respecto a la solubilidad de la proteína.

## 6.3 Glicosilación diferencial de variantes de sc-TRAIL-enlazador



La glicosilación de proteínas puede ser beneficiosa para construcciones de sc-TNF-SF recombinantes con respecto a la inmunogenicidad y la estabilidad potenciales. Con el fin de obtener la glicosilación de la construcción sc-TRAIL, se diseñaron secuencias de enlazador específicas que contenían putativos sitios glicosilados enlazados a N en las posiciones definidas (véase la Figura 21-A). La expresión recombinante y el subsiguiente análisis de transferencia Western revelaron que la posición respectiva de la asparagina (N) dentro de la secuencia de enlazador es importante para la subsiguiente glicosilación de la proteína. Sorprendentemente, se identificó que la posición de enlazador preferencial de la asparagina glicosilada estaba en la posición "2" según se describe en la Figura 21-A, (G S G S G N G S). Si la asparagina se localiza en otras posiciones (p. ej., la posición "1" [G S G N G S G S] véase la Figura 21-A), se abole la glicosilación de la o las asparaginas respectivas. Este aspecto podría ser confirmado por análisis de transferencia Western de las diferentes variantes sc-TRAIL. Si las dos asparaginas de enlazador 1 y enlazador 2 se localizaron en la posición "2", se podía observar una glicosilación significativa dependiente del desplazamiento del MW para la respectiva variante sc-TRAIL (Figura 22). Un desplazamiento del MW de la variante de enlazador sc-TRAIL glicosilada también se pudo confirmar mediante el cálculo del MW aparente después del análisis SEC (Figura 18, 19). El Fab-sc-TRAIL(específico para R2)SSSS no glicosilada tiene un MW claramente inferior (68 kDa) en comparación con Fab-sc-TRAIL(específico para R2)SNSN (87 kDa).

Basado en este análisis los autores de la invención reivindican la glicosilación diferencial de las construcciones sc-TRAIL mediante la modificación de la posición de los asparaginas dentro de la o las secuencias de enlazador. La glicosilación protege la secuencia de enlazador hacia la degradación proteolítica y podría estabilizar la proteína. Además, la glicosilación de la secuencia de enlazador potencialmente impide el reconocimiento de la secuencia de enlazador por parte del sistema inmune y reduce potencialmente la inmunogenicidad de la proteína. Por lo tanto, la glicosilación de la secuencia de enlazador es beneficiosa con respecto a la inmunogenicidad y la estabilidad proteolítica de las construcciones sc-TRAIL y tiene una influencia potencial sobre la semivida de la proteína. La glicosilación diferencial específica para el enlazador se puede utilizar para modificar la inmunogenicidad y la estabilidad de los miembros de TNF-SF recombinantes.

### 6.3. Expresión y análisis de un sc-TRAIL con secuencia de enlazador prolongada y residuos de tallo N-terminales (sc-TRAIL-(95-281)-long)

En el documento WO/2005/103077 se describe un polipéptido TRAIL-fusión de cadena sencilla, denominado en esta memoria sc-TRAIL-(95-281)-long, en el que cada uno de los módulos TRAIL comprenden los residuos 95 a 281 de SEQ ID NO: 10. Los módulos TRAIL están enlazados mediante el enlazador Glicina Serina que comprende al menos 12 aminoácidos (GGGSGGGSGGGG). En comparación con los módulos de TRAIL de la presente invención (que comprende los residuos 121 -281 de SEQ ID NO: 10), 25 aminoácidos adicionales, incluyendo la región del tallo, están presentes en cada uno de los módulos de TRAIL adyacentes.

Con el fin de analizar la influencia de la secuencia de enlazador en construcciones-sc TRAIL, se analiza sc-TRAIL-(95-281)-long. La expresión, purificación y subsiguiente análisis SEC revela que sc-TRAIL-(95-281)-long con el enlazador de 12 aa y la secuencia de tallo adicional se expresa y se secreta al sobrenadante de cultivo celular de células HEK293T. Sin embargo, el análisis SEC de la proteína purificada indica que sc-TRAIL-(95-281)-long muestra múltiples picos que comprenden una gran cantidad de proteína en una forma oligomerizada o agregada. La agregación de sc-TRAIL-(95-281)-long es un efecto directo de las secuencias de enlazador prolongadas en combinación con los residuos adicionales del tallo N-terminal. Los resultados indican que el enlazador más largo utilizado en esta construcción conduce a propiedades de agregación incrementadas de la construcción.

## 7. Construcción de polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden uno o más dominios adicionales

### 7.1. Ensamblaje de fragmentos solubles de TNF-SF y de anticuerpos conocidos de la técnica

Se conoce de la técnica que dominios de citoquinas de TNF-SF solubles pueden fusionarse a fragmentos de anticuerpos con el fin de obtener una trimerización y/o dimerización de trímeros. Se han construido proteínas de fusión scFv-TNF-SF de cadena sencilla que consisten en un anticuerpo de cadena única y que comprende un dominio soluble de TNF-RBD y la región del tallo. Los trímeros correspondientes consisten en tres anticuerpos de cadena sencilla y tres dominios solubles (Fig. 7).

Además, se han construido proteínas de fusión Fc-TNF-SF, en donde cada una de las proteínas de fusión comprende un dominio Fc intramolecular N-terminal y un dominio soluble C-terminal (Figura 8). La dimerización de los dominios solubles se logra mediante el ensamblaje de dos dominios Fc a través de puentes disulfuro. Subsiguientemente se obtienen trímeros mediante una combinación de dos dominios solubles de una proteína de fusión Fc-TNF-SF y un dominio soluble de otra proteína de fusión Fc-TNF-SF. Como se puede deducir a partir de la Fig. 4, la dimerización de trímeros también está mediada por la fusión del Fc-TNF-SF N-terminal. En conclusión, por

cada uno de los dímeros del trímero están presentes tres fragmentos de anticuerpo Fc. Sin embargo, tales proteínas de fusión son propensas a formar agregados de peso molecular más alto, lo que representa una desventaja importante.

## 7.2 Las proteínas de fusión de la invención que comprenden uno o más dominios adicionales

- 5 Las proteínas de fusión de la invención que comprenden uno o más dominios adicionales se pueden construir de varias maneras. En lo que sigue, la construcción de proteínas de fusión con dominios adicionales se ilustra con el anticuerpo pertuzumab dirigido contra el antígeno de superficie celular ErbB2.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 33:

```

1   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA
   PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY
61  NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL
   GPSFYFDYWG QGTLVTVSSA
121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
   NSGALTSGVH TFPVQLQSSG
181 LYSLSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC
    
```

- 10 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 34

```

1   DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDVS IGVAWYQQKP
   GKAPKLLIYS ASYRYTGVPV
61  RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ
   GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
121 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
   ESVTEQDSKD STYLSSTLT
181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
    
```

### 7.2.1

En una realización, el polipéptido de fusión de la invención comprende, además, un fragmento de anticuerpo Fab N- o C-terminal (Fig. 9A).

- 15 La fusión de un fragmento de anticuerpo Fab al extremo N del polipéptido de fusión scTNF-SF puede realizarse mediante las dos estrategias siguientes:

(i) La secuencia de la cadena pesada se extiende por otros aminoácidos de la región bisagra de IgG1 y se fusiona a la proteína de fusión de TNF-SF de cadena sencilla.

La región bisagra de IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 35:

20 ....KSC<sub>2</sub>DKTHTC<sub>2</sub>PPC<sub>3</sub>PAPE ...

En una realización preferida, el dominio Fab se elige de modo que la cisteína C-terminal de la cadena pesada (C1 de la región bisagra) termina en el dominio CH1. Se requiere esta cisteína para formar un enlace disulfuro a la cadena ligera.

- 25 El subsiguiente enlazador comprende porciones de la región bisagra de IgG (p. ej., DKTHT o DKT), sin embargo sin cisteínas adicionales de la región bisagra. Alternativamente, se utiliza un enlazador de glicina/serina. Debido a la ausencia de cisteínas adicionales, se obtiene una proteína de fusión monomérica que comprende dos cadenas de polipéptidos. El enlazador tiene preferiblemente una longitud de 3-15 aminoácidos. Más preferiblemente, el enlazador se selecciona del enlazador 1-7 según se muestra a continuación.

- 30
1. DKTHTG(S)a(G)b; (a = 0-5; b = 0 ó 1)
  2. DKTHTGS(S)a(GS)BG(S)c (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)
  3. DKTG(S)a(G)b; (a = 0-5; b = 0 ó 1)
  4. DKTG(S)a(GS)BG(S)c (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)
  5. SSG(S)a(GS)BG(S) c (a, b = 0,1 -6; c = 0 ó 1)

6. SS(GGGS)aG(S)b (a = 0, 4.1, b = 0 ó 1)  
 7. GSPGSSSSSS(G)a (a = 0 o

5 Secuencias de aminoácidos preferidas con el módulo de cadena pesada situado N-terminal al módulo scTNF-SF se muestra en la SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 49. Para fines de producción, estas cadenas polipeptídicas se coexpresan con el polipéptido de cadena ligera de Fab (SEQ ID NO: 40) para finalmente lograr los polipéptidos de fusión Fab-scTRAIL, (ii) la secuencia de la cadena ligera está fusionada a la proteína de fusión de TNF-SF de cadena sencilla.

10 La región constante de la cadena ligera (p. ej., SEQ ID NO: 34) termina con un residuo cisteína C-terminal. Este residuo puede ser puenteado de forma covalente con la cisteína C1 bisagra de la cadena pesada. Preferiblemente, los enlazadores 1-7 como se muestra a continuación se utilizan para la conexión entre la secuencia de la cadena ligera y la proteína de fusión TNF-SF. Se prefieren los enlazadores 5-7 (véase arriba).

Preferiblemente, el último aminoácido en el enlazador adyacente al módulo de citoquina es Gly o Ser. En lo siguiente, se muestran secuencias de enlazadores preferidas:

15 Además, el enlazador puede comprender motivos de N-glicosilación (NXS/T, en donde X puede ser cualquier aminoácido).

Una realización de las secuencias de aminoácidos con el módulo de cadena ligera situado N-terminal al módulo scTNF-SF se muestra en la SEQ ID NO: 51.

20 En el caso de las proteínas de fusión Fab-scTNF-SF, es necesaria la co-expresión de dos cadenas de polipéptidos para lograr el correcto ensamblaje del módulo de Fab además del módulo scTNF-SF (véase la figura 9A). Los módulos de cadena pesada y ligera de Pertuzumab (SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34) estaban equipados con un péptido señal, retro-traducido y los genes sintéticos resultantes (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42) estaban genéticamente fusionados aguas arriba de los módulos de genes específicos para scTRAILwt o scTRAILR2 (SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32). Ejemplos para las casetas de genes resultantes se muestran en SEQ ID NO: 46, 48 y 50.

25 Después de la subclonación en vectores de expresión apropiados, se utilizó una selección de los plásmidos resultantes para la expresión de proteína transitoria en células HEK293T. Los plásmidos de expresión TRAIL de cadena pesada o TRAIL de cadena ligera fueron transfectados ya sea solos o en combinación con los vectores codificadores de la cadena ligera o de la cadena pesada necesarios del fragmento Fab (FIGURA 26). Sorprendentemente, la combinación de módulos dentro de las proteínas de fusión influyó en la estabilidad relativa de la proteína scTRAIL durante la expresión basada en la secreción. Si el módulo de la cadena ligera del dominio Fab está fusionado N-terminal al dominio scTRAIL (ejemplificado en la SEQ ID NO: 51), el producto de expresión es estable por sí mismo y es secretado, cuando se expresa por separado (pistas 1-4, figura 26). Se puede por lo tanto esperar que, cuando un polipéptido de fusión de este tipo se coexpresa con un módulo de cadena pesada, se formarán dos especies de proteínas principales durante un proceso de producción potencial: (1) la proteína de fusión Fab-scTRAIL que consiste en dos cadenas polipeptídicas y (2) como contaminación una proteína de fusión scTRAIL de cadena ligera sin un dominio Fab funcional. Por lo tanto, fusionando el módulo de la cadena pesada N-terminal al módulo scTNF-SF para la expresión se prefiere evitar esta desventaja técnica.

30

35

40 Un análisis funcional de proteínas de fusión scTRAIL recombinantes que comprenden Fab de la invención con el módulo de cadena pesada fusionado en posición N-terminal al módulo scTRAIL (Fab-scTRAILR2-SNSN o Fab-scTRAILwt- SNSN) se muestra en la figura 28. Como etapa de purificación final se empleó la cromatografía de exclusión por tamaño tal como se ilustra en las figuras 19 y 20.

45 Puede lograrse fácilmente una bioactividad superior en comparación con ligandos homotriméricos solubles mediante el uso de ligando de la superfamilia de TNF artificialmente reticulado o unido a la membrana. Por lo tanto, el enriquecimiento local de construcciones TRAIL de cadena sencilla (scTRAIL) en células que expresan el antígeno Her2 a través del fragmento Fab selectivo para Her2 ("Pertuzumab") fusionado a estas proteínas scTRAIL debería incrementar su bioactividad citotóxica. Del mismo modo, el bloqueo de los sitios de unión Her2 en las células mediante pre-incubación con el fragmento Fab específico para Her2 (Pertuzumab-Fab) sólo debería disminuir la bioactividad citotóxica de proteínas de fusión Fab-scTRAIL. Tal como se muestra en la Figura 28A, construcciones scTRAIL inducen la muerte de células HT1080, ya que la viabilidad disminuye con el aumento de la concentración de proteína. Por consiguiente, la pre-incubación de células HT1080 con el fragmento Fab (Pertuzumab-Fab), seguido por la co-incubación con las construcciones Fab-scTRAIL (Fab-scTRAILR2-SNSN o Fab-scTRAILwt-SNSN) durante la noche, redujo la actividad citotóxica de las construcciones Fab-scTRAIL (figura 28B), mientras que el Fab solamente indujo ninguna muerte celular.

50

Un efecto técnico incrementado puede lograrse mediante el uso de ligandos artificialmente reticulados o unidos a una membrana de la superfamilia de TNF, lo cual resulta especialmente en una bioactividad superior en comparación con un ligando homotrimérico soluble. Por lo tanto el enriquecimiento local de ligandos o ligandos de cadena sencilla tal como se ilustra por TRAIL de cadena sencilla (scTRAIL) en células o en células vecinas debería aumentar la bioactividad de estas proteínas de fusión. El enriquecimiento local (o fijación como objetivo) de estos ligandos de cadena sencilla puede ser inducido específicamente, por ejemplo mediante la fusión de los ligandos de cadena sencilla con secuencias de aminoácidos que se unen a cualquier antígeno presente en las células tal como, por ejemplo, células tumorales. Ejemplos de secuencias de unión a antígeno se pueden derivar de anticuerpos tales como fragmentos scFv o Fab. Ejemplos de antígenos expresados sobre células diana pueden ser receptores tales como de la familia EGFR o cualquier otro antígeno al que se pueden generar un anticuerpo de unión. De especial interés en este contexto son los antígenos de superficie de células específicos para las células tumorales o cancerosas.

### 7.2.2

En otra realización, el polipéptido de fusión de la invención comprende, además, un fragmento de anticuerpo scFv N- o C-terminal adicional (Fig. 9b).

En esta realización se pueden utilizar enlazadores 5-7 según se describe anteriormente. Además, los enlazadores pueden comprender motivos de N-glicosilación.

Un fragmento Fv-pertuzumab de cadena sencilla preferido para la fusión a la proteína de fusión de citoquina de cadena sencilla puede comprender aminoácidos Glu1-Ser119 de SEQ ID NO: 33 y Asp-Lys107 o Thr109 de SEQ ID NO: 34. Los fragmentos VH y VL pueden estar conectados por un enlazador.

Una realización de un dominio scFv de pertuzumab se muestra en el siguiente SEQ ID NO: 36:

```

1  METDTLLLVV LLLWVPAGNG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
   SCAASGFTFT DYTMDWVRQA
61  PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY
   LQMNSLRAED TAVYYCARNL
121 GPSFYFDYWG QGTLVTVSSG GGGSGGGGSG GGGSDIQMTQ
   SPSSLSASVG DRVTITCKAS
181 QDVSIGVAWY QQKPGKAPKL LIYSASYRYT GVPSRFSGSG
   SGTDFTLTIS SLQPEDFATY
241 YCQQYYIYPY TFGQGTKVEI KRT

```

Los aminoácidos 1 -20 (subrayado) constituyen un péptido señal secretor N-terminal.

### 7.2.3

En una realización adicional, el polipéptido de fusión de la invención comprende un fragmento de anticuerpo Fc N- o C-terminal adicional (Figs. 10 y 11).

Preferiblemente, el dominio del fragmento de anticuerpo Fc se deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina G humana, en particular de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humana. En una realización especialmente preferida, la secuencia de aminoácidos del dominio Fc se muestra en la SEQ ID NO: 37.

```

1  KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP
   EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
61  YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
   EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
121 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
   AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
181 LDSQGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
   QKSLSLSPGK

```

Los aminoácidos Lys1-Glu16 definen la región bisagra.

Para una fusión C-terminal (Fig. 11) el dominio Fc comprende preferiblemente el dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO: 37) y una parte o la región bisagra completa, p. ej., la región bisagra completa o la región de bisagra a partir del aminoácido Asp4.

5 Enlazadores preferidos para la conexión de un fragmento de anticuerpo Fc C-terminal (p. ej., Fig. 11) se muestran en lo que sigue:

Enlazador 8

scCD95L/scTRAIL....GG(P/S)<sub>a</sub>(GS)<sub>b</sub>(G/S)<sub>c</sub>**KSCDKTHTCPPCPAPE** ... (a = 0 ó 1, b = 0-8; c = 0-8)

Enlazador 9

scCD95L/scTRAIL....GG(P/S)<sub>a</sub>(**GSSGS**)<sub>b</sub>**GS(G/S)**<sub>c</sub>**DKTHTCPPCPAPE**... (a = 0 ó 1, b = 0-8; c = 0-8)

10 Enlazador 10

scCD95L/scTRAIL....**GG(P/S)**<sub>a</sub>(**S**)<sub>b</sub>(**GS**)<sub>c</sub>(**G/S**)<sub>d</sub>**DKTHTCPPCPAPE** ... (a = 0 ó 1, b = 0-8; c = 0-8; d = 0-8)

Todos los enlazadores comienzan con GlyGly, teniendo en cuenta, sin embargo, que el aminoácido C-terminal de TRAIL es una Gly. En la posición 3 del enlazador, alternativamente están presentes Pro o Ser. El enlazador 8 comprende la cisteína Cys1 de la cadena pesada.

15 Cabe señalar que los enlazadores 8-10 son también adecuados para la fusión C-terminal de otros polipéptidos, p. ej., una proteína de fusión scTNF-SF adicional.

En detalle, el módulo scTRAILwt (SEQ ID NO: 28), el módulo scTRAIL(específico para R2) (SEQ ID NO: 29) y el módulo scCD95L (SEQ ID NO: 27) se fusionaron en posición N-terminal al dominio Fc de IgG1 humana, comenzando con Asp4 de SEQ ID NO: 37 que emplea cuatro elementos de enlazador como se muestra en la Tabla 2.

Fusión Fc	Secuencia de aminoácido del elemento enlazador
FC01	...(G)GSPGSSSSSGSDKTH...
FC02	...(G)GSPGSSSSSGSDKTH...
FC03	...(G)GSPGSSSGSDKTH...
FC04	...(G)GSSDKTH....

20 Tabla 2: Secuencias que enlazan el dominio Fc de modo C-terminal al módulo de scTNF-SF. Está subrayado el ácido amino N-terminal del dominio CH2 de IgG1. La glicina N-terminal de la secuencia de enlace se muestra entre paréntesis. Para las proteínas TNF-SF con una glicina como el aminoácido C-terminal (p. ej., TRAIL), la glicina N-terminal de la secuencia de enlace pertenece formalmente al módulo de scTNF-SF.

25 Para la purificación y caracterización, una Strep-tag II (secuencia de aminoácidos WSHYPQFEK) se colocó en posición C-terminal con respecto al dominio Fc. Esta etiqueta de afinidad estaba enlazada al dominio CH3 por un elemento enlazador flexible (secuencia de aminoácidos SSSSSSA), en sustitución del residuo de lisina C-terminal de la secuencia CH3. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión scTNF-SF, así como para los módulos de proteínas descritos se retro-tradujeron y su uso de codones se optimizó para la expresión basada en células de mamífero. La síntesis de genes fue realizada por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). Las casetes de expresión para proteínas de fusión mayores fueron ensambladas por procedimientos de clonación de ADN comunes que comienzan con módulos de ADN de tamaño adecuado y el patrón de enzima de restricción adecuado. A modo de ejemplo, la casete de gen resultante para la proteína de fusión TRAILwt FC01 de cadena sencilla (scTRAILwt-FC01) se muestra en SEQ ID NO: 44 y la secuencia de la proteína codificada se muestra en la SEQ ID NO: 43. Los casetes de genes que codifican las variantes de enlazador acortadas (Tabla 1) se generaron mediante estrategias de subclonación basadas en PCR, partiendo de SEQ ID NO: 44. Los casetes de expresión finales se liberaron de vectores de clonación intermedios y se subclonaron en pCDNA4-HisMax-cadena principal, utilizando sitios del plásmido únicos Hind-III, Not-I o Xba-I. Para el ensamblaje de las proteínas de fusiones Fab y Fc, se introdujo un sitio único SgS-I en la cadena principal del vector, reemplazando al sitio Not-I. Todas las casetes de expresión se verificaron rutinariamente mediante secuenciación de ADN. Las proteínas se expresaron transitoriamente en células HEK293T y los sobrenadantes de cultivo de células se vigilaron con respecto a su actividad pro-apoptótica. Tal como se muestra en la figura 27, las proteínas de fusión scTRAIL-Fc de la invención fueron capaces de inducir un aumento pronunciado en la actividad de caspasa, lo que confirma la potencia de la dimerización basada en Fc de

dos módulos scTRAILwt. Se obtuvieron resultados similares para las proteínas de fusión Fc scTRAIL(específico paraR2) (datos no mostrados).

Si un fragmento de anticuerpo Fc se fusiona al extremo N de una proteína de fusión scTNF-SF (véase la Fig. 10), la secuencia de aminoácidos del módulo Fc es, preferiblemente, como se muestra en SEQ ID NO: 38:

```

1  METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPFPCP APELLGGPSV
   FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
61  CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
   RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
121 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
   NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
181 WESNGQPENÑ YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
   NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
5  241 LSLSPG

```

Los aminoácidos 1-20 (subrayados) constituyen un péptido señal secretor N-terminal.

Para conectar el módulo Fc a la proteína de fusión ScTNF-SF, preferiblemente se utilizan enlazadores Gly/Ser. Todos los enlazadores comienzan preferiblemente con una serina y terminan preferiblemente con glicina o serina. Secuencias de enlazadores preferidos 11-12 se muestran en lo que sigue:

- 10 11. (S)<sub>a</sub>(GS)<sub>b</sub>G(S)<sub>c</sub> (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)  
 12. S(GGG)<sub>a</sub>G(S)<sub>c</sub> (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)

### 7.3 Dimerización de las proteínas de fusión de cadena sencilla de la invención

#### 7.3.1 Polipéptidos de fusión de cadena única que comprenden un dominio adicional

Las proteínas de fusión triméricas de la invención pueden además ser dimerizadas.

- 15 En una realización, la dimerización se obtendrá si el extremo C de una primera proteína de fusión está conectado directamente al extremo N de una segunda proteína de fusión a través de una estructura de enlazador como se define en esta memoria (Fig. 12).

- 20 En otra realización, una proteína de fusión de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo Fab como un dominio adicional, puede ser conectada a través de un enlazador como se define en esta memoria directamente con una proteína de fusión de la invención o indirectamente a través de un fragmento de anticuerpo scFv fusionado a una proteína de fusión de la invención (Fig. 13). Con ello, se lleva a cabo la dimerización de las proteínas de fusión triméricas de la invención.

- 25 En otra realización, la dimerización de trómeros se puede obtener a través del ensamblaje de dos proteínas de fusión de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo Fab como un dominio adicional (Fig. 14). En este caso, se forman puentes disulfuro intermoleculares.

Para la construcción de fragmentos Fab dimerizantes en posición N-terminal al dominio scTNF-SF (p. ej., Fig. 14), se utilizan preferiblemente los residuos cisteína naturales de la región bisagra de IgG (SEQ ID NO: 35).

- 30 Preferiblemente, la cisteína C-terminal de la secuencia de Fab corresponde al residuo C1 de la región bisagra, el cual forma un enlace disulfuro con la cadena ligera. La segunda cisteína C2 se puede utilizar para el enlace covalente de dos módulos de Fab. Un tercer residuo cisteína C3 puede estar abierto o estar enlazado con el C3 de la cadena vecina. Enlazadores preferidos entre la secuencia de la cadena pesada de Fab y el extremo N del dominio scTNF-SF son enlazadores 13-22 tal como se muestra a continuación.

13. DKTHT CPGSS(GS)<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
14. DKTHT CPGSS<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
15. DKTHT C(GSSGS)<sub>a</sub>GSG(S)<sub>b</sub>
16. DKTHT CGSS(GS)<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
17. DKTHT CGSS<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
18. DKTHT C(GSSGS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
19. DKTHT CPPCPGSSGSGSGS(G)<sub>b</sub>
20. DKTHT CPPCP(GSSGS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
21. DKTHT CPPCPGSS(GS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
22. DKTHT CPPCPGSS<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>

Además, los enlazadores pueden ser modificados mediante la incorporación de motivos de N-glicosilación según se describe anteriormente.

5 En una realización adicional, la dimerización de las proteínas de fusión de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo Fc como un dominio N- y/o C-terminal adicional, se puede obtener mediante la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre dos de dichas proteínas de fusión. En ese caso, sólo un fragmento de anticuerpo Fc está presente por dímero de una proteína de fusión trimérica. De este modo, en contraposición con las proteínas de fusión con fragmento de anticuerpo Fc de la técnica, no es muy probable la formación de agregados de mayor peso molecular.

### 10 7.3.2 Polipéptidos de fusión de cadena sencilla que comprenden una pluralidad de dominios adicionales

El polipéptido de fusión de cadena sencilla puede comprender uno o más dominios adicionales, p. ej., un fragmento de anticuerpo adicional y/o un dominio de fijación como objetivo adicional y/o un dominio de citoquinas adicional.

15 Una proteína de fusión de la invención que comprende un fragmento de anticuerpo Fc como un dominio adicional puede ser conectada a una mayor fragmento de anticuerpo Fab o scFv a través del extremo N de un fragmento de anticuerpo Fc fusionado en el extremo N (Fig. 15) o directamente a través de su extremo N-terminal a través de una estructura de enlazador adicional (Fig. 16), si el fragmento de anticuerpo Fc está conectado a la proteína de fusión de la invención a través de su extremo C.

20 Además de un fragmento de anticuerpo adicional o en lugar del fragmento de anticuerpo adicional, una citoquina adicional, preferiblemente una interleuquina, puede estar conectada a la proteína de fusión. De este modo, es posible obtener una combinación de un scCD95L agonista y una molécula scCD95L antagonista o, alternativamente, combinaciones de scTRAIL (específico para R1) y scTRAIL (específico para R2).

Dichas proteínas de fusión son especialmente útiles para la inducción de la apoptosis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Apogenix GmbH

5 <120> Moléculas de una sola cadena de TNFSF

<130> scl

10 <140> PCT/EP2009/  
<141> 18-07-2009

<160> 53

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <220>  
<221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
<223> LTA humano

25 <400> 1

Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Cys Gly Thr Thr  
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala  
20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala  
35 40 45

Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala  
50 55 60

Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg  
65 70 75 80

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn  
85 90 95

Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln  
100 105 110

Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro  
115 120 125

Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe  
130 135 140

His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln  
145 150 155 160

Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr  
165 170 175



Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val  
 180 185 190

Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu  
 195 200 205

<210> 2  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> TNFa humano

10 <400> 2

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe  
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe  
 35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro  
 50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
 65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro  
 85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu  
 100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser  
 115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly  
 130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
 165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu  
 180 185 190

ES 2 538 122 T3

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu  
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly  
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
225 230

- <210> 3
- <211> 244
- <212> PRT
- 5 <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 10 <223> LTA humano

- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <223> LTB humano

- 15 <400> 3

Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Ala Val Ala Gly Ala Thr Ser Leu Val Thr Leu  
20 25 30

Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro  
35 40 45

Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln  
50 55 60

Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro  
85 90 95

Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe  
100 105 110

Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro  
115 120 125

Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg  
130 135 140

Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg  
145 150 155 160

ES 2 538 122 T3

Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu  
 165 170 175  
 Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala  
 180 185 190  
 Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly  
 195 200 205  
 Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser  
 210 215 220  
 His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Val Met Val Gly

<210> 4  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> OX40L humana  
 10 <400> 4

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg  
 1 5 10  
 Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln  
 20 25 30  
 Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser  
 35 40 45  
 Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn  
 85 90 95  
 Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu  
 100 105 110  
 Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln  
 115 120 125  
 Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr

ES 2 538 122 T3

130 135 140  
 Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn  
 165 170 175  
 Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu  
 180

5 <210> 5  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> CD40L humana

<400> 5

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

ES 2 538 122 T3

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser  
 180 185 190  
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala  
 195 200 205  
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His  
 210 215 220  
 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn  
 225 230 235 240  
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe  
 245 250 255  
 Gly Leu Leu Lys Leu  
 260

<210> 6  
 <211> 281  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> CD95L humana

<400> 6

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

15

20

ES 2 538 122 T3

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg  
 130 135 140

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu  
 145 150 155

Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr  
 165 170 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr  
 180 185 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met  
 210 215 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala  
 225 230 235 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His  
 245 250 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser  
 260 265 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu  
 275 280

- <210> 7
- 15 <211> 193
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- 20 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <223> CD27L humana

<400> 7

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly  
 1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile  
 20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu  
 35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His  
 50 55 60

ES 2 538 122 T3

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu  
 85 90 95  
 Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu  
 100 105 110  
 Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu  
 115 120 125  
 Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg  
 130 135 140  
 Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu  
 165 170 175  
 Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg  
 180 185 190

Pro

5 <210> 8  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> CD30L humana

<400> 8

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly  
 20 25 30  
 Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu  
 35 40 45  
 Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg  
 50 55 60  
 Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys

ES 2 538 122 T3

85 90 95

Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys  
 100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp  
 115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln  
 130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu  
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val  
 165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln  
 180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val  
 195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val  
 210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp  
 225 230

- <210> 9
- <211> 254
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 10 <223> CD137L humana

<400> 9

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro  
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val  
 20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe  
 35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser  
 50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp  
 65 70 75 80



Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val  
 85 90 95  
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp  
 100 105 110  
 Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu  
 115 120 125  
 Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe  
 130 135 140  
 Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala  
 165 170 175  
 Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala  
 180 185 190  
 Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala  
 195 200 205  
 Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His  
 210 215 220  
 Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu  
 245 250

<210> 10  
 <211> 281  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 10 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> TRAIL humana

<400> 10

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys  
 1 5 10 15  
 Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala  
 20 25 30  
 Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys  
 35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr  
 50 55 60  
 Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val  
 65 70 75 80  
 Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser  
 85 90 95  
 Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro  
 100 105 110  
 Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly  
 115 120 125  
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu  
 130 135 140  
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly  
 145 150 155 160  
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile  
 165 170 175  
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe  
 180 185 190  
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln  
 195 200 205  
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys  
 210 215 220  
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile  
 245 250 255  
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala  
 260 265 270  
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 275 280

<210> 11  
 <211> 317  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> RANKL humana

<400> 11

ES 2 538 122 T3

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu  
1 5 10 15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala  
20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met  
35 40 45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val  
50 55 60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn  
85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile  
100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln  
115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys  
130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu  
145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro  
165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly  
180 185 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val  
195 200 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His  
210 215 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val  
225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met  
245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe

260 265 270  
 Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu  
 275 280 285  
 Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp  
 290 295 300  
 Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp  
 305 310 315

5 <210> 12  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> TWEAK humana

<400> 12

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

ES 2 538 122 T3

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu  
 180 185 190  
 Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg  
 195 200 205  
 Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu  
 210 215 220  
 Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu  
 225 230 235 240  
 Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His  
 245

<210> 13  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> APERIL\_ver1 humana

10 <400> 13

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

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe  
 165 170 175  
 Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr  
 180 185 190  
 Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr  
 195 200 205  
 Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile  
 210 215 220  
 Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro  
 225 230 235 240  
 His Gly Thr Phe Leu Gly Leu  
 245

<210> 14  
 <211> 250  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> APERIL\_ver2 humana

<400> 14

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu  
 35 40 45  
 Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg  
 50 55 60  
 Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp  
 65 70 75 80  
 Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn  
 85 90 95  
 Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys  
 100 105 110

ES 2 538 122 T3

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys  
 115 120 125  
 Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg  
 130 135 140  
 Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala  
 145 150 155 160  
 Gly val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp val Thr Phe  
 165 170 175  
 Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr  
 180 185 190  
 Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr  
 195 200 205  
 Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile  
 210 215 220  
 Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro  
 225 230 235 240  
 His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu  
 245 250

<210> 15  
 <211> 285  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> BAFF humana

<400> 15

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro  
 20 25 30  
 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val  
 50 55 60  
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly

ES 2 538 122 T3

85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu  
 100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn  
 115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln  
 130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys  
 145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser  
 165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr  
 180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met  
 195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu  
 210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu  
 225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly  
 245 250 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu  
 260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu  
 275 280 285

<210> 16  
 <211> 240  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> LIGHT humana

<400> 16

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser  
 20 25 30

15



ES 2 538 122 T3

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

<210> 17  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> TL1A humana

10 <400> 17

Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu  
 1 5 10 15

ES 2 538 122 T3

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser  
 20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala  
 35 40 45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu  
 50 55 60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser  
 65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg  
 85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn  
 100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr  
 115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser  
 130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser  
 145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser  
 165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr  
 180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp  
 195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp  
 210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys  
 225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu  
 245 250

<210> 18  
 <211> 177  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 10 <223> GITRL humana

<400> 18

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

Ser

- <210> 19
- <211> 391
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 10 <223> EDA-A1 humana

<400> 19

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala

ES 2 538 122 T3

	20		25		30										
Arg	Ala	Gly 35	Glu	Gly	Asn	Ser	Cys 40	Leu	Leu	Phe	Leu	Gly 45	Phe	Phe	Gly
Leu	Ser 50	Leu	Ala	Leu	His 55	Leu	Thr	Leu	Cys	Cys 60	Tyr	Leu	Glu	Leu	
Arg 65	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg 70	Glu	Arg	Gly	Ala	Glu 75	Ser	Arg	Leu	Gly	Gly 80
Ser	Gly	Thr	Pro	Gly 85	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly 95	Leu
Asp	Pro	Asp	Ser 100	Pro	Ile	Thr	Ser	His 105	Leu	Gly	Gln	Pro	Ser	Pro	Lys
Gln	Gln	Pro 115	Leu	Glu	Pro	Gly	Glu 120	Ala	Ala	Leu	His	Ser 125	Asp	Ser	Gln
Asp 130	Gly	His	Gln	Met	Ala	Leu 135	Leu	Asn	Phe	Phe	Phe 140	Pro	Asp	Glu	Lys
Pro 145	Tyr	Ser	Glu	Glu	Glu 150	Ser	Arg	Arg	Val	Arg 155	Arg	Asn	Lys	Arg	Ser 160
Lys	Ser	Asn	Glu	Gly 165	Ala	Asp	Gly	Pro	Val 170	Lys	Asn	Lys	Lys	Lys 175	Gly
Lys	Lys	Ala	Gly 180	Pro	Pro	Gly	Pro	Asn 185	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro 190	Pro	Gly
Pro	Pro	Gly 195	Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly 200	Ile	Pro	Gly	Ile 205	Pro	Gly	Ile
Pro	Gly 210	Thr	Thr	Val	Met	Gly 215	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly 220	Pro	Pro	Gly
Pro 225	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly 230	Leu	Gln	Gly	Pro	Ser 235	Gly	Ala	Ala	Asp	Lys 240
Ala	Gly	Thr	Arg	Glu 245	Asn	Gln	Pro	Ala	Val 250	Val	His	Leu	Gln	Gly 255	Gln
Gly	Ser	Ala	Ile 260	Gln	Val	Lys	Asn	Asp 265	Leu	Ser	Gly	Gly	Val 270	Leu	Asn
Asp	Trp	Ser 275	Arg	Ile	Thr	Met	Asn 280	Pro	Lys	Val	Phe	Lys 285	Leu	His	Pro
Arg	Ser 290	Gly	Glu	Leu	Glu	Val 295	Leu	Val	Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Ile	Tyr

ES 2 538 122 T3

Ser Gln Val Glu Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr  
 305 310 315 320  
 Glu Val Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile  
 325 330 335  
 Glu Thr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys  
 340 345 350  
 Leu Leu Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp  
 355 360 365  
 Ile Ser Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg  
 370 375 380  
 Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser  
 385 390

- <210> 20
- <211> 389
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 10 <223> EDA-A2 humana

<400> 20

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala  
 20 25 30  
 Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly  
 35 40 45  
 Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu  
 50 55 60  
 Arg Ser Glu Leu Arg Arg Glu Arg Gly Ala Glu Ser Arg Leu Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu  
 85 90 95  
 Asp Pro Asp Ser Pro Ile Thr Ser His Leu Gly Gln Pro Ser Pro Lys  
 100 105 110  
 Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln  
 115 120 125

Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys  
 130 135 140  
 Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly  
 165 170 175  
 Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 180 185 190  
 Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile  
 195 200 205  
 Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 210 215 220  
 Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln  
 245 250 255  
 Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn  
 260 265 270  
 Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro  
 275 280 285  
 Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr  
 290 295 300  
 Ser Gln Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr Glu Val  
 305 310 315 320  
 Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile Glu Thr  
 325 330 335  
 Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys Leu Leu  
 340 345 350  
 Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp Ile Ser  
 355 360 365  
 Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg Leu Gly  
 370 375 380  
 Glu Ala Pro Ala Ser  
 385

- <210> 21
- <211> 8
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>

<223> Enlazador

<400> 21

**Gly Gly ser Gly Ser Gly ser Gly**  
**1 1 5**

5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Enlazador

<400> 22

15

**Gly Gly ser Gly Ser Gly**  
**1 1 5**

<210> 23

<211> 4

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

25

<400> 23

**Gly Gly Ser Gly**  
**1**

<210> 24

<211> 8

30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

35

<400> 24

**Gly Gly ser Gly Asn Gly ser Gly**  
**1 1 5**

<210> 25

<211> 8

40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Enlazador

45

<400> 25

**Gly Gly Asn Gly Ser Gly ser Gly**  
**1 1 5**

<210> 26  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> Enlazador

10 <400> 26

Gly Gly Asn Gly Ser Gly  
 1 5

<210> 27  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> proteína de fusión scCD95L

20 <400> 27

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

25



ES 2 538 122 T3

Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr  
 180 185 190

Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val  
 195 200 205

Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg  
 210 215 220

Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg  
 225 230 235 240

Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met  
 245 250 255

Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly  
 260 265 270

Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser  
 275 280 285

Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu  
 290 295 300

Tyr Lys Leu Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Ser Val Ala His  
 305 310 315 320

Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp  
 325 330 335

Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly  
 340 345 350

Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr  
 355 360 365

Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr  
 370 375 380

Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys  
 385 390 395 400

Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr  
 405 410 415

Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn  
 420 425 430

Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe  
 435 440 445

Gly Leu Tyr Lys Leu Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala

450

455

460

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
465 470

- <210> 28
- 5 <211> 538
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> proteína de fusión scTRAILwt
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (186)...(186)
- 15 <223> Xaa = Ser o Asn
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (188)...(188)
- 20 <223> Xaa = Ser o Asn
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (355)...(355)
- 25 <223> Xaa = Ser o Asn
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (357)...(357)
- 30 <223> Xaa = Ser o Asn
- <400> 28

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1          5          10          15

Ala Gly Asn Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly
 20          25          30

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu
 35          40          45

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
 50          55          60

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
 65          70          75          80

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
 85          90          95

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr
 100         105         110

Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
 115         120         125
    
```

35

ES 2 538 122 T3

Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr  
 130 135 140  
 Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser  
 145 150 155 160  
 Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Xaa Gly Xaa Gly Ser Arg Val  
 180 185  
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp  
 210 215 220  
 Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser  
 245 250 255  
 Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn  
 260 265 270  
 Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp  
 275 280 285  
 Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp  
 290 295 300  
 Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile  
 325 330 335  
 Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly  
 340 345 350  
 Ser Gly Xaa Gly Xaa Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr  
 355 360 365  
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys  
 370 375 380  
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His  
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His  
 405 410 415  
 Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln  
 420 425 430  
 Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr  
 435 440 445  
 Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser  
 450 455 460  
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser  
 465 470 475 480  
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe  
 485 490 495  
 Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser  
 500 505 510  
 Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser  
 515 520 525  
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 530 535

- 5 <210> 29
- <211> 546
- <212> PRT
- <213> Artificial
  
- 10 <220>
- <223> proteína de fusión scTRAILR2
  
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (194)...(194)
- 15 <223> Xaa = Ser o Asn
  
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (196)...(196)
- 20 <223> Xaa = Ser o Asn
  
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (363)...(363)
- 25 <223> Xaa = Ser o Asn
  
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <222> (365)...(365)
- 30 <223> Xaa = Ser o Asn
  
- <400> 29

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Arg Val Ala  
 20 25 30

Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro  
 35 40 45

Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu  
 50 55 60

Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn  
 65 70 75 80

Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln  
 85 90 95

Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp  
 100 105 110

Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro  
 115 120 125

Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala  
 130 135 140

Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys  
 145 150 155 160

Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg Leu Leu Gln  
 165 170 175

Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser  
 180 185 190

Gly Xaa Gly Xaa Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg  
 195 200 205

Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala  
 210 215 220

Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser  
 225 230 235 240

Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu  
 245 250 255

Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu  
 260 265 270

Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile  
 275 280 285

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala  
 290 295 300  
 Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val  
 325 330 335  
 Ser Val Thr Asn Glu Arg Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe  
 340 345 350  
 Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Xaa Gly Xaa Gly Ser Arg  
 355 360 365  
 Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser  
 370 375 380  
 Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu  
 405 410 415  
 Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr  
 420 425 430  
 Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys  
 435 440 445  
 Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro  
 450 455 460  
 Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys  
 465 470 475 480  
 Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu  
 485 490 495  
 Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg Leu  
 500 505 510  
 Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 515 520 525  
 Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe  
 530 535 540  
 Glu Lys  
 545

- <210> 30
- <211> 1452
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>

ES 2 538 122 T3

<223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scCD95L

<400> 30

```

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc      60
cctgcaggaa atggatccga attgcttagc gtcgcacatc tgacagggaa gtccaacagc      120
agaagtatgc cccctgaatg ggaggatacc tatgggattg tgctcctttc aggcgtgaaa      180
tacaagaagg gtgggctcgt catcaatgaa actggattgt acttcgtcta ttcaaaggtt      240
tactttcgtg gtcaatcttg taataacttg cctctcagcc ataaggctta tatgctaac      300
tccaaatacc cacaagacct cgttatgatg gagggtaaga tgatgagtta ctgcaccaca      360
gggcaaatgt gggccaggag tagttacctt ggcgcgggtg ttaacctcac tagcgcgat      420
catttgtagc ttaatgtcag cgagctgtcc ttggtgaact tcgaggaaag ccaaaccattc      480
tttgcttat acaaactcgg tggcagcggg agtggctccg gaagaagcgt cgcacacttg      540
actggcaaat ctaattcccg ttcaatgcct ctggagtggg aagacactta tggcatcgtc      600
ttgctgtctg gtgtaaagta taagaagggt ggcctggtga ttaacgaaac cggctgtac      660
ttcgtgtata gcaaagtcta cttcagagga cagagctgca acaacttgcc tctgtcccat      720
aaagtgtata tgaggaatag taaatatcca caggatctag ttatgatgga agggaagatg      780
atgctgtatt gtacgaccgg ccagatgtgg gctcgcagca gctatctggg tgccgtattc      840
aacttgactt ctgaggatca cctctatgtg aacgtgtccg aattgtcgtt ggtgaatttt      900
gaggagtca acaccttctt cggactctac aagctgggag gcagtggtag tggtagcggc      960
cgctctgttg ctcatctgac gggaaagagc aactctagga gtatgccgct ggagtgggag     1020
gacacatacg gtatcgtgct gttatccggc gttaagtaca agaaaggcgg attggtcatt     1080
aacgagactg gactctactt tgtctactcg aagggtgact ttcgcggcca atcttgaac     1140
aaccttccac tctctcacia ggtctacatg aggaactcca agtaccaca ggacttgggt     1200
atgatggagg gcaagatgat gagctactgc actaccggac agatgtgggc acgatcctcg     1260
taccttggtg cgtcttcaa cctgacatca gccgaccatc tgtacgtcaa cgtcagcgaa     1320
ctgtctctgg tcaacttcga ggaaagtcag acgttcttcg gtttgtataa gctcggcggg     1380
cctggctcga gtagcagcag ttcagcttgg agtcaccac agttcgagaa gtaataggcg     1440
cgccgctcta ga . . . . .                                     1452
    
```

5

<210> 31  
 <211> 1650  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scTRAILwt

15

<400> 31

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc 60  
 cctgcaggaa atggacagag agtggctgct cacatcaccg gaactcgggg taggtctaac 120  
 accctgtcca gcccgaattc taagaacgag aaggctctgg gcaggaagat caactcttgg 180  
 gagtccagca gatccggcca tagtttcttg tctaacttgc acctgagaaa cggcgagctg 240  
 gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tactctcaga cctacttccg ctttcaggag 300  
 gagatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatggtgc agtacatcta caagtacacc 360  
 agctatccag acccaatcct gctgatgaag tccgctagga actcctgttg gagcaaagac 420  
 gccgagtatg gcctgtatag catctatcag ggaggcatct tcgagctgaa ggagaacgac 480  
 aggatcttcg tgagcgtcac taatgagcat ctcatcgaca tggaccatga agcctctttc 540  
 ttcggcgctt tcttagtggg cggttccgga arcgggartg gtagtcgctg cgcgccacat 600  
 attactggca cccgagggag aagtaatact ttgtcaagtc ccaatagcaa gaatgagaag 660  
 gccctgggtc gaaagatcaa tagctgggag tcaagtcggt ctggacacag ctttctcagt 720  
 aatctccatc tccgaaatgg tgaattggct atacatgaga aggggttcta ttacatctat 780  
 agccaaactt acttttaggtt ccaagaggag attaaggaga acacgaagaa tgataagcag 840  
 atggttcaat atatttacia gtacacttcc tatccagacc cgatcttgct tatgaagtca 900  
 gcccgtaata gctgttgagg taaagatgca gaatacggac tctatagtat ttaccaaggt 960  
 gggatatttg aactcaagga gaatgatcg atattcgtat ctgtgacaaa cgaacacttg 1020  
 attgatatgg accacgaagc tagtttcttc ggagcattcc tgggtggcgg aagcggcart 1080  
 ggaarcggct ctagagtagc cgcccacata accgggacaa ggggacgaag caacacgcta 1140  
 agttctccta actcaaagaa cgagaaagca cttggacgta agatcaactc ctgggaaagt 1200  
 tctcgtagtg ggcattcctt cctgtccaac ctccacttga gaaatgggga gcttgtgatt 1260  
 cacgaaaagg gattctacta catctactcc cagacatact tccgattcca agaggaaatc 1320  
 aaggagaata ctaagaacga caaacagatg gtccagtaca tatacaagta cacctcatac 1380  
 cccgatccta tactgttgat gaaatctgca aggaactctt gctggctctaa ggacgctgag 1440  
 tatgggtgtg actcgatcta ccagggcggg attttcgagt tgaaagagaa cgaccgcata 1500  
 ttcgtgtcag taaccaacga gcacctgata gatatggacc atgaggcatc cttctttggt 1560  
 gccttcttgg tgggcggctc tggctcgagt agcagcagtt cagcttggag tcaccacag 1620  
 ttcgagaagt aatagggcgc ccgcgctagc 1650

- <210> 32
- <211> 1674
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scTRAILR2

<400> 32

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc 60  
 cctgcaggaa atggatcccc tggaaagtct tcaagctcta gcagagtggc tgctcacatc 120



accggaactc ggggtaggtc taacaccctg tccagcccga attccaagaa cgagaaggct 180  
ctgggcagga agatcaactc ttgggagtcc agcagatccg gtcatagttt cctgtctaac 240  
ttgcacctga gaaacggcga gctgggtgatc catgagaagg gcttctacta catctactct 300  
cagaccaggt tcaagtttcg ggaggagatc aaggagaaca ccaagaacga caagcagatg 360  
gtgcagtaca tctacaagta caccagctat ccagacccaa tcctgctgat gaagtccgct 420  
aggaactcct gttggagcaa agacgccgag tatggcctgt atagcatcta tcagggaggc 480  
atcttcgagc tgaaggagaa cgacaggatc ttcgtgagcg tcaactaatga gaggctgctc 540  
cagatggacc atgaagcctc tttcttcggtc gctttcttag tgggcgggtc cggaarcggt 600  
artggtagtc gcgtcgcggc acatattact ggcacccgag ggagaagtaa tactttgtca 660  
agtccaata gcaagaatga gaaggccctg ggtcgaaaga tcaatagctg ggagtcaagt 720  
cggctcggac acagctttct cagtaatctc catctccgaa atgggtgaatt ggtcatacat 780  
gagaaggggt tctattacat ctatagccaa actcagttta agttccgaga ggagattaag 840  
gagaacacga agaatgataa gcagatgggt caatatattt acaagtacac ttcctatcca 900  
gacccgatct tgcttatgaa gtcagcccgt aatagctggt ggagtaaaga tgcagaatac 960  
ggactctata gtatttacca aggtgggata tttgaaacta aggagaatga tcgcatattc 1020  
gtatctgtga caaacgaacg cttgcttcag atggaccacg aagctagttt cttcggagca 1080  
ttcctggtgg gcggaagcgg cartggaarc ggctctagag tagccgcca cataaccggg 1140  
acaaggggac gaagcaacac gctaagttct cctaactcaa agaacgagaa agcacttggg 1200  
cgtaagatca actcctggga aagttctcgt agtgggcatt ccttcctgtc caacctccac 1260  
ttgagaaatg gggagcttgt gattcacgaa aagggtattc actacatcta ctcccagaca 1320  
cagttcaaat tccgagagga aatcaaggag aataactaaga acgacaaaca gatgggtccag 1380  
tacaatatac agtacacctc ataccccgat cctatactgt tgatgaaatc tgcaaggaac 1440  
tcttctggtg ctaaggacgc tgagtatggg ttgtactcga tctaccaggg cggaattttc 1500  
gagttgaaag agaacgaccg catattcgtg tcagtaacca acgagcgcct gttgcagatg 1560  
gaccatgagg catccttctt tgggtgcctc ctgggtggcg gtcctggctc gagtagcagc 1620  
agttcagctt ggagtcaccc acagttcgag aagtaatagg cgcgccgcgc tagc 1674

<210> 33  
<211> 222  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> módulo de cadena pesada de pertuzumab Fab (VHCH1)

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

15

ES 2 538 122 T3

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

<210> 34  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> módulo de cadena ligera de pertuzumab Fab (VLCL)

10 <400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly  
 20 25 30

ES 2 538 122 T3

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr  
 85 90  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

- <210> 35
- <211> 16
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> región de bisagra de IGG1 humana

- 10 <400> 35

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 1 5 10 15

- <210> 36
- <211> 263
- <212> PRT
- 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> módulo scFv de pertuzumab

- 20 <400> 36

ES 2 538 122 T3

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

<210> 37  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> parte Fc de IGG1 humana (bisagra+CH2+CH3)

<400> 37

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225

230

ES 2 538 122 T3

<210> 38  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> módulo Fc N-terminal con péptido señal

<400> 38

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

10

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 245

5 <210> 39  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> módulo de la cadena pesada de pertuzumab Fab con péptido señal

<400> 39

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

ES 2 538 122 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 260 265

<210> 40  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> módulo de la cadena ligera de pertuzumab Fab con péptido señal

10

<400> 40

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



ES 2 538 122 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Pro Gly Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 245 250

5 <210> 41  
 <211> 823  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> módulo del gen de la cadena pesada de pertuzumab Fab  
 <400> 41

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggctcctact gctttgggctc 60  
 cctgcaggta acggtgaagt gcagctcgtc gaaagcgggt gcggactggt tcagcccggg 120  
 ggttctctgc ggctgtcttg tgcctcctcg ggtttcacgt tcaactgacta cacaatggac 180  
 tgggtgctgc aggctcctcg aaagggattg gagtgggtag ccgactgtaa tccaaactcc 240  
 ggcgggagca tctacaacca gaggttcaag gggaggttca ctctgagcgt ggatcgtccc 300  
 aagaacacgc tgtacctcca gatgaactct ctcagggccg aggacacggc tgtttactat 360  
 tgcgcgagga acctgggtcc ttccttctac ttcgactact ggggacaggg aacctgggtg 420  
 accgtcagct ccgcttctac caagggctct agtgtgtccc ctcttgctcc cagctctaaa 480  
 agcacctccg gtggaactgc tgccttgggc tgtctgggta aggactactt ccccgaacct 540  
 gtgaccgtat cttggaactc cggcgcactt acttctggcg tccacacttt cccagccgtc 600  
 ttacagtcct ctggcctgta ttccttgagc agcgtcgtga ccgtgcctag cagtagtctg 660  
 ggcacccaga cctacatctg caacgtcaac cacaagccta gcaacaccaa ggttgacaag 720  
 aaggctcagc ctaagtcgtg cgacaagacg cacggatccc ctggctcgag ttcaagctct 780  
 tctgcctggg cacatccaca attcgagaag taataggcgc gcc 823

15 <210> 42  
 <211> 787  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> módulo del gen de la cadena ligera de pertuzumab Fab

25 <400> 42

ES 2 538 122 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gaccgataca ctgctcttgt gggfactctt gctgtgggtt    60
ccgggatcta ccggtgacat ccagatgaca caatctccta gcagtctgag cgcaagtgtt    120
ggagatcgtg tcaccatcac atgcaaggcc agccaggatg tgagcattgg agtcgcctgg    180
tatcagcaga aaccggcaa ggcaccaag ctgctgatct actcggccag ttacagatac    240
actggcgtac cttcgagggt tagtggtagc ggttctggaa ccgatttcac cctcaccatt    300
agctccctcc aaccggagga cttcggcacc tactactgcc agcaatacta catctaccct    360
tacacgttcg gccaaaggcac taaggctgag attaaacgta cggtcgcagc tccttccgta    420
ttcatcttcc cacctagcga cgagcagcta aagtctggaa ctgcgtccgt cgtgtgcctg    480
ctcaacaact tctaccctcg ggaagcgaag gtccagtggg aagtggaaca cgctctccag    540
tccggcaata gccaggaatc cgtgaccgag caggacagca aggattctac ctactcactg    600
tccagcacc ttacgctgtc caaggccgac tacgagaagc ataagggtgta cgcttgtgag    660
gtgactcacc aaggctctgtc aagcctgtg accaagagct tcaacagagg cgagtgcgga    720
tcccctggct cgagttcaag ctcttctgcc tggtcacatc cacaattcga gaagtaatag    780
gcgcgcc

```

5 <210> 43  
 <211> 771  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> proteína de fusión scTRAILwt-Fc con péptido señal

<400> 43

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1           5           10
Ala Gly Asn Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly
 20           25           30
Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu
 35           40           45
Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
 50           55           60
Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
 65           70           75
Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
 85           90           95
Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr
 100          105          110
Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
 115          120          125

```

ES 2 538 122 T3

Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr  
 130 135 140  
 Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser  
 145 150 155 160  
 Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe  
 165 170 175  
 Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val  
 180 185 190  
 Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp  
 210 215 220  
 Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser  
 245 250 255  
 Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn  
 260 265 270  
 Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp  
 275 280 285  
 Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp  
 290 295 300  
 Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile  
 325 330 335  
 Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly  
 340 345 350  
 Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr  
 355 360 365  
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys  
 370 375 380  
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His  
 385 390 395 400

ES 2 538 122 T3

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His  
405 410 415

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln  
420 425 430

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr  
435 440 445

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser  
450 455 460

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser  
465 470 475 480

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe  
485 490 495

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser  
500 505 510

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser  
515 520 525

Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro  
530 535 540

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
545 550 555 560

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
565 570 575

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
580 585 590

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
595 600 605

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
610 615 620

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
625 630 635 640

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
645 650 655

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
660 665 670

ES 2 538 122 T3

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 675 680 685

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 690 700

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 705 710 715 720

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 725 730 735

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 740 745 750

Leu Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln  
 755 760 765

Phe Glu Lys  
 770

- <210> 44
- <211> 2341
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> módulo del gen scTRAILwt-FC01

10 <400> 44

```

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc      60
cctgcaggaa atggacagag agtggtctct cacatcaccg gaactcgggg taggtctaac      120
accctgtcca gcccgaattc taagaacgag aaggctctgg gcaggaagat caactcctgg      180
gagtcacgca gatccgggtca tagtttctct tctaacttgc acctgagaaa cggcgagctg      240
gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tactctcaga cctacttccg ctttcaggag      300
gagatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatggtgc agtacatcta caagtacacc      360
agctatccag acccaatcct gctgatgaag tccgctagga actcctgttg gagcaaagac      420
gccgagtatg gcctgtatag catctatcag ggaggcatct tcgagctgaa ggagaacgac      480
aggatccttcg tgagcgtcac taatgagcat ctcatcgaca tggacatga agcctctttc      540
ttcggcgctt tcttagtggg cggttccgga agcggtaatg gtagtcgcgt cgcggcacat      600
attactggca cccgagggag aagtaatact ttgtcaagtc ccaatagcaa gaatgagaag      660
gccttgggtc gaaagatcaa tagctgggag tcaagtcggt ctggacacag ctttctcagt      720
aatctccatc tccgaaatgg tgaattggtc atacatgaga aggggttcta ttacatctat      780
agccaaactt acttttaggtt ccaagaggag attaaggaga acacgaagaa tgataagcag      840
atggttcaat atatttacia gtacacttcc tatccagacc cgatcttgct tatgaagtca      900
gcccgtaata gctgttggag taaagatgca gaatacggac tctatagtat ttaccaaggt      960
    
```

15

ES 2 538 122 T3

```

gggatatttg aactcaagga gaatgatcgc atattcgtat ctgtgacaaa cgaacacttg 1020
attgatattg accacgaagc tagtttcttc ggagcattcc tggtagggcg aagcggcagt 1080
ggaaacggct ctagagtagc cgcccacata accgggacaa ggggacgaag caacacgcta 1140
agttctccta actcaaagaa cgagaaagca cttggacgta agatcaactc ctgggaaagt 1200
tctcgtagtg ggcattcctt cctgtccaac ctccacttga gaaatgggga gcttctgatt 1260
cacgaaaagg gatttacta catctactcc cagacatact tccgattcca agaggaaaac 1320
aaggagaata ctaagaacga caaacagatg gtccagtaca tatacaagta cacctcatal 1380
cccgatccta tactgttgat gaaatctgca aggaactcct gctggcttaa ggacgctgag 1440
tatgggtgtt actcgatcta ccagggcgga atttctgagt tgaagagaa cgaccgcata 1500
ttcgtgtcag taaccaacga gcacctgata gatattggacc atgaggcatc cttctttggt 1560
gccttccttg tgggctgctc tggctcgagt agctcctcat ccggctccga taagaccac 1620
acctgccctc cctgtcctgc ccttctctgc gctggacctc gcgtgttctt gttcctcca 1680
aagcctaagg acacctgat gatctccagg acctctgagg tgacctgtgt ggtggtggac 1740
gtgtctcacg aagatcccga ggtgaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtccac 1800
aacgccaaga ccaagcctag ggaggagcag tacaactcca cctaccgggt ggtgtctgtg 1860
ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac ggaaaggagt ataagtgtaa ggtctccaac 1920
aagggcctgc cttcatctat cgagaaaacc atctccaagg ccaagggcca gcctcgggag 1980
cctcagtggt acacctgctt tcctagcagg gaggagatga ccaagaacca ggtgtccttg 2040
acctgtctgg tgaagggctt ctaccttcc gatatcgcg tggagtggga gtctaattggc 2100
cagcccgaga acaactacaa gaccacctt cctgtgctgg actctgacgg ctcttcttc 2160
ctgtactcca agctgaccgt ggacaagtcc agatggcagc agggcaacgt gttctcctgc 2220
tccgtgatgc acgagccct gcacaatcac tacaccaga agtccctgtc tctgagtccg 2280
ggctcatctt caagctcttc tgcttggctt catccgcaat tcgagaaata ataggcgcgc 2340
c 2341

```

5 <210> 45  
 <211> 773  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> HC-scTRAILwt-SNSN  
 <400> 45

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1. 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
35 40 45

```

ES 2 538 122 T3

Phe Thr Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 50 55 60

Leu Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr  
 65 70 75 80

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser Lys  
 85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 115 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 260 265 270

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 275 280 285

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 290 295 300

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile  
 305 310 315 320

ES 2 538 122 T3

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr  
 325 330 335  
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr  
 340 345 350  
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 355 360 365  
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 370 375 380  
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 385 390 395 400  
 Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val  
 405 410 415  
 Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr  
 420 425 430  
 Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn  
 435 440 445  
 Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser  
 450 455 460  
 Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val  
 465 470 475 480  
 Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg  
 485 490 495  
 Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val  
 500 505 510  
 Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met  
 515 520 525  
 Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu  
 530 535 540  
 Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg  
 545 550 555 560  
 Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu  
 565 570 575  
 Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn  
 580 585 590



Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn  
 595 600 605

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys  
 610 615 620

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn  
 625 630 635 640

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr  
 645 650 655

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu  
 660 665 670

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr  
 675 680 685

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys  
 690 695 700

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly  
 705 710 715 720

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn  
 725 730 735

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe  
 740 745 750

Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His  
 755 760 765

Pro Gln Phe Glu Lys  
 770

- <210> 46
- <211> 2347
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> módulo del gen HC-scTRAILwt-SNSN

- <400> 46

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc 60

cctgcaggta acggtgaagt gcagctcgtc gaaagcggtg gcggactggt tcagcccggt 120

ggttctctgc ggctgtcttg tgctgcctcg ggtttcacgt tcactgacta cacaatggac 180

tgggtgcgtc aggcctcctgg aaagggattg gagtgggtag ccgacgttaa tccaaactcc 240

ggcgggagca tctacaacca gaggttcaag gggaggttca ctctgagcgt ggatcgctcc 300

aagaacacgc tgtacctcca gatgaactct ctcagggccg aggacacggc tgtttactat 360

ES 2 538 122 T3

tgcgcgagga acctgggtcc ttccttctac ttcgactact ggggacaggg aaccctggtg 420  
 accgtcagct ccgcttctac caagggctct agtgtgttcc ctcttgctcc cagctctaaa 480  
 agcacctccg gtggaactgc tgetctgggc tgtctggtta aggactactt ccccgaaccc 540  
 gtgaccgat cttggaactc cggcgcactt acttctggcg tccacacttt cccagccgtc 600  
 ttacagtcct ctggcctgta ttccttgagc agcgtcgtga ccgtgcctag cagtagtctg 660  
 ggcacccaga cctacatctg caacgtcaac cacaagccta gcaacaccaa ggttgacaag 720  
 aaggtcgagc ctaagtcgtg cgacaagacg cacggatccc ctggaagttc ttcaagctct 780  
 agcagagtgg ctgctcatat caccggaact cggggtaggt ctaacaccct gtccagcccg 840  
 aattctaaga acgagaaggc tctgggcagg aagatcaact cttgggagtc cagcagatcc 900  
 ggtcatagt tccctgtctaa cttgcacctg agaaacggcg agctggtgat ccatgagaag 960  
 ggcttctact acatctactc tcagacctac tcccgtttc aggaggagat caaggagaac 1020  
 accaagaacg acaagcagat ggtgcagtac atctacaagt acaccagcta tccagaccca 1080  
 atcctgtctga tgaagtccgc taggaactcc tgttgagca aagacgccga gtatggcctg 1140  
 tatagcatct atcagggagg catcttcgag ctgaaggaga acgacaggat ctccgtgagc 1200  
 gtcactaatg agcatctcat cgacatggac catgaagcct ctttcttcgg cgcttctta 1260  
 gtgggcggtt ccggaagcgg taatggtagt cgcgtcgcgg cacatattac tggcaccga 1320  
 gggagaagta atactttgtc aagtccaat agcaagaatg agaaggccct gggtcgaaag 1380  
 atcaatagct gggagtcaag tcggtctgga cacagctttc tcagtaatct ccatctccga 1440  
 aatggtgaat tggtcataca tgagaagggg ttctattaca tctatagcca aacttacttt 1500  
 aggttccaag aggagattaa ggagaacacg aagaatgata agcagatggg tcaatatatt 1560  
 tacaagtaca ctccctatcc agaccgatc ttgcttatga agtcagcccg taatagctgt 1620  
 tggagttaaag atgcagaata cggactctat agtatttacc aagggtgggat atttgaacte 1680  
 aaggagaatg atcgcataat cgtatctgtg acaaacgaac acttgattga tatggaccac 1740  
 gaagctagtt tcttcggagc attcctggtg ggcggaagcg gcagtggaaa cggtcttaga 1800  
 gtagccgccc acataaccgg gacaagggga cgaagcaaca cgctaagttc tcctaactca 1860  
 aagaacgaga aagcacttgg acgtaagatc aactcctggg aaagtctctg tagtgggeat 1920  
 tccttcctgt ccaacctcca cttgagaaat ggggagcttg tgattcacga aaagggattc 1980  
 tactacatct actcccagac atacttccga ttccaagagg aatcaagga gaataactaag 2040  
 aacgacaaac agatggtcca gtacatatac aagtacacct cataccccga tcctatactg 2100  
 ttgatgaaat ctgcaaggaa ctcttgctgg tctaaggacg ctgagtatgg gttgtactcg 2160  
 atctaccagg gcggaatttt cgagttgaaa gagaacgacc gcatattcgt gtcagtaacc 2220  
 aacgagcacc tgatagatat ggaccatgag gcatccttct ttggtgcctt cctggtgggc 2280  
 ggtcctggct cgagtagcag cagttcagct tggagtcacc cacagttcga gaagtaatag 2340  
 gcgcgcc 2347

- <210> 47
- <211> 773
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>

ES 2 538 122 T3

<223> HC-scTRAILRZ-SNSN con peptide señal

<400> 47

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

ES 2 538 122 T3

Ser Cys Asp Lys Thr His Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 260 265 270

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 275 280 285

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 290 295 300

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile  
 305 310 315 320

Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr  
 325 330 335

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr  
 340 345 350

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 355 360 365

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 370 375 380

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg  
 385 390 395 400

Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val  
 405 410 415

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr  
 420 425 430

Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn  
 435 440 445

Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser  
 450 455 460

Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val  
 465 470 475 480

Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys  
 485 490 495

Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val  
 500 505 510

ES 2 538 122 T3

Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met  
515 520 525

Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu  
530 535 540

Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg  
545 550 555 560

Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg Leu Leu Gln Met Asp His Glu  
565 570 575

Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn  
580 585 590

Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn  
595 600 605

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys  
610 615 620

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn  
625 630 635 640

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr  
645 650 655

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu  
660 665 670

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr  
675 680 685

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys  
690 695 700

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly  
705 710 715 720

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn  
725 730 735

Glu Arg Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe  
740 745 750

Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His  
755 760 765

Pro Gln Phe Glu Lys  
770

- <210> 48
- <211> 2347
- <212> ADN
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> módulo del gen HC-scTRAILR2-SNSN

<400> 48

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc 60  
cctgcaggta acggggaagt gcagctcgtc gaaagcggtg gcggactggt tcagcccggg 120  
ggtrctctgc ggctgtcttg tgctgcctcg ggtttcacgt tcaactgacta cacaatggac 180  
tgggtgcgtc aggctcctgg aaagggattg gagtgggtag ccgacgttaa tccaaactcc 240  
ggcgggagca tctacaacca gaggtcaag gggaggttca ctctgagcgt ggatcgtccc 300  
aagaacacgc tgtacctcca gatgaactct ctcaaggccg aggacacggc tgtttactat 360  
tgcgcgagga acctgggtcc ttcttctac ttcgactact ggggacaggg aaccctgggtg 420  
accgtcagct ccgcttctac caagggtcct agtgtgttcc ctcttgctcc cagctctaaa 480  
agcaectccg gtggaactgc tgetctgggc tgtctgggta aggactactt ccccgaacct 540  
gtgaccgat cttggaactc cggcgcactt acttctggcg tccacacttt cccagccgtc 600  
ttacagtcct ctggcctgta ttcttgagc agcgtcgtga ccgtgcctag cagtagtctg 660  
ggcaccaga cctacatctg caacgtcaac cacaagccta gcaacaccaa ggttgacaag 720  
aaggtcagc ctaagtcgtg cgacaagacg cacggatccc ctggaagttc ttcaagctct 780  
agcagagtgg ctgctcacat caccggaact cggggtaggt ctaacacctt gtccagcccc 840  
aattccaaga acgagaaggc tctgggcagg aagatcaact cttgggagtc cagcagatcc 900  
ggtcatagt tctctgctaa cttgcacctg agaaacggcg agctgggtgat ccatgagaag 960  
ggcttctact acatctactc tcagaccag ttcaagttc gggaggagat caaggagaac 1020  
accaagaacg acaagcagat ggtgcagtac atctacaagt acaccagcta tccagaccga 1080  
atcctgctga tgaagtcgc taggaactcc tgttggagca aagacgccga gtatggcctg 1140  
tatagcatct atcagggagg catcttcgag ctgaaggaga acgacaggat ctctgtgagc 1200  
gtcactaatg agaggctgct ccagatggac catgaagcct ctttcttcgg cgcttctta 1260  
gtgggcgggt ccggaagcgg taatggtagt cgcgtcgcgg cacatattac tggcacccga 1320  
gggagaagta atactttgtc aagtcccaat agcaagaatg agaaggccct gggtcgaaag 1380  
atcaatagct gggagtcaag tgggtctgga cacagctttc tcagtaatct ccatctccga 1440  
aatggtgaat tggtcataca tgagaagggg ttctattaca tctatagcca aactcagttt 1500  
aagttccgag aggagattaa ggagaacacg aagaatgata agcagatggt tcaatatatt 1560  
tacaagtaca cttcctatcc agaccgatc ttgcttatga agtcagcccc taatagctgt 1620  
tggagtaaag atgcagaata cggactctat agtatttacc aagggtgggat atttgaactc 1680  
aaggagaatg atcgcatatt cgtatctgtg acaaacgaac gcttgcttca gatggaccac 1740  
gaagctagtt tcttcggagc attcctgggtg ggcggaagcg gcagtggaaa cggctctaga 1800  
gtagccgcc acataaccgg gacaagggga cgaagcaaca cgctaagttc tcctaactca 1860

5

10

ES 2 538 122 T3

aagaacgaga aagcacttgg acgtaagatc aactcctggg aaagttctcg tagtgggcat 1920  
 tccttcctgt ccaacctcca cttgagaaat ggggagcttg tgattcacga aaagggattc 1980  
 tactacatct actcccagac acagttcaaa ttccgagagg aatcaagga gaatactaag 2040  
 aacgacaaac agatggtcca gtacatatac aagtacacct cataccccga tcctatactg 2100  
 ttgatgaaat ctgcaaggaa ctcttgctgg tctaaggacg ctgagtatgg gttgtactcg 2160  
 atctaccagg gcggaatttt cgagttgaaa gagaacgacc gcatattcgt gtcagtaacc 2220  
 aacgagcgc tgggtgcagat ggaccatgag gcatccttct ttggtgcctt cctgggtgggc 2280  
 ggtcctggct cgagtagcag cagttcagct tggagtcacc cacagttcga gaagtaatag 2340  
 gcgcgcc 2347

5 <210> 49  
 <211> 773  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> HC-scTRAILRZ-SSSS con peptide señal

<400> 49

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

ES 2 538 122 T3

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165 170 175  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180 185 190  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 210 215 220  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 260 265 270  
 Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 275 280 285  
 Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 290 295 300  
 Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile  
 305 310 315 320  
 Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr  
 325 330 335  
 Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr  
 340 345 350  
 Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 355 360 365  
 Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 370 375 380  
 Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val  
 405 410 415  
 Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr  
 420 425 430



ES 2 538 122 T3

Gly Thr Arg 435 Gly Arg Ser Asn Thr 440 Leu Ser Ser Pro Asn 445 Ser Lys Asn  
 Glu Lys 450 Ala Leu Gly Arg Lys 455 Ile Asn Ser Trp Glu 460 Ser Ser Arg Ser  
 Gly 465 His Ser Phe Leu Ser 470 Asn Leu His Leu Arg 475 Asn Gly Glu Leu Val 480  
 Ile His Glu Lys Gly 485 Phe Tyr Tyr Ile Tyr 490 Ser Gln Thr Gln Phe 495 Lys  
 Phe Arg Glu Glu 500 Ile Lys Glu Asn Thr 505 Lys Asn Asp Lys Gln 510 Met Val  
 Gln Tyr Ile 515 Tyr Lys Tyr Thr Ser 520 Tyr Pro Asp Pro Ile 525 Leu Leu Met  
 Lys Ser 530 Ala Arg Asn Ser Cys 535 Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu  
 Tyr Ser 545 Ile Tyr Gln Gly 550 Gly Ile Phe Glu Leu 555 Lys Glu Asn Asp Arg 560  
 Ile Phe Val Ser Val 565 Thr Asn Glu Arg Leu 570 Leu Gln Met Asp His Glu 575  
 Ala Ser Phe Phe 580 Gly Ala Phe Leu Val 585 Gly Gly Ser Gly Ser 590 Gly Ser  
 Gly Ser Arg 595 Val Ala Ala His Ile 600 Thr Gly Thr Arg Gly 605 Arg Ser Asn  
 Thr Leu 610 Ser Ser Pro Asn Ser 615 Lys Asn Glu Lys Ala 620 Leu Gly Arg Lys  
 Ile Asn Ser Trp Glu Ser 630 Ser Arg Ser Gly His 635 Ser Phe Leu Ser Asn 640  
 Leu His Leu Arg Asn 645 Gly Glu Leu Val Ile 650 His Glu Lys Gly Phe Tyr 655  
 Tyr Ile Tyr Ser 660 Gln Thr Gln Phe Lys 665 Phe Arg Glu Glu Ile 670 Lys Glu  
 Asn Thr Lys 675 Asn Asp Lys Gln Met Val 680 Gln Tyr Ile Tyr 685 Lys Tyr Thr  
 Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu 695 Leu Met Lys Ser Ala 700 Arg Asn Ser Cys  
 Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly

ES 2 538 122 T3

705 710 715 720

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn  
 725 730 735

Glu Arg Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe  
 740 745 750

Leu Val Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His  
 755 760 765

Pro Gln Phe Glu Lys  
 770

- 5 <210> 50
- <211> 2347
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> módulo del gen HC-scTRAILR2-SSSS

- <400> 50

```

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc      60
cctgcaggtg acggtgaagt gcagctctgc gaaagcggtg gcggactggt tcagcccggg      120
ggttctctgc ggctgtcttg tgctgcctcg ggtttcacgt tcaactgacta cacaatggac      180
tgggtgcgtc aggctcctgg aaagggattg gagtgggtag ccgacgttaa tccaaactcc      240
ggcgggagca tctacaacca gaggttcaag gggaggttca ctctgagcgt ggatcgctcc      300
aagaacacgc tgtacctcca gatgaactct ctcagggccg aggacacggc tgtttactat      360
tgctgcgagg acctgggtcc ttccttctac ttcgactact ggggacaggg aaccctgggtg      420
accgtcagct ccgcttctac caagggctct agtgtgttcc ctcttgctcc cagctctaaa      480
agcacctccg gtggaactgc tgctctgggc tgctctggta aggactactt ccccgaacct      540
gtgaccgtat cttggaactc cggcgcactt acttctggcg tccacacttt cccagccgtc      600
ttacagtcct ctggcctgta ttccttgagc agcgtctgta ccgtgcctag cagtagtctg      660
ggcaccaga cctacatctg caacgtcaac cacaagccta gcaacaccaa ggttgacaag      720
aaggtcgagc ctaagtcgtg cgacaagacg cacggatccc ctggaagtcc ttcaagctct      780
agcagagtgg ctgctcaca caccggaact cggggtaggt ctaacacct gtccagcccg      840
aattccaaga acgagaaggc tctgggcagg aagatcaact cttgggagtc cagcagatcc      900
ggtcatagtt tcttgtctaa cttgcacctg agaaacggcg agctgggtgat ccatgagaag      960
ggcttctact acatctactc tcagacccag ttcaagtttc gggaggagat caaggagaac     1020
accaagaacg acaagcagat ggtgcagtac atctacaagt acaccageta tccagacca     1080
atcctgctga tgaagtccgc taggaactcc tggtggagca aagacgccga gtatggcctg     1140
tatagcatct atcagggagg catcttcgag ctgaaggaga acgacaggat cttegtgagc     1200
gtcactaatg agaggctgct ccagatggac catgaaacct ctttcttcgg cgctttctta     1260
    
```

gtgggcggtt ccggaagcgg tagtggtagt cgcgtcgcgg cacatattac tggcaccgga 1320  
 gggagaagta atactttgtc aagtcccaat agcaagaatg agaaggccct gggtcgaaag 1380  
 atcaatagct gggagtcaag tcggtctgga cacagctttc tcagtaatct ccatctccga 1440  
 aatgggtgaat tggtcataca tgagaagggg ttctattaca tctatagcca aactcagttt 1500  
 aagtcccgag aggagattaa ggagaacacg aagaatgata agcagatggg tcaatatatt 1560  
 tacaagtaca cttcctatcc agaccgcgac ttgcttatga agtcagcccg taatagctgt 1620  
 tggagtaaag atgcagaata cggactctat agtatttacc aagggtggat atttgaactc 1680  
 aaggagaatg atcgcatatt cgtatctgtg acaaacgaac gcttgcttca gatggaccac 1740  
 gaagctagtt tcttcggagc attcctggtg ggcggaagcg gcagtggaag cggctctaga 1800  
 gtagccgcc acataaccgg gacaagggga cgaagcaaca cgctaagttc tcctaactca 1860  
 aagaacgaga aagcacttgg acgtaagatc aactcctggg aaagttctcg tagtgggcat 1920  
 tccttctgt ccaacctcca cttgagaaat ggggagcttg tgattcacga aaagggattc 1980  
 tactacatct actcccagac acagttcaaa ttccgagagg aaatcaagga gaatacctaa 2040  
 aacgacaaac agatgggtcca gtacatatac aagtacacct cataccccga tcctatactg 2100  
 ttgatgaaat ctgcaaggaa ctcttgctgg tctaaggacg ctgagtatgg gttgtactcg 2160  
 atctaccagg gcggaatttt cgagttgaaa gagaacgacc gcatattcgt gtcagtaacc 2220  
 aacgagcggc tgttcagat ggaccatgag gcatccttct ttgggtgcctt cctgggtggc 2280  
 ggtcctggct cgagtagcag cagttcagct tggagtcacc cacagttcga gaagtaatag 2340  
 gcgcgcc 2347

<210> 51  
 <211> 761  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> LC-scTRAILR2-SNSN con peptide señal

10 <400> 51  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 35 40 45  
 Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

ES 2 538 122 T3

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser Pro Gly Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Ser Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg  
 245 250 255  
 Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly  
 260 265 270  
 Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu  
 275 280 285  
 Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly  
 290 295 300  
 Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys  
 325 330 335  
 Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn  
 340 345 350

ES 2 538 122 T3

Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln  
 355 360 365

Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val  
 370 375 380

Thr Asn Glu Arg Leu Leu Gln Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly  
 385 390 395 400

Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala  
 405 410 415

Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro  
 420 425 430

Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu  
 435 440 445

Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn  
 450 455 460

Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln  
 465 470 475 480

Thr Gln Phe Lys Phe Arg Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp  
 485 490 495

Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro  
 500 505 510

Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala  
 515 520 525

Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys  
 530 535 540

Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu Arg Leu Leu Gln  
 545 550 555 560

Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser  
 565 570 575

Gly Ser Gly Asn Gly Ser Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg  
 580 585 590

Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala  
 595 600 605

Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser  
 610 615 620

Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu

5

10

ES 2 538 122 T3

625		630		635		640
Lys Gly Phe Tyr	Tyr 645	Ile Tyr Ser Gln	Thr 650	Gln Phe Lys Phe	Arg 655	Glu
Glu Ile Lys	Glu 660	Asn Thr Lys Asn	Asp 665	Lys Gln Met Val	Gln 670	Tyr Ile
Tyr Lys	Tyr 675	Thr Ser Tyr Pro	Asp 680	Pro Ile Leu Leu	Met 685	Lys Ser Ala
Arg Asn	Ser 690	Cys Trp Ser	Lys 695	Asp Ala Glu Tyr	Gly 700	Leu Tyr Ser Ile
Tyr Gln	Gly 705	Gly Ile Phe	Glu 710	Leu Lys Glu	Asn 715	Asp Arg Ile Phe Val 720
Ser Val	Thr 725	Asn Glu Arg	Leu 725	Leu Gln Met	Asp 730	His Glu Ala Ser Phe 735
Phe Gly Ala	Phe 740	Leu Val Gly Gly	Pro 745	Gly Ser Ser Ser	Ser 750	Ser Ser
Ala Trp	Ser 755	His Pro Gln Phe	Glu 760	Lys		

5 <210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia de enlazador

10 <400> 52

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser  
 1 5

15 <210> 53  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia de enlazador

20 <400> 53

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser  
 1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende:

- 5 (i) un primer dominio de citoquinas de la familia de TNF soluble,  
 (ii) un primer enlazador peptídico,  
 (iii) un segundo dominio de citoquinas de la familia TNF soluble,  
 (iv) un segundo enlazador peptídico, y  
 (v) un tercer dominio de citoquinas de la familia TNF soluble,

en donde el polipéptido de fusión es sustancialmente no-agregante, en donde el dominio de citoquinas de la familia TNF soluble se selecciona de dominios TRAIL.

10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el segundo y/o el tercer dominio de citoquinas de la familia TNF soluble, es un dominio acortado de modo N-terminal, que opcionalmente comprende mutaciones en las secuencias de aminoácidos.

15 3. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde al menos uno de los dominios de citoquinas de la familia TNF soluble, particularmente al menos uno de los dominios (iii) y (v) de citoquinas de la familia TNF soluble es un dominio soluble TRAIL, con una secuencia que comienza entre el aminoácido Gln120 y Val122 de TRAIL humano, y en donde Arg121 puede ser reemplazado por un aminoácido neutro, p. ej., Ser o Gly.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde al menos uno de los dominios de citoquinas de la familia TNF soluble, particularmente al menos uno de los dominios (iii) y (v) de citoquinas de la familia TNF soluble es un dominio soluble TRAIL con una secuencia N-terminal seleccionada de

- 20 (a) Arg121 – Val122 – Ala123 y  
 (b) (Gly/Ser)121 – Val122 – Ala 123.

25 5. El polipéptido de las reivindicaciones 3 ó 4, en donde el dominio soluble TRAIL termina con el aminoácido Gly281 de TRAIL humano y/o comprende opcionalmente una mutación en las posiciones R130, G160, H168, R170, H177, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267 o D269 o en dos o más de dichas posiciones.

6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el primer y segundo enlazadores peptídicos, independientemente, tienen una longitud de de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, y preferiblemente son enlazadores de glicina/serina que comprenden opcionalmente un residuo asparagina que puede estar glicosilado.

30 7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que adicionalmente comprende un dominio de péptido señal N-terminal, que puede comprender un sitio de escisión de proteasa, y/o que adicionalmente comprende un elemento C-terminal que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación.

35 8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que adicionalmente comprende en posición N-terminal y/o C-terminal un dominio adicional, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cadena sencilla tal como un dominio Fab o de fragmento Fc.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, preferiblemente en enlace operativo con una secuencia del control de la expresión.

40 10. Una célula o un organismo no humano, transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde la célula es, p. ej., una célula procariota o una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, o más preferiblemente una célula humana.

45 11. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende, como agente activo, una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, particularmente para uso en terapia, más particularmente para la profilaxis y/o tratamiento de trastornos causados por, asociados con y/o acompañados de la disfunción de citoquinas TNF, en particular trastornos proliferativos tales como tumores, p. ej., tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades

metabólicas; trastornos autoinmunes, p. ej., enfermedades reumatoides y/o artríticas; enfermedades degenerativas, p. ej., enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a la apoptosis o rechazos de trasplantes.



Figura 1

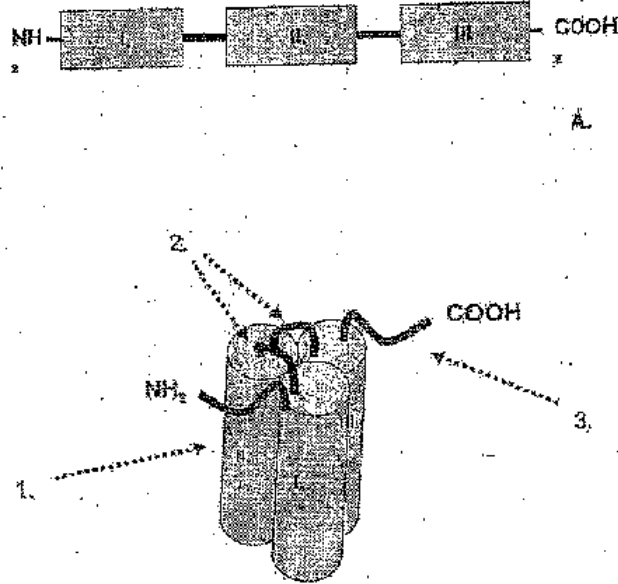


Figura 2

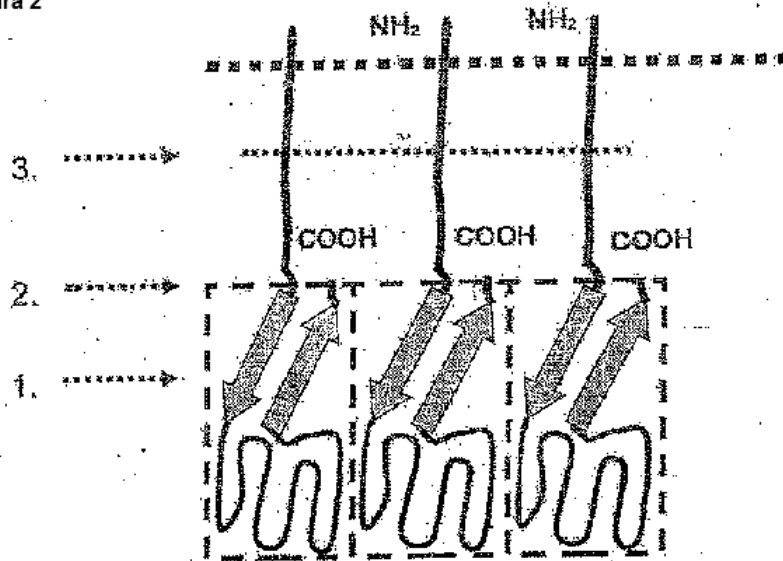


Figura 3

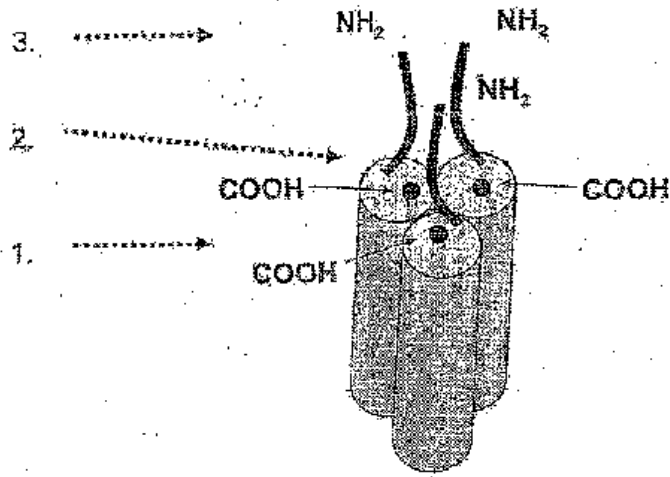


Figura 4

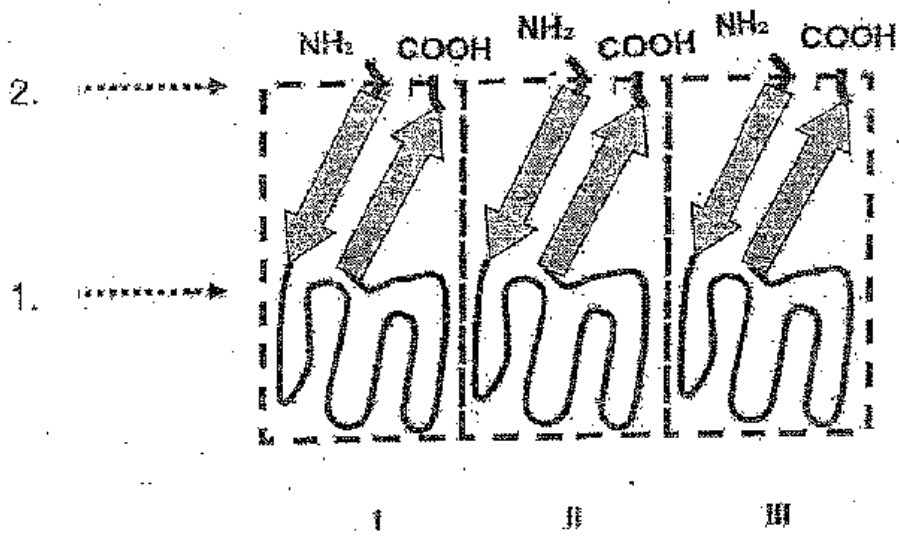


Figura 5

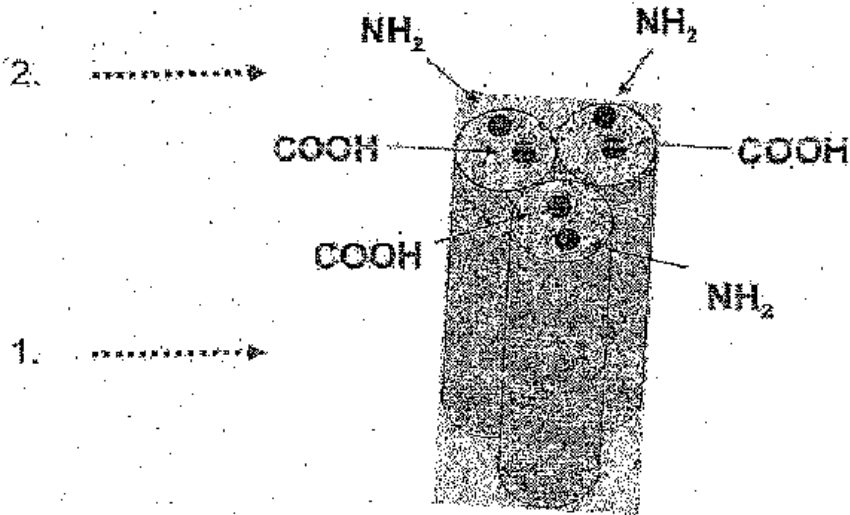


Figura 6

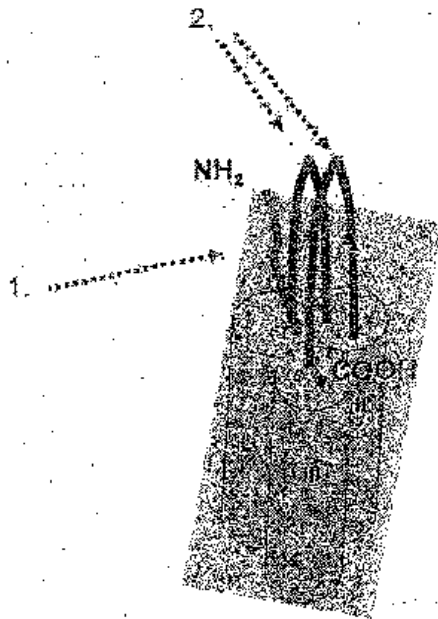


Figura 7

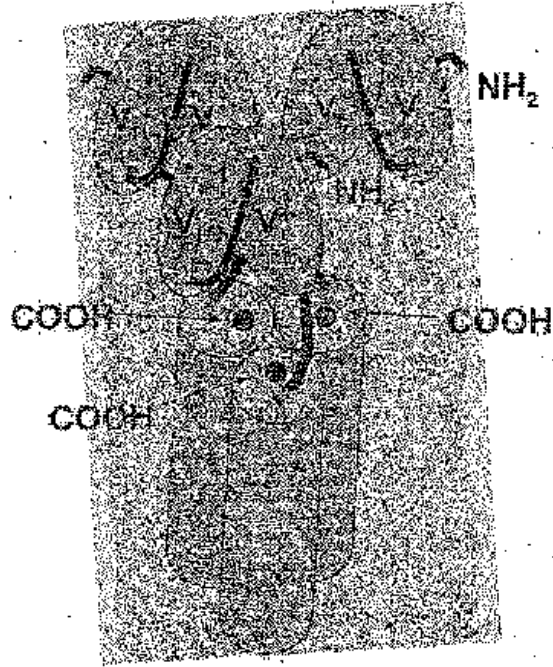


Figura 8

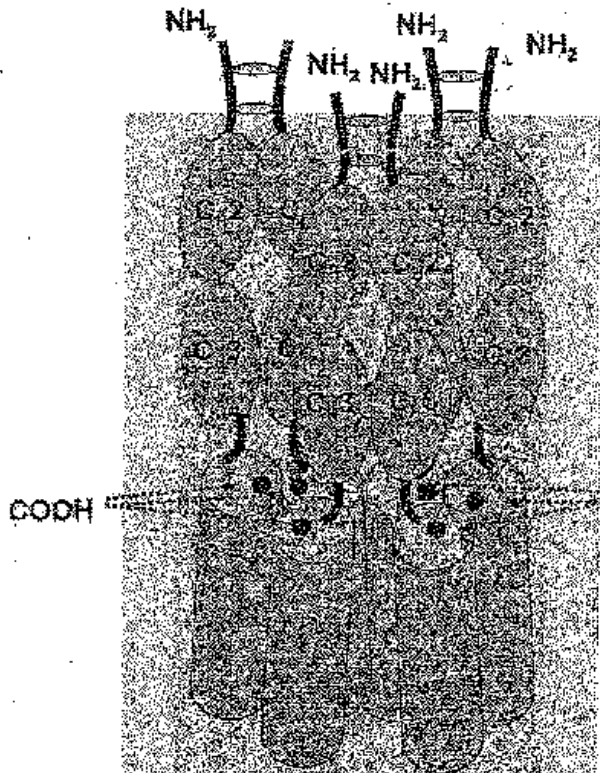


Figura 9

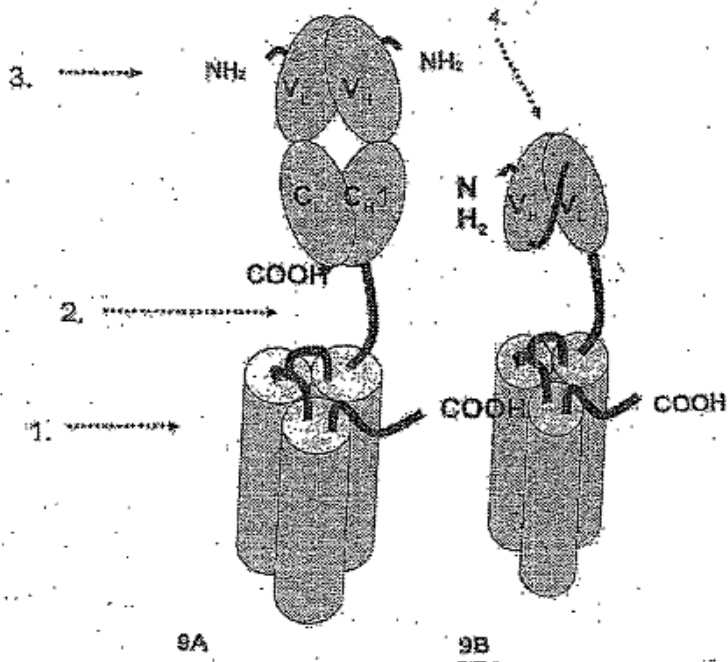


Figura 10

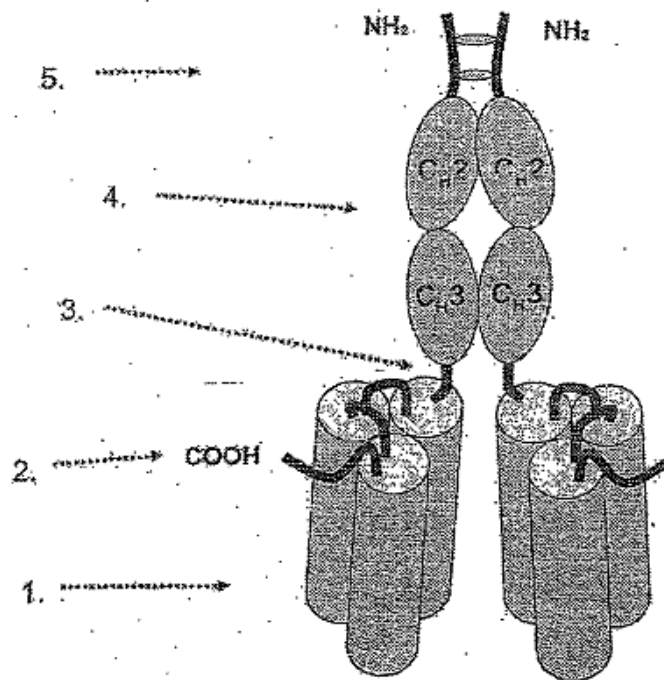


Figura 11

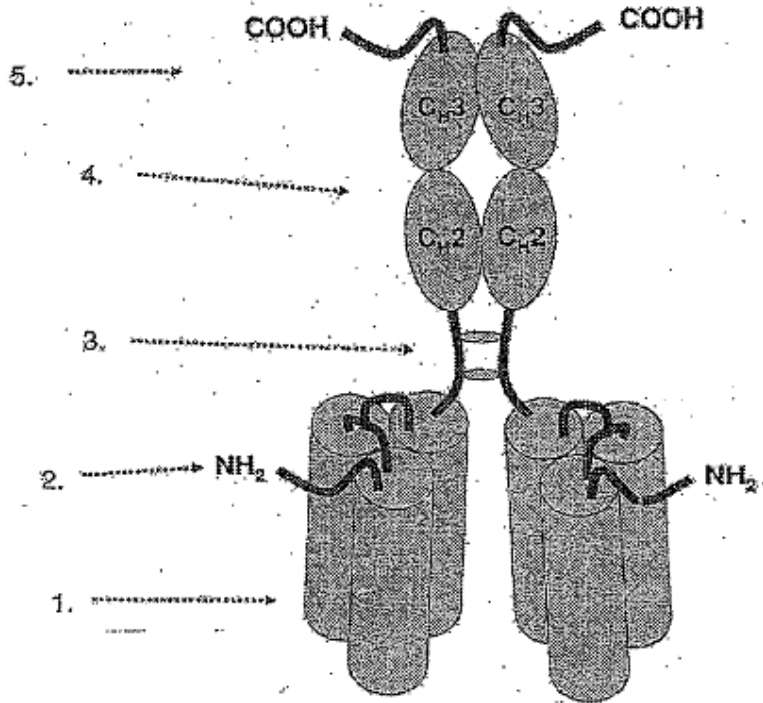


Figura 12

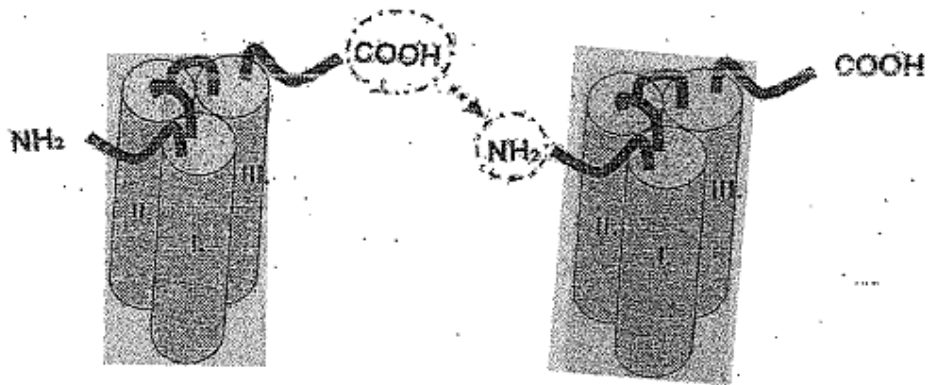


Figura 13

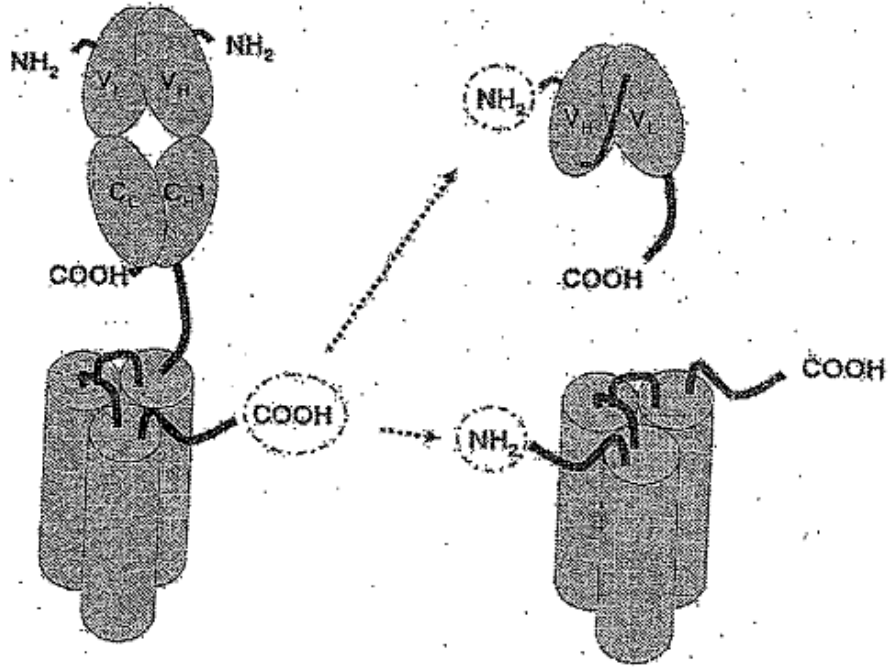


Figura 14

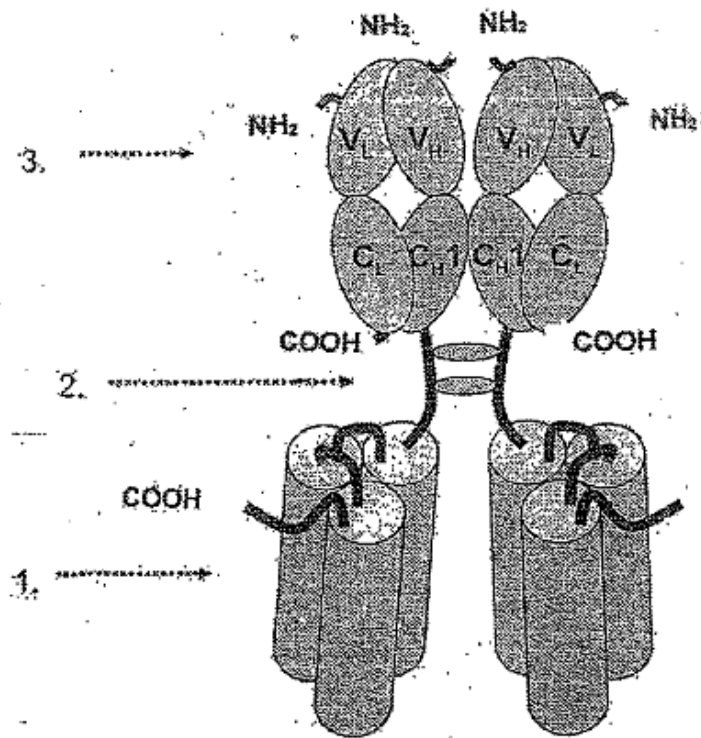


Figura 15

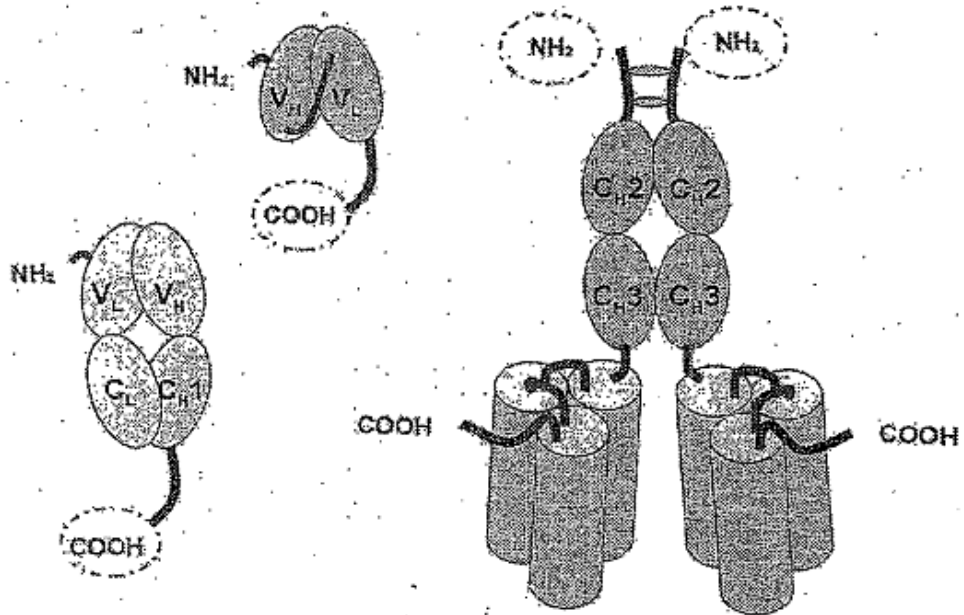


Figura 16

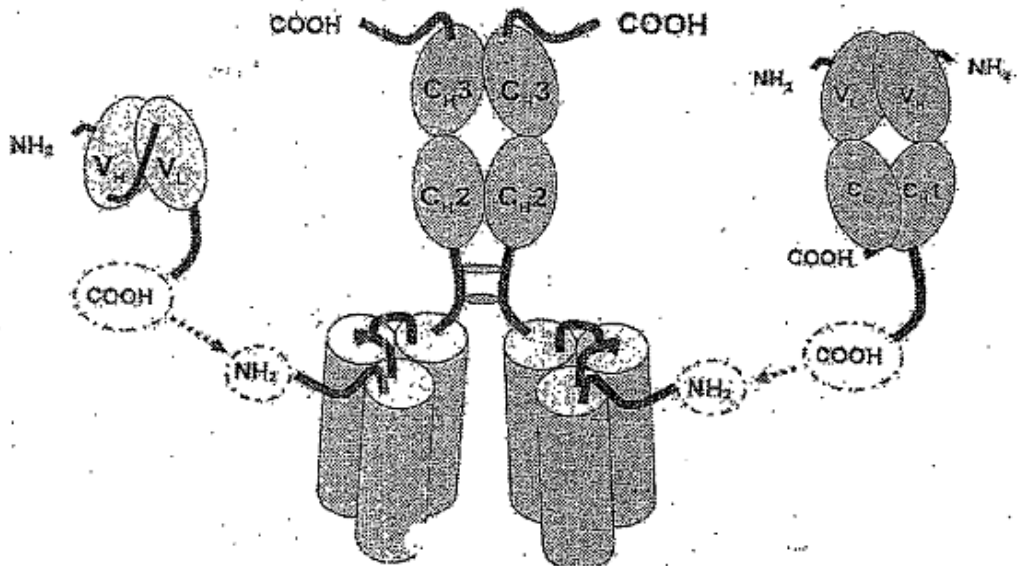
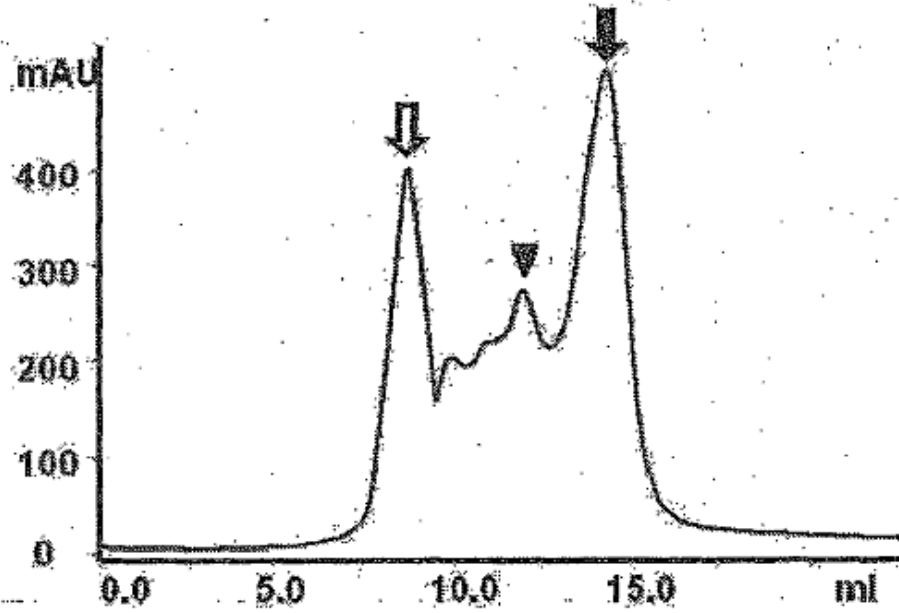




Figura 17

A. Agregación de proteína de TNF-SF



B. Proteína soluble definida por la proteína de TNF-SF

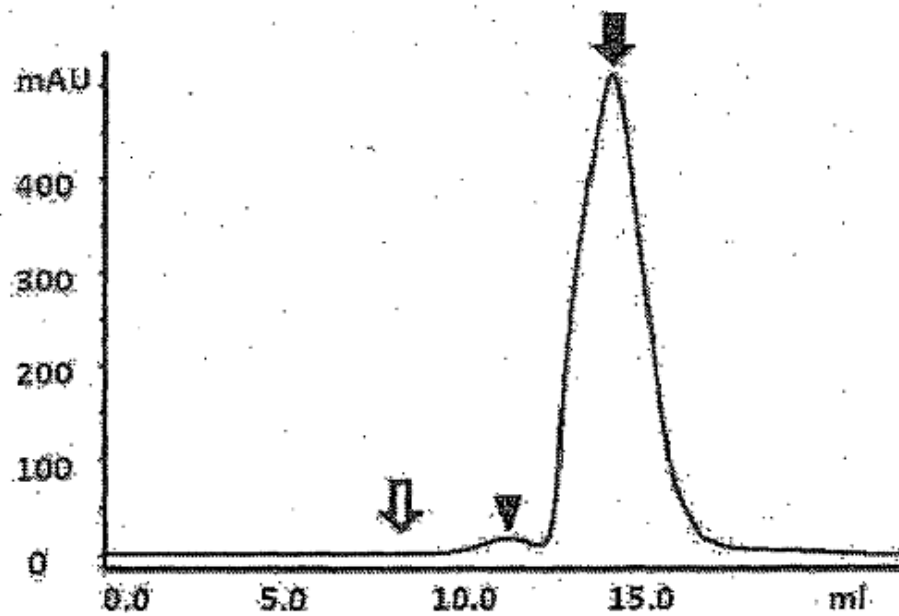


Figura 18

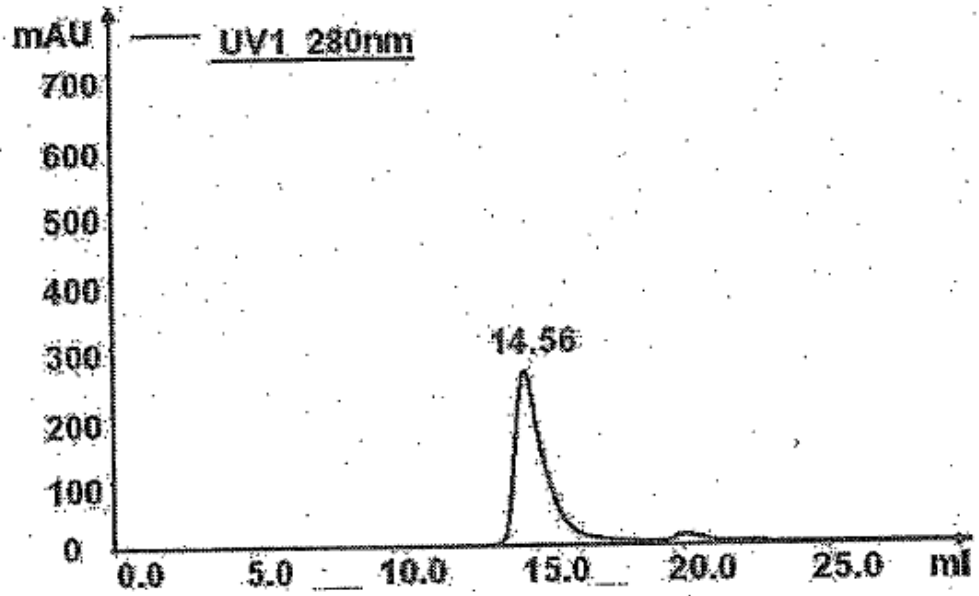


Figura 19

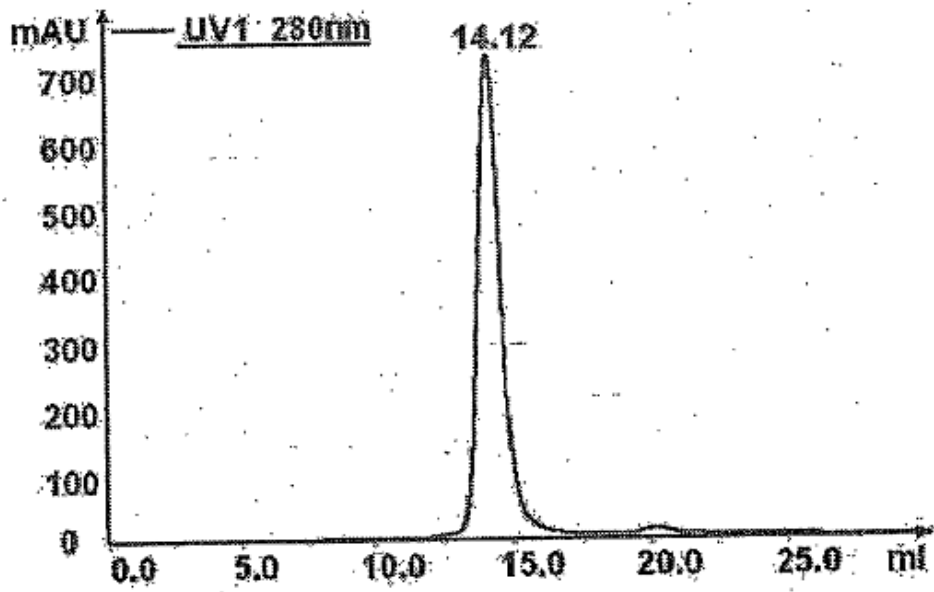


Figura 20

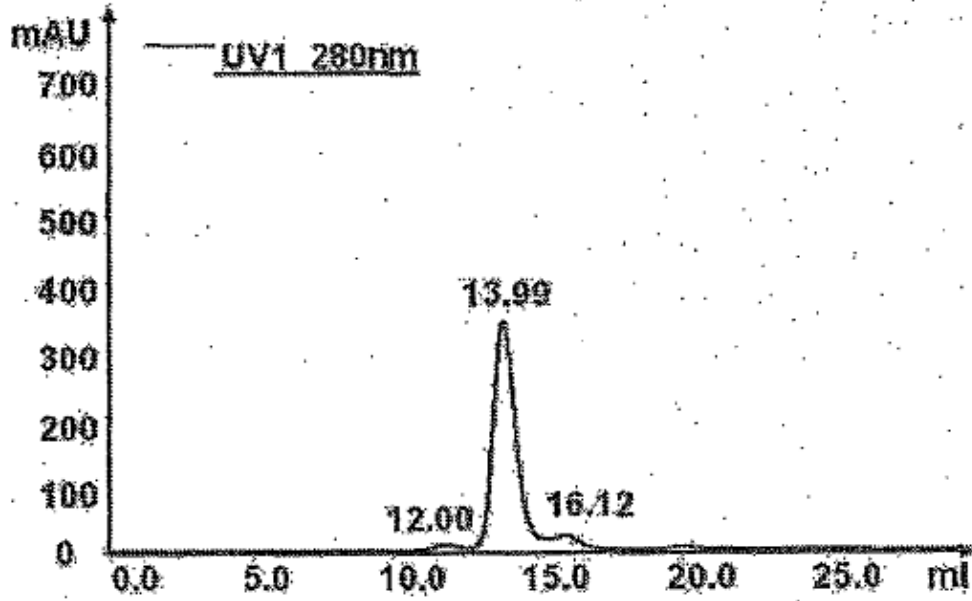


Figura 21

A

```

Gly201      1  2  Arg121
I:   N G S G N G S S G
II:  G G S G N G S S G
III: G G S G N G S S G
    
```

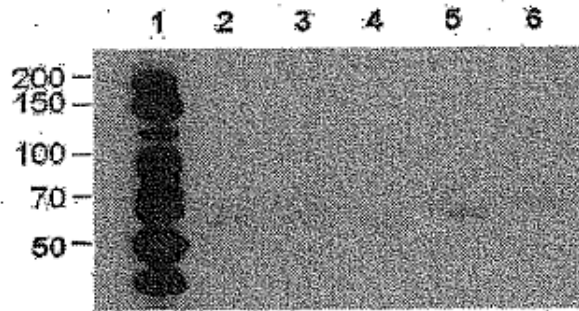
B



C

Proteína	Esquema del enlazador:
scTRAILwt-NSNS	ambos enlazadores con Asn en pos-1
scTRAILwt-NSN	enlazador-1 con Asn en pos-1, enlazador-2 con Asn en pos-2
scTRAILwt-NSSS	enlazador-1 con Asn en pos-1, enlazador-2 con Ser en pos-2
scTRAILwt-SNNS	enlazador-1 con Ser en pos-1, enlazador 2 con Asn en pos-2
scTRAILwt-SNSN	ambos enlazadores con Asn en posición-2

Figura 22



Pista	Muestra	Glicosilación del enlazador observada
1	PageRuler, Fermentas	
2	seTRAILw-NNS	sin glicosilación del enlazador
3	seTRAILw-NSSN	Enlazador-2 posición-2 glicosilada
4	seTRAILw-NSSS	sin glicosilación del enlazador
5	seTRAILw-SNNS	Enlazador-1 posición-2 glicosilada
6	seTRAILw-SNSN	Enlazador-1 y Enlazador 2 posición-2 glicosilada

Figura 23

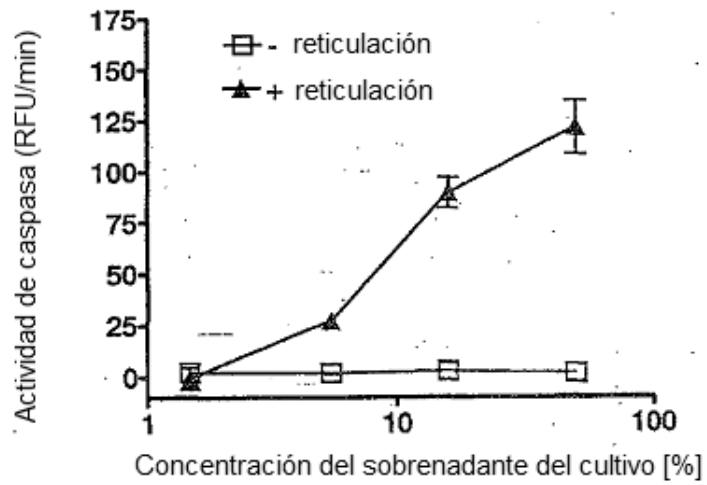


Figura 24

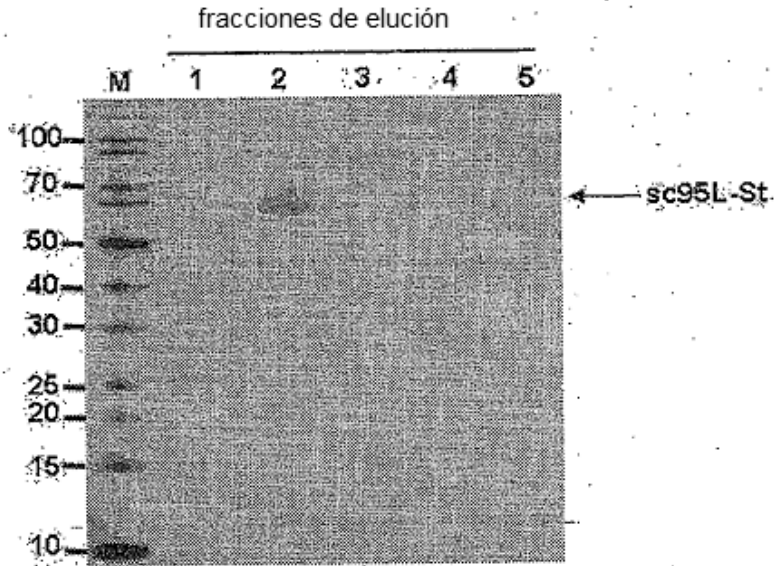


Figura 25

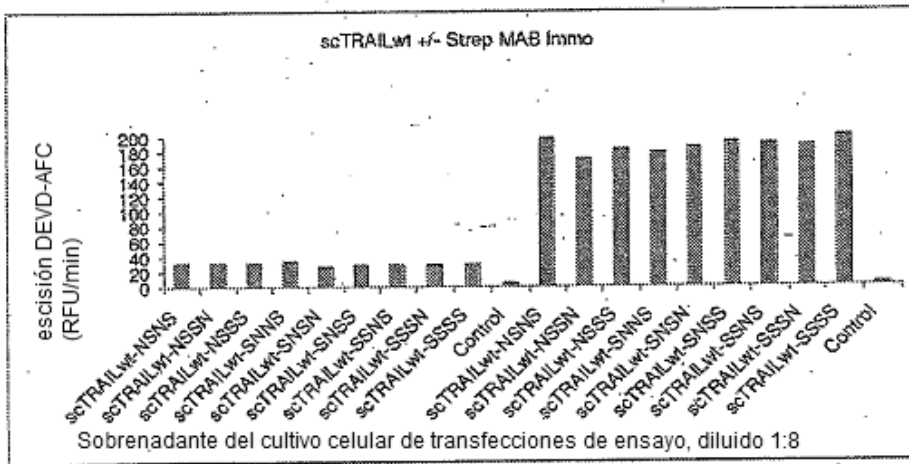


Figura 26

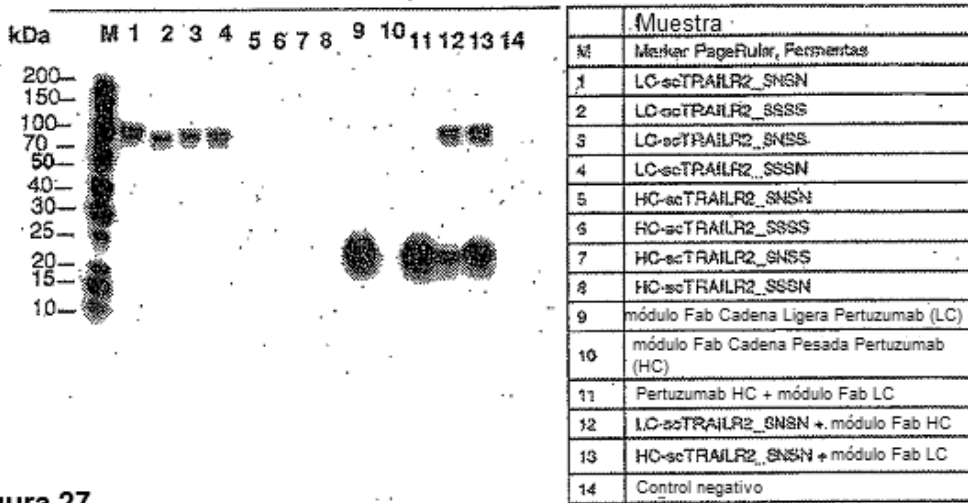


Figura 27

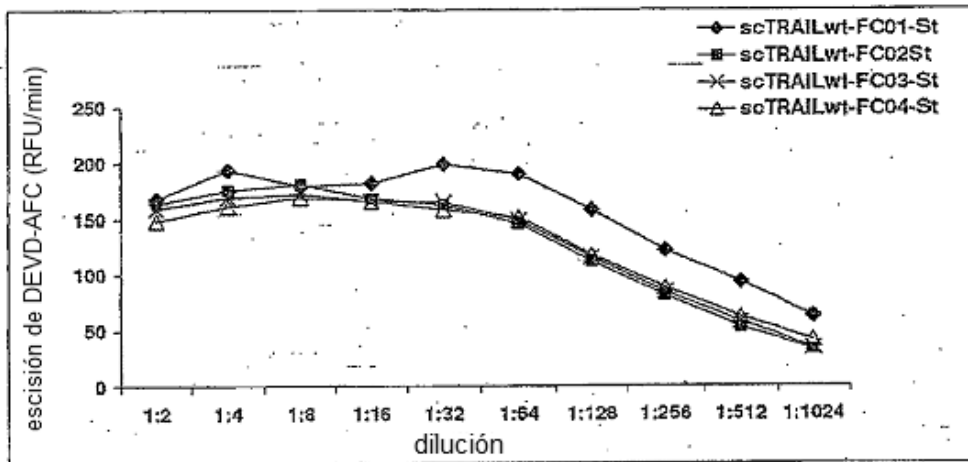


Figura 28

