(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 545 895**

(51) Int. CI.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/21 (2006.01)
C12N 15/23 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2011 E 11790636 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2646464**

(54) Título: **Proteína de fusión anticancerígena**

(30) Prioridad:

03.12.2010 PL 39314610
18.04.2011 PL 39459711

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2015

(73) Titular/es:

ADAMED SP. Z O.O. (100.0%)
Pienków 149
05-152 Czosnów k/Warszawy, PL

(72) Inventor/es:

PIECZYKOLAN, JERZY SZCZEPAN;
LEMKE, KRZYSZTOF KAZIMIERZ;
PAWLAK, SEBASTIAN y
ZEREK, BARTLOMIEJ

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Proteína de fusión anticancerígena

La invención se refiere al campo de las proteínas de fusión terapéuticas, en particular a proteínas de fusión recombinantes. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas de fusión que contienen el fragmento de una secuencia de la proteína humana soluble TRAIL 5 en combinación con una secuencia de un péptido inmunoestimulador, a composiciones farmacéuticas que las contienen, a su uso en terapia, en particular como agentes anticancerígenos, y a secuencias polinucleotídicas que codifican las proteínas de fusión, a vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleotídicas y a células hospedadoras que contienen estos vectores de expresión.

La proteína TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) que pertenece a la familia de las citocinas, también conocida como Apo2L (ligando de Apo2), es un potente activador de la apoptosis en células tumorales y en las células infectadas con virus. TRAIL es un ligando de origen natural en el cuerpo. La proteína TRAIL, su secuencia de aminoácidos, secuencias de ADN codificante y sistemas de expresión de proteínas, se describen por primera vez en el documento EP0835305A1.

La proteína TRAIL ejerce su actividad anticancerígena mediante la unión a receptores de superficie 1 y 2 proapoptóticos de TRAIL (TRAIL-R1/R2) y la posterior activación de estos receptores. Estos receptores, también conocidos como DR4 y DR5 (receptor de muerte 4 y receptor de muerte 5), pertenecen a la familia de receptores de TNF y se hiperexpresan en diferentes tipos de células cancerígenas. La activación de estos receptores puede inducir una vía de señalización externa de la apoptosis, independiente del gen supresor p53, que por medio de una caspasa-8 activada conduce a la activación de caspasas ejecutoras y de este modo a la degradación de ácidos nucleicos. La caspasa-8 liberada después de la activación de TRAIL también puede causar la liberación de la proteína Bid y de este modo una activación indirecta de la vía mitocondrial, traslocándose la proteína Bid a la mitocondria, en donde estimula la liberación de citocromo c, amplificando así indirectamente la señal apoptótica de los receptores de muerte.

TRAIL actúa selectivamente sobre las células tumorales, esencialmente sin inducir la apoptosis en las células sanas que son resistentes a esta proteína. Por lo tanto, el enorme potencial de TRAIL ha sido reconocido como un agente anticancerígeno que actúa sobre una amplia gama de diferentes tipos de células tumorales, incluyendo neoplasias hematológicas y tumores sólidos, respetando las células normales y ejerciendo unos efectos secundarios que son de forma potencial relativamente pequeños.

La proteína TRAIL es una proteína de membrana de tipo II que tiene una longitud de 281 aminoácidos, y su región extracelular que comprende los residuos de aminoácidos 114-281 después de la escisión con proteasas, forma la molécula sTRAIL soluble con un tamaño de 20 kDa, que también es biológicamente activa. Ambas formas, TRAIL y sTRAIL, son capaces de desencadenar la apoptosis a través de la interacción con receptores de TRAIL presentes en las células diana. Se ha mostrado una actividad antitumoral fuerte y muy baja toxicidad sistémica de la parte soluble de la molécula de TRAIL mediante ensayos que empleaban líneas celulares.

Estudios clínicos en humanos con TRAIL soluble humana recombinante (rhTRAIL) que tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 114-281 de hTRAIL, conocida con el INN dulanermina, mostraron también su buena tolerancia y una ausencia de toxicidad limitante de la dosis.

Un fragmento de TRAIL más corto que 114-281 también se encontró que era capaz de unirse a receptores de muerte de la membrana e inducir la apoptosis a través de estos receptores, como se ha informado recientemente para un mutante permutado circularmente, recombinante de hTRAIL 122-281, por ejemplo en el documento EP 1 688 498.

Los efectos tóxicos de la proteína TRAIL recombinante sobre las células hepáticas, descritos hasta la fecha, parecen estar asociados con la presencia de una modificación, es decir, marcadores de polihistidina, mientras que TRAIL sin marcar no mostraba ninguna toxicidad sistémica.

Sin embargo, en el curso de una investigación y un desarrollo adicionales, parecía que muchas células cancerígenas también mostraban resistencia primaria o adquirida frente a TRAIL (véase, por ejemplo, el documento WO2007/022214). Aunque el mecanismo de resistencia frente a TRAIL no se ha entendido completamente, se cree que se puede manifestar en diferentes niveles de la vía de la apoptosis inducida por TRAIL, variando desde el nivel de receptores de la superficie celular hasta las caspasas ejecutoras dentro de la vía de señalización. Esta resistencia limita la utilidad de TRAIL como un agente anticancerígeno.

Además, en ensayos clínicos en pacientes, la eficacia real de TRAIL como monoterapia demostró ser baja. Para superar esta eficiencia baja y la resistencia de los tumores a TRAIL, se diseñaron diversas terapias de combinación con agentes radioterapéuticos y quimioterapéuticos, lo que dio como resultado un efecto apoptótico sinérgico (documento WO2009/002947; A. Almasan y A. Ashkenazi, Cytokine Growth Factor Reviews 14 (2003) 337-348; RK Srivastava, Neoplasis, vol 3, nº 6, 2001, 535-546, Soria JC et al., J. Clin. Oncology, vol 28, nº 9 (2010), pág. 1527-15333). El uso de rhTRAIL para el tratamiento del cáncer en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales seleccionados (paclitaxel, carboplatino) y anticuerpos monoclonales anti-VEGF, se describe en el documento WO2009/140469. Sin embargo, una combinación de este tipo implica necesariamente deficiencias bien conocidas de la quimioterapia o radioterapia convencional. Se ha descrito que una proteína de fusión construida que contiene

secuencias del inhibidor de la angiogénesis vasostatina y de TRAIL, unidas con un enlazador con sitio de escisión para metaloproteasa, muestra un efecto inductor de la apoptosis en células tumorales por A.I. Guo et al. en Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology 2008, vol. 24(10), 925-930. Se ha descrito que una proteína de fusión construida que contiene las secuencias Tumstatina183-230 del inhibidor de la angiogénesis tumstatina y TRAIL114-281, muestra una inducción de la apoptosis de células de cáncer de páncreas por N. Ren et al. en Academic Journal of Second Military Medical University 2008, vol. 29(5), 474-478.

El documento US2005/244370 y el correspondiente WO2004/035794 dan a conocer la estructura artificial de TRAIL95-281 como un dominio efector ligado a través de un enlazador peptídico, con la parte extracelular de otro miembro de los ligandos DC40 de la familia de TNF, como un dominio de unión a la superficie celular. Se indica que la activación de la estructura artificial es a través de la unión de su parte CD40.

Además, el problema relacionado con la terapia de TRAIL ha demostrado ser su baja estabilidad y la rápida eliminación del organismo después de la administración.

También es conocido el efecto ventajoso de las citocinas en la terapia del cáncer. Un miembro de la familia de las citocinas es el interferón, una proteína que estimula el sistema inmune. Los interferones son importantes agentes anticancerígenos o auxiliares terapéuticos contra el cáncer (Borden y Williams, Interferons, Cancer Medicine, quinta edición, 815-824, 2000). Se ha mostrado que uno de los efectos de los interferones es una fuerte estimulación de múltiples factores proapoptóticos, incluyendo el ligando TRAIL.

Un representante del grupo de interferones de tipo II es el interferón gamma (IFN-γ), que es una citocina dímera soluble. El IFN-γ es secretado por las células NK, NKT, Th1, Tc y dendríticas. El ligando de IFN-γ se une a dos tipos de receptor de IFN-γ, Rα y RB1 y activa la vía JAK-STAT. Uno de sus efectos es una estimulación intensa de los monocitos humanos para producir proteína TRAIL, lo que afecta significativamente a su capacidad para eliminar células cancerígenas (Griffith et al, J. Exp. Med., 189: 1343-1353, 1999).

El interferón gamma activa el receptor del IFN gamma, estimulando la toxicidad dependiente de anticuerpo y potencia el proceso de conexión de las células con células tumorales. Además, el IFN gamma activa las caspasas, induciendo de ese modo la apoptosis en las células cancerígenas. Además, se ha mostrado que en muchas líneas tumorales que muestran resistencia a la apoptosis estimulada por TRAIL, el interferón gamma actúa sinérgicamente, contribuyendo a su sensibilidad frente a TRAIL (Wang et al, Oncogene, 23: 928-935, 2004). Sin embargo, las terapias existentes que empleaban IFN gamma no eran suficientemente eficaces para tener uso en el tratamiento de enfermedades cancerígenas.

Los efectos beneficiosos del interferón alfa sobre la inducción de la sobreproducción de TRAIL en células de mieloma, linfomas y cáncer de hígado, también se han demostrado (Chen y col, Blood, 98: 2183-21192; Herzer et al, Cancer Res. 69(3): 855-862, 2009). El interferón alfa se considera que es un modulador de la respuesta biológica que refuerza las respuestas naturales del organismo frente a enfermedades. Esto afecta tanto a la inmunidad celular como la humoral. Estimula la producción de anticuerpos anti-cancerígenos, activa la acción citotóxica de los macrófagos, células NK y linfocitos. El IFN alfa también incrementa la expresión de antígenos de histocompatibilidad HLA sobre las células cancerígenas, lo que facilita su reconocimiento por las células inmunes. Interviene en la desaceleración del crecimiento y las divisiones de las células cancerígenas y, en consecuencia, en su muerte.

El interferón alfa se ha usado para tratar varios tipos de cáncer, incluyendo tricoleucemia, melanoma, cáncer de riñón, leucemia mieloblástica y mielocítica, linfoma, sarcoma de Kaposi y otras enfermedades neoplásicas de la sangre (Folkman J., N. Engl. J. Med.1995, 333: 1757-1763; Sidky YA, Borden EC. Cancer Res. 1987. 47: 5155-5161; Iwagak H, Hizuta A, Yoshino T, et al, Anticancer Res. 1993, 13:13-15; Rubinger M, Plenderleith IH, Lertzman M, et al, Chest. 1995, 108:281-282). Sin embargo, con la dosis requerida para lograr un efecto terapéutico en los pacientes, se observaron efectos tóxicos, tales como neutropenia, síntomas parecidos a la gripe, malestar general, anorexia y disfunción hepática. Debido a estos efectos secundarios, la terapia con interferón alfa se interrumpe a menudo, lo que hace que esta terapia sea ineficaz. Por otra parte, la semivida biológica de la mayoría de las citocinas, incluyendo el interferón-alfa, es corta y tiene una duración de hasta varias horas, debido a que se necesitan inyecciones frecuentes. Por diversas razones, el uso frecuente del fármaco no es conveniente para el paciente (especialmente en un tratamiento a largo plazo). Esto ha dado lugar a la necesidad de diseñar formulaciones de liberación prolongada de interferón-alfa.

Se han realizado varios intentos para mejorar las propiedades del interferón alfa. El intento de extender la semivida biológica del interferón proporcionando fusiones heterodímeras con proteínas transportadoras que comprenden enlazadores que permiten el plegamiento correcto de las proteínas de fusión expresadas, se da a conocer por ejemplo en el documento US7943733. Otros intentos se basan en la estructura determinada de la forma biológicamente activa del interferón, es decir, sus homodímeros no covalentes formados naturalmente que se forman mediante un interbloqueo anti-paralelo de los dos monómeros en el sitio del receptor con un ion zinc (Zn^{2+}) (R. Radhakrishnan, Structure 1996, vol. 4 nº 12, 1453-1463). Las estructuras artificiales de homodímeros de interferón alfa unidos a través de un enlazador de glicina-serina, se mencionan en el documento de solicitud de patente LT2010012, pero no se proporcionan sus datos de actividad.

El IFNγ también es conocido por actuar como homodímero asociado de forma no covalente, en el que dos cadenas polipeptídicas idénticas están orientadas de un modo antiparalelo para generar una molécula simétrica (Ealick, S.E., Science (1991) 262, 698-702). Por lo tanto, existe la posibilidad de que formas dímeras de IFNγ pudieran ocupar el sitio de unión del receptor de forma más eficaz, pero esta hipótesis no se ha confirmado clínicamente.

Los intentos para desarrollar derivados de interferón alfa que estén exenton de los efectos secundarios mencionados anteriormente, dieron como resultado la introducción del tratamiento de interferones alfa pegilados de acción prolongada. La pegilación es uno de los métodos más populares para la administración de proteínas en el cuerpo de los mamíferos, con el fin de reducir o superar los efectos secundarios de la sustancia activa. El principio de la pegilación es la creación de una barrera protectora alrededor de las moléculas modificadas, lo que da como resultado una prolongación temporal de la concentración deseada de la sustancia (debido al cambio de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas). El tiempo de absorción se alarga y el tiempo para la eliminación del cuerpo es más largo.

Los valores de estos parámetros dependen de la estructura de las moléculas de polietilenglicol (PEG): longitud de la cadena, linealidad, grado de ramificación, tipo y número de sitios de unión, y del número de moléculas de glicol fijadas. [Delgado C, Francis GE, Fisher D., The uses and properties of PEG-linked proteins. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1992; 9 (3-4): 249-304].

La pegilación no afecta a la forma en que se une el interferón a su receptor. Estudios preclínicos han mostrado que el interferón alfa pegilado se une al receptor de IFNα-2a y ejerce la misma o una actividad biológica superior *in vitro*, como se confirmó en las pruebas en cultivos de células tumorales y en ratones con células de carcinoma renal humano implantadas [Nieforth K, Nadeau R, Patel IH, Mould D. Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare in vivo activity of interferon α-2a and a polyethylene glycol -modified derivative in healthy subjects, Clin. Pharmacol. Ther. 1996; 59: 636-46; Paul G, et al. Pegylated interferon - α-2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Clin. Pharmacol. Ther. 2000; 68: 556-67].

A pesar de los datos prometedores procedentes de experimentos en modelos animales, preparaciones disponibles comercialmente que contienen interferón pegilado, PEGIntron® y PEGASYS® (G. Pasut, F.M. Veronese, Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 933-961) con una cadena de PEG de 40 kDa ramificada y una cadena de 12 kDa lineal de PEG fijadas a IFNα, respectivamente, mostraron un perfil de seguridad cualitativamente similar o incluso peor que el de las moléculas de interferón sin modificar correspondientes (Bukowski R. M. et al., Cancer, 95(2):389-96 (2002); Bukowski R. M. et al., Journal of Clinical Oncology, 20(18):3841-3949 (2002); Motzer, R. J. et al., J. Clin. Oncol., 19(5): 1312-9 (2001); Tong M. J., Journal of Interferon and Cytokine Research, 18:81-86 (1998); Yao G. B. et al., Journal of Gastroenterology and Hepatolog., 15:1165-1170 (2000); Heathcote E. J. et al, N. Engl. J. Med., 343(23):1673-80 (2000); Tong M. J. et al., Hepatology; 26(3):747-54 (1997)).

Los efectos secundarios observados más frecuentemente en la terapia con IFNα pegilado incluyen: nausea dependiente de la dosis, anorexia, rigidez de los músculos. Además, la terapia reveló limitaciones de la dosis, tales como fatiga grave, neurotoxicidad, mal funcionamiento del hígado e inhibición de las funciones de la médula ósea (PEGIntron® a dosis de 7,5 µg/kg y superiores) (Bukowski R. M. et al., Cancer; 95(2):389-96 (2002)).

Shin J.N. et al en "Generation of a novel preform of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein that can be reactivated by matrix metalloproteinases", Experimental Cell Research, vol. 312, nº 19, páginas 3892-3898 (2006) describen una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 114-281 de TRAIL humano, ligados a interleucina 18 a través de un enlazador del sitio de escisión de la proteasa para superar la toxicidad hepática de TRAIL. La proteína de fusión muestra una acción anticancerígena muy limitada en comparación con TRAIL solo. El interferón gamma también se fusionó con TRAIL a través del enlazador del sitio de escisión de la proteasa, sin embargo, no se seleccionó para una investigación posterior.

Clark P.E. et al en "TRAIL and interferon-alpha Act Synergistically to Induce Renal Cell Carcinoma Apoptosis", Journal of Urology, vol. 184, nº 3, páginas 1166-1174 (2010) describen que la coadministración de TRAIL (proteína completa) e interferón alfa conduce a un efecto sinérgico. Se ha revelado que el resultado forma una base para someter a ensayo la combinación de estos agentes de forma adicional, a nivel *in vivo* y clínico. No se menciona, ni se sugiere que el efecto observado de una administración combinada de estos dos péptidos distintos, podría traducirse en el mismo efecto que cuando se administra una sola proteína de fusión que comprende ambos péptidos.

Por lo tanto, a pesar de la existencia de terapias contra el cáncer empleadas clínicamente, basadas tanto en la proteína TRAIL como en las proteínas de la familia del interferón (también modificadas, en particular, mediante pegilación), estas no son suficientemente eficaces y tienen muchos inconvenientes bien conocidos, entre los cuales uno de los más graves y restrictivos es la eficacia limitada del tratamiento, la falta de selectividad frente a las células cancerígenas, los efectos secundarios y la resistencia primaria o adquirida. Todavía existe una necesidad de mejora de la terapia del cáncer basada tanto en la actividad del interferón como de la proteína TRAIL, que sería a la vez eficaz y selectiva *in vivo* frente a las células cancerígenas. Sigue existiendo una necesidad urgente y no satisfecha de nuevos agentes contra el cáncer que permita tanto ampliar la gama de agentes disponibles, como encontrar agentes que sean más eficaces (citotóxicos) y selectivos. También existe una necesidad de nuevos agentes selectivos con mayor estabilidad y una farmacocinética mejorada.

La presente invención proporciona una solución de este problema por medio de nuevas proteínas de fusión que incorporan un dominio obtenido a partir de TRAIL y un dominio peptídico efector corto que tiene actividad estimuladora del sistema inmune, cuyo péptido efector no incluye fragmentos de TRAIL, en donde el péptido efector potencia o complementa la acción de TRAIL. Además, ha resultado que en muchos casos las proteínas de fusión de la invención son más potentes que TRAIL soluble y sus variantes que consisten en fragmentos de su secuencia, así como más potentes que péptidos efectores respectivos. En muchos casos, las proteínas de fusión novedosas también superan la resistencia a TRAIL. Por otra parte, la incorporación del péptido efector da como resultado una semivida prolongada y una mayor retención de la proteína en el tumor y su eficacia mejorada. Además, en ciertas variantes, las proteínas de fusión novedosas pueden ser capaces de enlazarse a PEG, lo que tiene un efecto protector contra proteasas no específicas y, además, altera las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, particularmente con respecto a la prolongación de la semivida biológica.

Descripción de las Figuras

La invención se describirá ahora en detalle con referencia a las Figuras de los dibujos.

La Fig. 3 presenta estructuras esquemáticas de proteínas de fusión de la invención de acuerdo con los Ej. 12, Ej. 13, Ej. 14 y Ej. 15.

La Fig. 4 presenta una estructura esquemática de la proteína de fusión de la invención de acuerdo con el Ej. 16.

La Fig. 5 muestra espectros de dicroísmo circular para rhTRAIL114-281, rhTRAIL95-281 y proteínas de fusión del Ej. 12 y Ej. 14 expresados en elipsidad específica.

La Fig. 6 presenta cambios en el volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:DC1-Foxn1nu afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 12 y Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 7 presenta los valores de inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) en ratones Crl:DC1-*Foxn1^{nu}* afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 12 y Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 8 presenta cambios en el volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 9 presenta los valores de inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 10 presenta cambios en el volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 11 presenta los valores de inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 12 presenta cambios en el volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de hígado HepGe, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 13 presenta los valores de inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de hígado HepG2, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 en comparación con rhTRAIL114-281.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a una proteína de fusión que comprende:

un dominio (a) que es el fragmento funcional de una secuencia de la proteína hTRAIL soluble, cuyo fragmento comienza con un aminoácido en una posición no inferior a hTRAIL95, o un homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos 70% de identidad de secuencia, y

un dominio (b) que es una secuencia de un péptido efector inmunoestimulador seleccionado a partir del grupo que consiste en el seudodímero del interferón gamma de SEQ Nº 19 y el seudodímero del interferón alfa de SEQ Nº 46, en donde la secuencia del dominio (b) está fijada al extremo C-terminal o N-terminal del dominio (a).

La expresión "el fragmento soluble funcional de una secuencia de hTRAIL soluble" se entiende que se refiere a cualquier fragmento de hTRAIL soluble que es capaz de inducir una señal apoptótica en células de mamífero después de la unión a sus receptores en la superficie de las células.

Un experto en la materia también apreciará que en la técnica se conoce la existencia de al menos 70% de homología de la secuencia de TRAIL.

Se debe entender que el dominio (b) del péptido efector en la proteína de fusión de la invención no es ni proteína hTRAIL ni una parte o un fragmento de la proteína hTRAIL.

El término "péptido" de acuerdo con la invención debe entenderse como una molécula construida a partir de una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí por medio de un enlace peptídico. Por lo tanto, el término "péptido", de acuerdo con la invención incluye oligopéptidos, polipéptidos y proteínas.

En la presente invención, las secuencias de aminoácidos de los péptidos se presentan en una manera convencional adoptada en la técnica, es decir, en la dirección desde el extremo N-terminal (extremo N) del péptido hacia su extremo C-terminal (extremo C). Cualquier secuencia tendrá así su extremo N-terminal en el lado izquierdo y su extremo C-terminal en el lado derecho de su presentación lineal.

La proteína de fusión de la invención puede incorporar un único dominio (b) del péptido efector, que se fija al extremo C-terminal o N-terminal del dominio (a).

En una realización particular, el dominio (a) es un fragmento de la secuencia de hTRAIL, que comienza con un aminoácido del intervalo hTRAIL95 a hTRAIL122, inclusive, y termina con el aminoácido hTRAIL281.

En particular, el dominio (a) se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en las secuencias correspondientes a hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL116-281, hTRAIL120-281, hTRAIL121-281 y hTRAIL122-281. Para los expertos en la técnica será evidente que hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL116-281, hTRAIL120-281, hTRAIL121-281 y hTRAIL122-281 representan un fragmento de la proteína TRAIL humana que comienza con un aminoácido marcado con el número 95, 114, 116, 120, 121 y 122, respectivamente, en la secuencia conocida de hTRAIL publicada en GenBank con el nº de orden P50591 y presentada como SEQ. Nº 16 en la Lista de Secuencias adjunta.

En otra realización particular, el dominio (a) es un homólogo del fragmento funcional de la secuencia proteica de hTRAIL soluble que comienza en la posición del aminoácido no inferior a hTRAIL95 y termina en el aminoácido hTRAIL281, cuya secuencia es al menos 70%, preferiblemente 85% idéntica a la secuencia original.

En variantes específicas de esta realización, el dominio (a) es un homólogo de un fragmento seleccionado a partir del grupo que consiste en las secuencias correspondientes a hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL116-281, hTRAIL120-281, hTRAIL121-281 y hTRAIL122-281.

Se debe entender que un homólogo de un fragmento de hTRAIL es una variación/modificación de la secuencia de aminoácidos de este fragmento, en el que al menos un aminoácido se cambia, incluyendo 1 aminoácido, 2 aminoácidos, 3 aminoácidos, 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos y no más de 15% de los aminoácidos, y en donde un fragmento de la secuencia modificada conserva la funcionalidad de la secuencia de hTRAIL, es decir, la capacidad de unirse a los receptores de muerte de la superficie celular y la inducción de la apoptosis en células de mamífero. La modificación de la secuencia de aminoácidos puede incluir, por ejemplo, una sustitución, una deleción, un truncamiento y/o una adición de aminoácidos.

Preferiblemente, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene la secuencia modificada muestra una afinidad modificada hacia los receptores de muerte DR4 (TRAIL-R1) o DR5 (TRAIL-R2), en comparación con el fragmento natural de hTRAIL.

La expresión "afinidad modificada" se refiere al aumento de la afinidad y/o a una afinidad con una selectividad alterada hacia el receptor.

Preferiblemente, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene la secuencia modificada, muestra una mayor afinidad hacia los receptores de muerte DR4 y DR5, en comparación con un fragmento natural de hTRAIL.

Particularmente preferible, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene la secuencia modificada muestra una mayor afinidad hacia el receptor de muerte DR5, en comparación con el receptor de muerte DR4, es decir, un aumento de la selectividad DR5/DR4.

También preferiblemente, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene una secuencia modificada muestra una mayor selectividad hacia los receptores de muerte DR4 y/o DR5, en relación con la afinidad hacia los receptores DR1 (TRAIL-R3) y/o DR2 (TRAIL-R4).

Las modificaciones de hTRAIL que dan como resultado una mayor afinidad y/o selectividad hacia los receptores de muerte DR4 y DR5 son conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, a partir de la publicación Tur V, van

der Sloot AM, Reis CR, Szegezdi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ. DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. J. Biol. Chem. 2008 Jul 18;283(29):20560-8, que describe la mutación D218H que tiene una mayor selectividad hacia DR4 o Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. 2009 Jun;14(6):778-87, que describe la mutación D269H que tiene una afinidad reducida hacia DR4. Los mutantes de hTRAIL que tienen una mayor afinidad hacia un receptor seleccionado entre el DR4 y DR5 en comparación con los receptores DR1 y DR2 y un aumento de la afinidad hacia el receptor DR5 en comparación con DR4, también se describen en los documentos WO2009077857 y WO2009066174.

Las mutaciones adecuadas son una o varias mutaciones en las posiciones de hTRAIL natural seleccionadas a partir del grupo que consiste en 131, 149, 159, 193, 199, 201, 204, 204, 212, 215, 218 y 251, en particular, mutaciones que implican la sustitución de un aminoácido por un aminoácido básico tal como lisina, histidina o arginina, o aminoácidos tales como ácido glutámico o ácido aspárgico. Particularmente, se pueden especificar una o varias mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, Q193H, Q193K, N199H, N199R, K201H, K201R, K204E, K204D, K204L, K204Y, K212R, S215E, S215H, S215K, S215D, D218Y, D218H, K251D, K251E y K251Q, como se describen en el documento WO2009066174.

Las mutaciones adecuadas son también una o varias mutaciones en las posiciones de hTRAIL natural seleccionadas a partir del grupo que consiste en 195, 269 y 214, en particular mutaciones que implican la sustitución de un aminoácido por un aminoácido básico tal como lisina, histidina o arginina. Particularmente se pueden especificar una o varias mutaciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en D269H, E195R y T214R, tal y como se describen en el documento WO2009077857.

En una realización particular, el dominio (a) que es un homólogo del fragmento de hTRAIL, se selecciona a partir del mutante D218H de la secuencia de TRAIL natural, tal y como se describe en el documento WO2009066174, o el mutante Y189N-R191K-Q193R-H264R-1266R-D269H de la secuencia de TRAIL natural, tal y como se describe en Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP., Apoptosis. 2009 Jun; 14(6):778-87.

El péptido efector inmunoestimulador del dominio (b) es un péptido de citocina que estimula intensamente, entre otros, a los monocitos humanos para que produzcan la proteína TRAIL, lo que afecta significativamente a la capacidad de eliminar las células cancerígenas.

En una realización de la proteína de fusión de la invención, el péptido efector es un péptido que tiene actividad inmunoestimuladora seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ. Nº 19 (un seudodímero del INF gamma) y SEQ. Nº 46 (un seudodímero del interferón alfa 2b).

El péptido efector del grupo anterior es un péptido de 263 aminoácidos que constituye una fusión de dos subunidades del interferón gamma humano, formando un seudodímero de una sola cadena de INF gamma, descrito por Landar'a et al. (J. Mol. Biol. 299: 169-179, 2000). La variante de proteína de una sola cadena resultante conserva la capacidad de unirse al receptor adecuado y la actividad biológica esperada para el interferón gamma. Este péptido efector está presentado por SEQ. Nº 19.

Otro péptido efector del grupo anterior es un péptido de 351 aminoácidos, una fusión de dos subunidades 2b de interferón alfa humano que forma un seudodímero de una sola cadena de INF alfa 2b, en donde la segunda cadena de la secuencia de la subunidad 2b del IFN alfa se invierte en comparación con la secuencia natural (es decir, desde el extremo C-terminal al N-terminal). El péptido efector resultante se caracteriza por dos extremos C-terminales "naturales" de interferón alfa 2b unidos entre sí. Los monómeros en los dímeros de IFN alfa que se forman naturalmente, están unidos por sus extremos C-terminales. Los extremos N-terminales, a su vez, son responsables de la interacción con el receptor y proporcionan un entorno adecuado para la coordinación del proceso de dimerización del ion zinc (residuos de ácido glutámico 41 y 42). La variante de proteína de una sola cadena resultante conserva la capacidad de unirse al receptor adecuado y la actividad biológica esperada para el interferón alfa. Este péptido efector está representado por SEQ. Nº 46.

Después de la unión a los receptores de TRAIL presentes en la superficie de células cancerígenas, la proteína de fusión ejercerá un efecto doble. El dominio (a), que es un fragmento funcional de TRAIL o su homólogo con la funcionalidad conservada, ejercerá su actividad agonista conocida - es decir, la unión a receptores de muerte en la superficie celular y la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Después de la internalización de la proteína de fusión que comprende el péptido inmunoestimulador, el dominio (b) será capaz de ejercer potencialmente su acción de forma intracelular, en paralelo con la actividad del dominio TRAIL. De esta manera, la actividad anticancerígena de TRAIL se puede potenciar mediante la activación de otros elementos y mecanismos - tales como la estimulación de linfocitos B para producir anticuerpos, la estimulación de la expresión de las caspasas 7 y 8 o la estimulación de la hiperexpresión de TRAIL.

En una de las realizaciones de la invención, el dominio (a) y el dominio (b) están unidos por al menos un dominio (c) que comprende la secuencia de un sitio de escisión de proteasas, reconocido por proteasas presentes en el entorno

de la célula, especialmente en el entorno de la célula tumoral. La unión del dominio (a) con el dominio (b) a través de al menos un dominio (c) significa que entre los dominios (a) y (b) puede estar presente más de un dominio (c), en particular uno o dos dominios (c).

Un sitio de escisión de proteasas se puede seleccionar a partir de:

- una secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP, en particular, Pro Leu Gly Leu Ala Gly (PLGLAG en la convención de una letra) designada como SEQ. Nº 20,
- una secuencia reconocida por la urocinasa uPA, en particular, Arg Val Val Arg (RVVR en la convención de una letra) designada como SEQ. Nº 21,

y sus combinaciones.

En una de las realizaciones de la invención, el sitio de escisión de la proteasa es una combinación de la secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP y la secuencia reconocida por la urocinasa uPA, situadas una junto a la otra en cualquier orden.

En una realización, el dominio (c) es una combinación de MMP/uPA (SEQ. Nº 20/SEQ. Nº 21), que es la secuencia Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg (PLGLAGRVVR en la convención de una letra), o una combinación de uPA/MMP (SEQ. Nº 21/SEQ. Nº 20), que es la secuencia Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly (RVVRPLGLAG en la convención de una letra). Tales combinaciones se pueden repetir, preferiblemente dos veces.

Las proteasas metaloproteasa MMP y urocinasa uPA se hiperexpresan en el entorno del tumor. La presencia de la secuencia reconocida por las proteasas permite la escisión del dominio (a) a partir del dominio (b) después de la internalización de la estructura artificial, es decir, la liberación del dominio funcional (b) y por lo tanto su activación.

La presencia del sitio de escisión de la proteasa, al permitir la rápida liberación del péptido efector, aumenta las posibilidades de transportar el péptido hasta el lugar de su acción antes de que se produzca la degradación aleatoria de la proteína de fusión por las proteasas presentes en la célula.

En otra realización, entre los dominios (a) y (b) se incorpora adicionalmente el dominio (d) de una secuencia adecuada para la fijación de una molécula de PEG (enlazador PEG) a la proteína de fusión de la invención.

Tal enlazador PEG es, por ejemplo, una secuencia conocida Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu (ASGCGPE en la convención de una letra), designada como SEQ. Nº 22. El enlazador PEG también se puede seleccionar entre Ala Ala Cys Ala Ala (AACAA en la convención de una letra), Ser Gly Gly Cys Gly Gly Ser (SGGCGGS en la convención de una letra) y Ser Gly Cys Gly Ser (SGCGS en la convención de una letra), designadas, respectivamente, como SEQ. Nº 23, SEQ. Nº 24 y SEQ. Nº 25.

En una de las realizaciones, la proteína de la invención comprende tanto el dominio (c) como el dominio (d).

En una realización preferida, el dominio (d) se encuentra entre dos dominios (c), en particular entre dos dominios (c), que se seleccionan a partir del sitio de escisión de la proteasa y una combinación de sitios de escisión de proteasa, en particular, la secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20), la secuencia reconocida por la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), y la combinación MMP/uPA (SEQ. Nº 20/SEQ. Nº 21) o uPA/MMP (SEQ. Nº 21/SEQ. Nº 20).

Por lo tanto, en una realización de la proteína de fusión de la invención, el sitio de escisión de la proteasa es una combinación de la secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP y la secuencia reconocida por la urocinasa uPA, en cualquier orden, separadas por la secuencia de enlazador PEG descrita anteriormente.

Se debe entender que en el caso en el que la proteína de fusión tenga tanto el dominio (d) como el enlazador PEG y los dominios (c) del sitio de escisión entre los dominios (a) y (b), entonces los dominios (c) están situados de tal manera que después de la escisión de la estructura artificial, el dominio (d) está desconectado de los dominios (a) y (b). Estos dos dominios (c) pueden contener un sitio de escisión de proteasa aislado y combinaciones de los mismos, tal y como se ha definido anteriormente. En otras palabras, si la proteína de fusión contiene tanto el dominio (d) que comprende el enlazador PEG, como los dominios de sitios de escisión (c), entonces el dominio (d) estaría localizado entre los dominios (c). La invención no comprende una variante tal en la que el dominio (d) se encuentra entre el dominio (c) y el dominio (a) o entre el dominio (c) y el dominio (b), que es la variante en la que después de la escisión de la estructura artificial, la secuencia adecuada para la fijación a la proteína de fusión de la invención de una molécula de PEG (d) permanecería fijada al dominio (a) o al dominio (b).

Las moléculas de PEG útiles para la fijación a la proteína de fusión se pueden seleccionar a partir de moléculas de PEG lineales y ramificadas. Particularmente útil es una molécula de PEG lineal que tiene un peso molecular entre 4000 y 20000.

Aparte de los principales elementos funcionales de la proteína de fusión, el o los dominios del sitio de escisión y la secuencia del enlazador PEG, las proteínas de fusión de la invención pueden contener una secuencia o secuencias

neutras de un enlazador de glicina-serina estérico, flexible (espaciador). Tales enlazadores/espaciadores son bien conocidos y están descritos en la bibliografía. Su incorporación en la secuencia de la proteína de fusión es para proporcionar el plegamiento correcto de las proteínas producidas por el proceso de su hiperexpresión en las células hospedadoras.

Un enlazador estérico flexible se puede seleccionar a partir de cualquier combinación de residuos de glicina y serina. En particular, un enlazador flexible se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en Gly Ser Gly Gly Gly (GSGGG en la convención de una letra), Gly Gly Gly Ser (GGGS en la convención de una letra), Xaa Gly Gly Ser (XGGS en la convención de una letra) en donde Xaa designa cualquier aminoácido o está ausente, y Gly Gly Ser Gly (GGSG en la convención de una letra) designados, respectivamente, como SEQ. Nº 26, SEQ. Nº 27 y SEQ. Nº 28 y SEQ. N° 50.

Una realización específica de la proteína de fusión de la invención es una proteína de fusión que comprende un péptido inmunoestimulador, representado por SEQ. Nº 44.

Otras realizaciones específicas de la proteína de fusión de la invención son proteínas de fusión que comprenden un péptido inmunoestimulador, seleccionadas a partir del grupo que consiste en las proteínas representadas por SEQ. Nº 12, SEQ. Nº 13, SEQ. Nº 14 y SEQ. Nº 15.

Una descripción detallada de la estructura de proteínas de fusión representativas, mencionadas anteriormente se muestra en las Figuras 3 y 4, y en los ejemplos presentados en el presente documento a continuación.

De acuerdo con la presente invención, "una proteína de fusión" significa una única molécula de proteína que contiene dos o más proteínas o fragmentos de las mismas, unidos covalentemente a través de un enlace peptídico dentro de sus respectivas cadenas peptídicas, sin enlazadores químicos adicionales.

La proteína de fusión también se puede describir alternativamente como una estructura artificial proteica o una proteína quimérica. Según la presente invención, las expresiones "estructura artificial" o "proteína quimérica", si se utilizan, se deben entender como una referencia a la proteína de fusión tal y como se ha definido anteriormente.

Para una persona experta en la técnica será evidente que la proteína de fusión definida de este modo, se puede sintetizar por métodos conocidos de síntesis química de péptidos y proteínas.

La proteína de fusión se puede sintetizar por métodos de síntesis química de péptidos, especialmente utilizando las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida que emplean resinas adecuadas como vehículos. Tales técnicas son convencionales y conocidas en la técnica, y se describen, entre otras cosas en las monografías, tales como por ejemplo Bodanszky y Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, Nueva York, Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, 1984, Pierce Chemical Company.

La proteína de fusión se puede sintetizar por los métodos de síntesis química de péptidos como una proteína continua. Alternativamente, los fragmentos individuales (dominios) de proteína se pueden sintetizar por separado y combinarlos después entre sí en un péptido continuo a través de un enlace peptídico, mediante condensación del extremo amino terminal de un fragmento peptídico procedente del extremo carboxilo del segundo péptido. Tales técnicas son convencionales y bien conocidas.

Para verificar la estructura del péptido resultante, se pueden emplear métodos conocidos de análisis de la composición de aminoácidos, de péptidos, tales como la técnica de espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Para confirmar la secuencia del péptido se pueden utilizar también secuenciadores de proteínas, que degradan secuencialmente el péptido e identifican la secuencia de aminoácidos.

Preferiblemente, sin embargo, la proteína de fusión de la invención es una proteína recombinante, generada por métodos de expresión génica de una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión en células hospedadoras.

Un aspecto adicional de la invención es la secuencia de polinucleótidos, en particular la secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión tal y como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, la secuencia de polinucleótidos, en particular ADN, de acuerdo con la invención, que codifica la proteína de fusión tal y como se ha definido anteriormente, es una secuencia optimizada para la expresión en *E. coli*.

Otro aspecto de la invención es también un vector de expresión que contiene la secuencia de polinucleótidos, en particular la secuencia de ADN de la invención tal y como se ha definido anteriormente.

Otro aspecto de la invención es también una célula hospedadora que comprende un vector de expresión tal y como se ha definido anteriormente.

Una célula hospedadora preferida para la expresión de proteínas de fusión de la invención es una célula de *E. coli*.

Los métodos para generar proteínas recombinantes, incluyendo proteínas de fusión, son bien conocidos. En resu-

men, esta técnica consiste en generar una molécula de polinucleótidos, por ejemplo, una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína diana y dirigir la expresión de la proteína diana en el hospedador. A continuación, la molécula de polinucleótidos que codifica la proteína diana se incorpora en un vector de expresión apropiado, lo que asegura una expresión eficaz del polipéptido. A continuación, se introduce un vector de expresión recombinante en las células hospedadoras para la transfección/transformación, y como resultado se produce una célula hospedadora transformada. Esto viene seguido por un cultivo de las células transformadas para hiperexpresar la proteína diana, una purificación de las proteínas obtenidas y, opcionalmente, un corte por escisión de las secuencias marcadoras empleadas para la expresión o la purificación de la proteína.

Se describen técnicas adecuadas de expresión y purificación, por ejemplo, en la monografía de Goeddel, Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), y A. Staron et al., Advances Mikrobiol., 2008, 47, 2, 1983-1995.

Los cósmidos, plásmidos o virus modificados se pueden utilizar como vectores de expresión para la introducción y la replicación de secuencias de ADN en las células hospedadoras. Típicamente, los plásmidos se utilizan como vectores de expresión. Los plásmidos adecuados son bien conocidos y están disponibles comercialmente.

El vector de expresión de la invención comprende una molécula de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y la traducción de la secuencia codificadora, incorporada en una célula hospedadora adecuada. La selección de las secuencias reguladoras es dependiente del tipo de células hospedadoras y una persona experta en la técnica lo puede llevar a cabo fácilmente. Ejemplos de tales secuencias reguladoras son un promotor y potenciador de la transcripción o una secuencia que se une a la polimerasa de ARN, una secuencia que se une al ribosoma que contiene la señal de iniciación de la transcripción, insertada antes de la secuencia codificadora, y una secuencia terminadora de la transcripción, insertada después de la secuencia codificadora. Por otra parte, dependiendo de la célula hospedadora y del vector utilizado, se pueden introducir otras secuencias en el vector de expresión, tal como el origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que permiten la inducción de la transcripción.

El vector de expresión también comprenderá una secuencia de gen marcador que confiere un fenotipo definido a la célula transformada y permite la selección específica de las células transformadas. Además, el vector puede contener también una segunda secuencia marcadora que permite distinguir las células transformadas con el plásmido recombinante que contiene la secuencia codificadora insertada de la proteína diana, de las que han incluido el plásmido sin inserto. Muy frecuentemente, se utilizan marcadores típicos de resistencia a antibióticos, sin embargo, se pueden utilizar otros genes informadores conocidos en el campo, cuya presencia en una célula (*in vivo*) se puede determinar fácilmente utilizando técnicas de autorradiografía, espectrofotometría o bioluminiscencia y químioluminiscencia. Por ejemplo, dependiendo de la célula hospedadora, se pueden utilizar genes informadores tales como β-galactosidasa, β-glucuronidasa, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa o proteína fluorescente verde.

Además, el vector de expresión puede contener una secuencia señal, que transporta las proteínas al compartimento celular apropiado, por ejemplo, el periplasma, en donde se facilita el plegamiento. Además, una secuencia que codifica un marcador/etiqueta, tal como HisTag fijada al extremo N-terminal o GST fijada al extremo C-terminal, puede estar presente, lo que facilita la posterior purificación de la proteína producida usando el principio de afinidad, a través de cromatografía de afinidad en una columna de níquel. También pueden estar presentes secuencias adicionales que protegen a la proteína frente a una degradación proteolítica en las células hospedadoras, así como secuencias que aumentan su solubilidad.

Un elemento auxiliar fijado a la secuencia de la proteína diana puede bloquear su actividad, o ser perjudicial por otra razón, como por ejemplo debido a la toxicidad. Un elemento de este tipo debe ser eliminado, lo que se puede lograr mediante escisión enzimática o química. En particular, un marcador HisTag de seis histidinas u otros marcadores de este tipo fijados, para permitir la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad, se deben eliminar debido a su efecto descrito en la toxicidad hepática de la proteína TRAIL soluble. Los sistemas de expresión heterólogos basados en diversas células hospedadoras conocidas se pueden utilizar, incluyendo las células procariotas: bacterianas, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* y líneas de células eucariotas (insectos, mamíferos, plantas).

Preferiblemente, debido a la facilidad del cultivo y de la manipulación genética, y a la elevada cantidad de producto obtenido, se utiliza el sistema de expresión de *E. coli.* Por consiguiente, la secuencia de polinucleótidos que contiene la secuencia diana que codifica la proteína de fusión de la invención, será optimizada para la expresión en *E. coli*, es decir, contendrá en la secuencia codificadora los codones óptimos para la expresión en *E. coli*, seleccionados a partir de las posibles variantes de la secuencia, conocidas en el estado de la técnica. Además, el vector de expresión contendrá los elementos descritos anteriormente, adecuados para *E. coli*, fijados a la secuencia codificadora.

Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia que codifica una proteína de fusión de la invención, optimizada para la expresión en *E. coli*, se selecciona a partir del grupo de secuencias de polinucleótidos que consiste en:

SEQ. Nº 40; SEQ. Nº 41, SEQ. Nº 42, SEQ. Nº 43 y SEQ. Nº 48

que codifican una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde a las secuencias de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos, respectivamente:

SEQ. Nº 12; SEQ. Nº 13; SEQ. Nº 14 y SEQ. Nº 15 y SEQ. Nº 44.

En una realización preferida, la invención proporciona también un vector de expresión adecuado para la transformación de *E. coli*, que comprende la secuencia de polinucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias de polinucleótidos SEQ. Nº 40 a SEQ. Nº 43 y SEQ. Nº 48 indicadas anteriormente, así como una célula de *E. coli* transformada con un vector de expresión.

La transformación, es decir, la introducción de una secuencia de ADN en células hospedadoras bacterianas, en particular *E. coli,* se realiza generalmente en células competentes, preparadas para introducir el ADN, por ejemplo, mediante tratamiento con iones de calcio a baja temperatura (4°C) y, a continuación, sometiendo a choque térmico (a 37-42°C) o por electroporación. Tales técnicas son bien conocidas y están determinadas generalmente por el fabricante del sistema de expresión o se describen en la bibliografía y en manuales para el trabajo de laboratorio, tales como Maniatis et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.

El procedimiento de hiperexpresión de proteínas de fusión de la invención en el sistema de expresión de *E. coli* se describirá adicionalmente a continuación.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene la proteína de fusión de la invención como se ha definido anteriormente en forma de un ingrediente activo y un vehículo, un diluyente y componentes auxiliares convencionales, adecuados, farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica contendrá una cantidad eficaz de la proteína de fusión de la invención y componentes auxiliares farmacéuticamente aceptables disueltos o dispersados en un vehículo o diluyente, y preferiblemente estará en forma de una composición farmacéutica formulada en una forma de dosificación unitaria o una formulación que contiene una pluralidad de dosis. Las formas farmacéuticas y los métodos de formulación, así como otros componentes, vehículos y diluyentes son conocidos por el experto en la materia y se describen en la bibliografía. Por ejemplo, se describen en la monografía Remington's Pharmaceutical Sciences, ed. 20, 2000, Mack Publishing Company, Easton, EE.UU.

Las expresiones "vehículo, diluyente e ingrediente auxiliar farmacéuticamente aceptables" comprenden cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, agentes tensioactivos, antioxidantes, estabilizantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes de isotonicidad, conocidos en la técnica. La composición farmacéutica de la invención puede contener diversos tipos de vehículos, diluyentes y excipientes, dependiendo de la ruta de administración seleccionada y de la forma de dosificación deseada, tal como formas líquidas, sólidas y aerosoles para la administración oral, parenteral, por inhalación, tópica, y si esa forma seleccionada debe ser estéril para la vía de administración, tal como por inyección. La ruta de administración preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, es la parenteral, incluyendo las vías de inyección tales como intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratumoral, o mediante infusiones intravenosas únicas o continuas.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar mediante una inyección directamente en el tumor. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía intravenosa. En aún otra realización, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Una composición farmacéutica para administración parenteral puede ser una solución o una dispersión en un medio acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable, tamponada a un pH apropiado e isoosmótica con los fluidos corporales, si es necesario, y también puede contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y sustancias solubles que hacen que la composición sea compatible con los tejidos o la sangre del receptor. Otros componentes que se pueden incluir en la composición son, por ejemplo, agua, alcoholes tales como etanol, polioles tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, lípidos tales como triglicéridos, aceites vegetales, liposomas. Una fluidez y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia se pueden proporcionar mediante sustancias de recubrimiento, tales como lecitina, y tensioactivos, tales como polisorbatos de hidroxipropilcelulosa y similares.

Agentes de isotonicidad adecuados para las composiciones parenterales líquidas son, por ejemplo, azúcares tales como glucosa, y cloruro de sodio y combinaciones de los mismos.

Alternativamente, la composición farmacéutica para administrar mediante inyección o infusión puede estar en forma de polvo, tal como un polvo liofilizado para reconstituir inmediatamente antes del uso en un vehículo adecuado tal como, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos.

La composición farmacéutica de la invención para administración parenteral también puede estar en forma de administración nasal, incluyendo soluciones, pulverizaciones o aerosoles. Preferiblemente, la forma para administración intranasal será una solución acuosa y será isotónica o estará tamponada o mantendrá el pH desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, a fin de conservar un carácter similar a las secreciones nasales. Además, contendrá agentes conservantes o estabilizantes, tal como en las preparaciones intranasales que son bien conocidas.

La composición puede contener diversos antioxidantes que retrasan la oxidación de uno o varios componentes.

Además, con el fin de evitar la acción de microorganismos, la composición puede contener diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, por ejemplo, y no limitados a, parabenos, clorobutanol, timerosal, ácido sórbico y sustancias similares conocidas de este tipo. En general, la composición farmacéutica de la invención puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,01% en peso de ingrediente activo. Más particularmente, la composición puede contener el ingrediente activo en una cantidad de 1% a 75% en peso de la unidad de la composición, o por ejemplo de 25% a 60% en peso, pero no se limita a los valores indicados. La cantidad real de la dosis de la composición de acuerdo con la presente invención administrada a pacientes, incluyendo el hombre, será determinada por factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, la gravedad del estado, el tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas anteriores o concomitantes, el paciente y la vía de administración. Una dosis unitaria adecuada, la dosis total y la concentración de ingrediente activo en la composición serán determinadas por el médico encargado.

La composición se puede administrar, por ejemplo, en una dosis desde aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del paciente, por ejemplo, en el intervalo de 5 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 5 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal. La proteína de fusión y las composiciones que la contienen presentan propiedades anticancerígenas o antitumorales y se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades cancerígenas. La invención también proporciona el uso de la proteína de fusión de la invención tal y como se ha definido anteriormente, para el tratamiento de enfermedades cancerígenas en mamíferos, incluyendo seres humanos. La invención también proporciona un método para tratar enfermedades cancerígenas en mamíferos, incluyendo seres humanos, que comprende administrar a un sujeto que requiere tal tratamiento, una cantidad eficaz anticancerígena de la proteína de fusión de la invención tal como se ha definido anteriormente, opcionalmente en forma de composición farmacéutica apropiada.

La proteína de fusión de la invención se puede utilizar para el tratamiento de neoplasias hematológicas, tales como leucemia, granulomatosis, mieloma y otras neoplasias hematológicas. La proteína de fusión también se puede utilizar para el tratamiento de tumores sólidos, como el cáncer de mama, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de cerebro y similares. Una vía de administración apropiada de la proteína de fusión en el tratamiento del cáncer será, en particular, la vía parenteral, que consiste en la administración de la proteína de fusión de la invención en forma de inyecciones o infusiones, con la composición y forma apropiadas para esta vía de administración. La invención se describirá con más detalle en los siguientes procedimientos generales y ejemplos de proteínas de fusión específicas.

Procedimiento general para la hiperexpresión de la proteína de fusión

Preparación del plásmido

Una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión diana se utilizó como molde para generar una secuencia de ADN que la codificaba, que comprendía codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*. Tal procedimiento permite aumentar la eficacia de una etapa adicional de la síntesis de proteína diana en *Escherichia coli*. La secuencia de nucleótidos resultante se sintetizó después de forma automática. Además, los sitios de corte de las enzimas de restricción NdeI (en el extremo 5' de la cadena líder) y XhoI (en el extremo 3' de la cadena líder) se añadieron al gen resultante que codificaba la proteína diana. Estos se utilizaron para clonar el gen en el vector pET28a (Novagen). También se pueden utilizar para clonar el gen que codifica la proteína en otros vectores. La proteína diana expresada a partir de esta estructura artificial estaba equipada en el extremo N-terminal con un marcador de polihistidina (seis histidinas), precedido por un sitio reconocido por la trombina, que posteriormente sirvió para su purificación a través de cromatografía de afinidad. La exactitud de la estructura artificial resultante se confirmó en primer lugar mediante análisis de restricción de plásmidos aislados, utilizando las enzimas NdeI y XhoI, seguido por una secuenciación automática del marco de lectura completo de la proteína diana. Los cebadores utilizados para la secuenciación eran complementarios a las secuencias del promotor T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGG-3') y el terminador T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') presentes en el vector. El plásmido resultante se utilizó para la hiperexpresión de la proteína de fusión diana en una cepa comercial de *E. coli*, que se transformó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las colonias obtenidas en el medio de selección (agar LB, 50 µg/ml de kanamicina, 1% de glucosa) se utilizaron para la preparación de un cultivo de una noche en medio LB líquido complementado con kanamicina (50 µg/ml) y 1% de glucosa. Después de aproximadamente 15 h de crecimiento en una incubadora con agitación, se utilizaron los cultivos para inocular el cultivo apropiado.

Hiperexpresión y purificación de proteínas de fusión - procedimiento general A

Se inoculó medio LB con kanamicina (30 µg/ml) y sulfato de zinc 100 µM, cultivando durante la noche. El cultivo se incubó a 37°C hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm alcanzó 0,60-0,80. A continuación, se añadió IPTG hasta tener la concentración final en el intervalo de 0,25-1 mM. Después de la incubación (3,5 - 20 h) con agitación a 25°C, el cultivo se centrifugó durante 25 min a 6000 g. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en un tampón que contenía KH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, pH 7,4. La suspensión se sometió a ultrasonidos sobre hielo durante 8 minutos (40% de amplitud, impulsos de 15 segundos, intervalo de 10 s). El extracto resultante se clarificó mediante centrifugación durante 40 minutos a 20000 g, 4°C. Una resina de Ni-Sefarosa (GE Healthcare) se trató previamente mediante equilibrado con tampón, que se utilizó para la preparación del extracto de las células bacte-

rianas. Después, la resina se incubó durante una noche a 4°C con el material sobrenadante obtenido después de la centrifugación del extracto. A continuación, se cargó en una columna de cromatografía y se lavó con 15 a 50 volúmenes de tampón $KH_2PO_4$50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4. La proteína obtenida se eluyó de la columna usando un gradiente de imidazol en tampón KH_2PO_4 50 mM con NaCl 0,5 M, pH 7,4. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones apropiadas se combinaron y se dializaron durante una noche a 4°C frente a tampón Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, L-arginina 500 mM, $ZnSO_4$ 0,1 mM, 0,01% de Tween 20, y al mismo tiempo Histag 10 se escindió con trombina (1:50). Después de la escisión, la trombina se separó de la proteína de fusión diana usando una resina de benzamidina Sepharose®. La pureza del producto se analizó por electroforesis en SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982).

Hiperexpresión y purificación de proteínas de fusión - procedimiento general B

Se inoculó medio LB con kanamicina (30 µg/ml) y sulfato de zinc 100 µM cultivando durante una noche. Los cultivos se incubaron a 37°C hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm alcanzó 0,60-0,80. A continuación, se añadió IPTG hasta tener la concentración final en el intervalo de 0,5 -1 mM. Después de incubar durante 20 h con agitación a 25°C, el cultivo se centrifugó durante 25 min a 6000 g. Las células bacterianas después de la hiperexpresión se rompieron en una prensa francesa en un tampón que contenía KH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pH 7,8. El extracto resultante se clarificó mediante centrifugación durante 50 minutos a 8000 g. El material sobrenadante obtenido se incubó durante una noche con resina de Ni-Sefarosa. A continuación, la resina con proteína unida se empaquetó en la columna de cromatografía. Para eliminar por lavado las fracciones que contenían proteínas no unidas, la columna se lavó con 15 a 50 volúmenes de tampón KH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pH 7,8. Después, para eliminar por lavado la mayoría de las proteínas que se unían específicamente con el lecho, la columna se lavó con un tampón que contenía KH_2PO_4 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, 10% de glicerol, PMSF 0,5 mM, pH 7,5. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (Maniatis et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982). Las fracciones que contenían la proteína diana se combinaron y se escindieron con trombina (1 U por 4 mg de proteína, 8 h a 16°C) para eliminar el marcador polihistidina. A continuación, las fracciones se dializaron frente a tampón de formulación (L-arginina 500 mM, Tris 50 mM, $ZnSO_4$ 2,5 mM, pH 7,4).

Ejemplo 12. La proteína de fusión de SEQ. Nº 12

La proteína de SEQ. Nº 12 es una proteína de fusión que tiene una longitud de 449 aminoácidos y una masa de 51,8 kDa, en la que en el extremo N-terminal de la secuencia TRAIL116-281, un seudodímero de cadena sencilla de interferón gamma humano (SEQ. Nº 19), se fija como péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL, la proteína contiene secuencias de sitios de escisión de proteasas reconocidos por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20) y la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), debido a lo cual, el péptido efector se someterá a una escisión en el entorno del tumor después de la internalización de la proteína de fusión.

La proteína comprende también enlazadores flexibles: el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre la secuencia del péptido efector y el sitio de escisión de la metaloproteasa MMP; y el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre el sitio de escisión de la urocinasa uPa y la secuencia de TRAIL.

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3 y su secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN codificante que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. Nº 12 y SEQ. Nº 40 como se muestra en la Lista de Secuencias adjunta.

La secuencia de aminoácidos SEQ. Nº 12 de la estructura descrita anteriormente se utilizó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. Nº 40. Un plásmido que contenía la secuencia de ADN codificante se generó y la hiperexpresión de la proteína de fusión se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente. La hiperexpresión se realizó de acuerdo con el procedimiento general A, utilizando las cepas de *E. coli BL21* (*DE3*) y *E. coli Tuner(DE3)pLysS* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 13. La proteína de fusión de SEQ. Nº 13

La proteína de SEQ. Nº 13 es una proteína de fusión que tiene una longitud de 449 aminoácidos y una masa de 51,8 kDa, en la que en el extremo C-terminal de la secuencia TRAIL116-281, un seudodímero de cadena sencilla de interferón gamma humano (SEQ. Nº 19), se fija como péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL, se incorporan secuencialmente secuencias de sitios de escisión de proteasas reconocidos por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20) y la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), debido a lo cual, el péptido efector se someterá a una escisión en el entorno del tumor después de la internalización de la proteína de fusión.

La proteína comprende también enlazadores flexibles: el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre la secuencia del péptido efector y el sitio de escisión de la urocinasa uPa; y el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre el sitio de escisión de la metaloproteasa MMP y la secuencia de TRAIL.

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3 y su secuencia de aminoácidos y la

secuencia de ADN codificante que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. Nº 13 y SEQ. Nº 41 como se muestra en la Lista de Secuencias adjunta.

La secuencia de aminoácidos SEQ. Nº 13 presentada anteriormente se utilizó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. Nº 41 presentada anteriormente. Un plásmido que contenía la secuencia de ADN codificante se generó y la hiperexpresión de la proteína de fusión se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente. La hiperexpresión se realizó de acuerdo con el procedimiento general B, usando la cepa de *E. coli B.21 (DE3)* de Novagen y la cepa de *E. coli L21DE3pLysSRIL* de Stratagene. La proteína se separó por electroforesis de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 14. La proteína de fusión de SEQ. Nº 14

La proteína de SEQ. Nº 14 es una proteína de fusión que tiene una longitud de 456 aminoácidos y una masa de 52,4 kDa, en la que en el extremo N-terminal de la secuencia TRAIL116-281, un seudodímero de cadena sencilla de interferón gamma humano (SEQ. Nº 19), se fija como péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL, se incorporan secuencias de sitios de escisión de proteasas reconocidos por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20) y la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), debido a lo cual, el péptido efector se someterá a una escisión en el entorno del tumor después de la internalización de la proteína de fusión. Entre las secuencias SEQ. Nº 20 y SEQ. Nº 21, la proteína de fusión contiene adicionalmente un enlazador para la pegilación (SEQ. Nº 22).

La proteína comprende también enlazadores flexibles: el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre la secuencia del péptido efector y el sitio de escisión de la urocinasa uPa; y el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre el sitio de escisión de la metaloproteasa MMP y la secuencia de TRAIL.

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3 y su secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN codificante que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. Nº 14 y SEQ. Nº 42 como se muestra en la Lista de Secuencias adjunta.

La secuencia de aminoácidos SEQ. Nº 14 presentada anteriormente se utilizó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. Nº 42 presentada anteriormente. Un plásmido que contenía la secuencia de ADN codificante se generó y la hiperexpresión de la proteína de fusión se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente. La hiperexpresión se realizó de acuerdo con el procedimiento general B, utilizando las cepas de *E. coli BL21* (*DE3*) de Novagen y la cepa de *E. coli BL21DE3pLysSRIL* de Stratagene. La proteína se separó por electroforesis de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 15. La proteína de fusión de SEQ. Nº 15

La proteína de SEQ. Nº 15 es una proteína de fusión que tiene una longitud de 456 aminoácidos y una masa de 52,4 kDa, en la que en el extremo C-terminal de la secuencia TRAIL116-281, un seudodímero de cadena sencilla de interferón gamma humano (SEQ. Nº 19), se fija como péptido efector. Entre la secuencia de TRAIL y el péptido efector, la proteína de fusión contiene secuencias de sitios de escisión de proteasas reconocidos por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20) y la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), debido a lo cual, el péptido efector se someterá a una escisión en el entorno del tumor después de la internalización de la proteína de fusión. Entre las secuencias SEQ Nº 20 y SEQ Nº 21 la proteína de fusión contiene adicionalmente el enlazador para pegilación (SEQ. Nº 22).

La proteína comprende también enlazadores flexibles: el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre la secuencia del péptido efector y el sitio de escisión de la urocinasa uPa; y el enlazador flexible de glicina-serina GSGGG (SEQ. Nº 26) entre secuencia de TRAIL y el sitio de escisión de la metaloproteasa MMP.

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3 y su secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN codificante que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. Nº 15 y SEQ. Nº 43 como se muestra en la Lista de Secuencias adjunta.

La secuencia de aminoácidos SEQ. Nº 15 presentada anteriormente se utilizó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. Nº 43 presentada anteriormente. Un plásmido que contenía la secuencia de ADN codificante se generó y la hiperexpresión de la proteína de fusión se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente. La hiperexpresión se realizó de acuerdo con el procedimiento general B, utilizando la cepa de *E. coli B.21* (*DE3*) de Novagen y la cepa de *E. coli BL21DE3pLysSRIL* de Stratagene. La proteína se separó por electroforesis de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 16. La proteína de fusión de SEQ. Nº 44

La proteína de SEQ. Nº 44 es una proteína de fusión que tiene una longitud de 538 aminoácidos y una masa de 62,4 kDa, en la que en el extremo N-terminal de la secuencia TRAIL122-281, un seudodímero de cadena sencilla de interferón alfa 2b humano (SEQ. Nº 46) se fija como péptido efector. Entre la secuencia del péptido efector y la secuencia de TRAIL se incorporan dos combinaciones de secuencias de sitios de escisión de proteasas reconocidos por la metaloproteasa MMP (SEQ. Nº 20) y la urocinasa uPA (SEQ. Nº 21), debido a las cuales el péptido efector se someterá a una escisión en el entorno del tumor después de la internalización de la proteína de fusión. Entre las dos

combinaciones de secuencias SEQ. Nº 20 y SEQ. Nº 21, la proteína de fusión contiene adicionalmente un enlazador para la pegilación (SEQ. Nº 22).

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 4 y su secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN codificante que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. Nº 44 y SEQ. Nº 48 como se muestra en la Lista de Secuencias adjunta.

La secuencia de aminoácidos SEQ. Nº 44 presentada anteriormente se utiliza como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. Nº 48 presentada anteriormente. Un plásmido que contiene la secuencia de ADN codificante se puede generar y la hiperexpresión de la proteína de fusión se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos generales descritos anteriormente. La hiperexpresión se puede realizar de acuerdo con el procedimiento general B, usando la cepa de *E. coli B.21 (DE3)* de Novagen y la cepa de *E. coli* L21 *DE3pLysSRIL* de Stratagene. La proteína se puede separar por electroforesis de acuerdo con el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 18. Examen de la actividad antitumoral de las proteínas de fusión

El examen de la actividad antitumoral de las proteínas de fusión se llevó a cabo *in vitro* en un ensayo de citotoxicidad sobre líneas de células tumorales e *in vivo* en ratones. Para fines comparativos, se utilizaron la proteína rhTRAIL114-281 y placebo.

1. Medición del dicroísmo circular

La calidad de las preparaciones de las proteínas de fusión en términos de su estructura se determinó mediante dicroísmo circular (DC) para los Ej. 12 y Ej. 14.

El dicroísmo circular se utiliza para la determinación de estructuras secundarias y la conformación de una proteína. El método de DC utiliza la actividad óptica de las estructuras de las proteínas, que se manifiesta en la rotación del plano de polarización de la luz y la aparición de polarización elíptica. El espectro de DC de las proteínas en el ultravioleta lejano (UV) proporciona datos precisos sobre la conformación de la cadena polipeptídica principal.

Las muestras de la proteína que se iban a analizar después de la formulación en un tampón que consistía en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 10% de glicerol, $ZnCl_2$0,1 mM, sacarosa 80 mM, DTT 5 mM, se dializaron en la bolsas de diálisis (Sigma-Aldrich) con un punto de corte de 12 kDa. La diálisis se realizó frente a 100 veces un exceso (v/v) de tampón, en comparación con las preparaciones de proteína, con agitación durante varias horas a 4°C. Después de completar la diálisis, cada preparación se centrifugó (25000 rpm, 10 min, 4°C) y se recogieron los sobrenadantes correspondientes. La concentración de proteína en las muestras obtenidas de este modo, se determinó por el método de Bradford. La medición del dicroísmo circular para las proteínas en el intervalo de concentración de 0,1-2,7 mg/ml se realizó en un espectropolarímetro Jasco J-710, en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0,2 mm o 1 mm. La medición se realizó bajo el flujo de nitrógeno a 7 l/min, lo que permitió realizar la medición en el intervalo de longitud de onda de 195 a 250 nm. Parámetros de la medición: resolución espectral de - 1 nm; medio ancho del haz de luz 1 nm; sensibilidad 20 mdeg, el tiempo promedio para una longitud de onda - 8 s, velocidad de exploración 10 nm/min. Los resultados se presentaron como el promedio de tres mediciones. Los espectros de dicroísmo circular para rhTRAIL114-281, rhTRAIL95-281 y proteínas de los Ej. 12 y Ej. 14 se presentan en la Fig. 5.

Los espectros obtenidos se analizaron numéricamente en el intervalo de 193-250 nm usando el programa informático CDPro. Los puntos para los cuales la tensión en el fotomultiplicador superaba los 700 V fueron omitidos, debido a una relación demasiado baja entre señal y ruido de fondo en este intervalo de longitud de onda.

Los datos obtenidos sirvieron para los cálculos de las estructuras secundarias particulares contenidas en las proteínas analizadas con el uso del programa informático CDPro (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de estructuras secundarias en las proteínas analizadas

Proteína	NRMSD (Exp-Cal)	Hélice α	Lámina β	Desplazamiento	Trastorno
Ej. 12	0,104	39,3%	17,3%	15,0%	28,4%
Ej. 14	0,01	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
hrTRAIL*		1,94%	50,97%	7,74%	39,35%
hrTRAIL114-281	0,389	4,9%	33,7%	23,1%	38,3%
hrTRAIL 95	0,074	0,0%	21,6%	16,0%	62,4%
* valor obtenido basándose en la estructura cristalina 1 D4V					

Los controles (rhTRAIL114-281 y rhTRAIL95-281) muestran un espectro de DC característico para las proteínas con estructuras predominantemente de tipo lámina β (elipticidad mínima, claramente definida con una longitud de onda de 220 nm). Esto confirma el cálculo de los componentes de la estructura secundaria, lo que sugiere un número

marginal de elementos de hélice α.

El resultado obtenido también es coherente con los datos de la estructura cristalina de la proteína TRAIL, en donde los elementos beta constituyen más de la mitad de su composición.

En el caso de las proteínas fusionadas del Ej. 12 y Ej. 14, los espectros de dicroísmo se caracterizan por dos mínimos en las longitudes de onda 208 y 220 nm, lo que es característico de proteínas con estructura secundaria mixta de tipo alfa/beta. Las moléculas de interferón fijadas a TRAIL en las proteínas fusionadas forman predominantemente estructuras alfa-helicoidales, por lo tanto, la naturaleza mixta de las estructuras secundarias en las proteínas quiméricas analizadas puede confirmar la presencia de elementos correctamente plegados de TRAIL y del interferón.

En el caso de una preparación de acuerdo con el Ej. 14, se encontró casi el 100% de estructuras de tipo alfa. Un contenido tal de estructuras de tipo alfa es debido al estrecho intervalo de longitud de onda utilizado en el análisis, que es una consecuencia de la selección de formulaciones óptimas para los métodos y materiales (cantidad elevada de ruido de fondo en el UV lejano). La ausencia de un intervalo claramente definido de 180-200 nm en la región analizada del espectro, puede causar que el contenido de las estructuras de hélice α se sobrestime.

2. Pruebas en líneas celulares *in vitro*

Líneas celulares

Tabla 2. Líneas celulares adherentes

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
Colo 205 ATCC nº CCL-222	*cáncer colorrectal humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
HT-29 ATCC nº CCL-2	*cáncer colorrectal humano*	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
DU-145 ATCC nº HTB-81	*cáncer de próstata humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3
PC-3 ATCC nº CRL-1435	*cáncer de próstata humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
MCF-7 ATCC nº HTB-22	*cáncer de mama humano*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4,5
MDA-MB-231 ATCC nº HTB-26	*cáncer de mama humano*	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4,5
UM-UC-3 ATCC nº CLR-1749	*cáncer de vejiga humano*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3,5
SW780 ATCC nº CRL-2169	*cáncer de vejiga humano*	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3
SW620 ATCC nº CCL-227	*cáncer colorrectal humano*	DMEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	5
BxPC-3 ATCC nº CRL-1687	*cáncer pancreático humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4,5
SK-OV-3 ATCC nº HTB-77	*cáncer de ovario humano*	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
NIH: OVCAR-3 ATCC nº HTB-161	*cáncer de ovario humano*	RPMI + 20% de FBS + 0,01 mg/ml de insulina + penicilina + estreptomicina	7
HepG2 ATCC nº HB-8065	*hepatoma de hígado humano*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	7
293 ATCC nº CLR-1573	*células hepáticas embrionarias humanas*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
ACHN ATCC nº CCL-222	*cáncer de riñón humano*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4
CAKI 2 ATCC nº HTB-47	*cáncer de riñón humano*	McCoy's + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	3,5
NCI- H69AR ATCC	*cáncer de pulmón humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estrep-	10

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
nº CRL-11351	*de células pequeñas*	tomicina	
HT144 ATCC nº HTB-63	*células de melanoma humanas*	McCoy's + 10% de FIBS + penicilina + estreptomicina	7
NCI-H460 ATCC nº HTB-177	*cáncer de pulmón humano*	MEM + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	2,5
LNCaP ATCC nº CRL-1740	*cáncer de próstata humano*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	4,5

Tabla 3. Células no adherentes:

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
NCI-H69 ATCC nº HTB-119	*cáncer de pulmón humano de células pequeñas*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	22
Jurkat A3 ATCC nº CRL-2570	*leucemia humana*	RPMI + 10% de FBS + penicilina + estreptomicina	10
HL60 ATCC nº CCL-240	*leucemia humana*	RPMI + 20% de FBS + penicilina + estreptomicina	10
CCRF-CEM ATCC nº CCL-119	*leucemia humana*	RPMI + 20% de FBS + penicilina + estreptomicina	10

Prueba de citotoxicidad MTT

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico utilizado para medir la proliferación, la viabilidad y la citotoxicidad de las células. Consiste en la descomposición de una sal de tetrazolio amarilla MTT (bromuro de 4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) en el colorante formazán púrpura insoluble en agua mediante la enzima mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa 1. La reducción de MTT se produce solo en las células vivas. El análisis de los datos consiste en determinar la concentración de CI_{50} de la proteína (en ng/ml), a la que tiene lugar un 50% de la reducción del número de células en la población tratada, en comparación con las células control. Los resultados fueron analizados utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.0. La prueba se realizó de acuerdo con las descripciones de la bibliografía (Celis, JE, (1998). Cell Biology, a Laboratory Handbook, segunda edición, Academic Press, San Diego; Yang, Y., Koh, LW, Tsai, JH., (2004); Involvement of viral and chemical factors with oral cancer in Taiwan, Jpn J Clin Oncol, 34 (4), 176-183).

El medio de cultivo celular se diluyó hasta una densidad definida (10^4 - 10^5 células por 100 µl). A continuación, 100 µl de la suspensión celular apropiadamente diluida se aplicó a una placa de 96 pocillos por triplicado. Las células preparadas de este modo se incubaron durante 24 h a 37°C en 5% o 10% de CO_2, dependiendo del medio usado, y luego se añadió a las células (en 100 µl de medio) otros 100 µl del medio que contenía varias concentraciones de las proteínas sometidas a ensayo. Después de incubar las células con las proteínas de la prueba durante un período de 72 horas, que es equivalente a 3-4 veces la división celular, se añadió el medio con la proteína del ensayo con 20 ml de solución de trabajo de MTT [5 mg/ml], y se continuó la incubación durante 3 h a 37°C en 5% de CO_2. A continuación, se retiró el medio con solución de MTT, y los cristales de formazán se disolvieron mediante la adición de 100 µl de DMSO. Después de agitar, se midió la absorbancia a 570 nm (filtro de referencia 690 nm).

Prueba de citotoxicidad EZ4U

La prueba EZ4U (Biomedica) se utilizó para someter a ensayo la actividad citotóxica de las proteínas en líneas celulares no adherentes. La prueba es una modificación del MTT en donde el formazán formado en la reducción de la sal de tetrazolio es soluble en agua. El estudio de viabilidad celular se llevó a cabo después de una incubación continua de las células con proteína durante 72 horas (siete concentraciones de proteína, cada una por triplicado). Sobre esta base se determinaron los valores de CI_{50} (como un promedio de dos experimentos independientes) utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se resumen en la Tabla 4 y la Tabla 5, como valores de CI_{50} (ng/ml), que se corresponden a una concentración de proteína a la que se observa el efecto citotóxico de las proteínas de fusión a un nivel del 50%, con respecto a las células control tratadas únicamente con disolvente. Cada experimento representa el valor promedio de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. Como

criterio de falta de actividad de las preparaciones de proteína, se adoptó el límite CI_{50} de 2000 ng/ml. Las proteínas de fusión con un valor de CI_{50} superior a 2000, se consideraron inactivas.

Las células para este ensayo se seleccionaron de modo que incluían las líneas de células tumorales resistentes de forma natural a la proteína TRAIL (el criterio de resistencia natural a TRAIL:CI_{50} para la proteína TRAIL > 2000), las líneas de células tumorales sensibles a la proteína TRAIL y la línea resistente a doxorrubicina MES-SA/DX5 como una línea cancerígena resistente a medicamentos anticancerígenos convencionales.

La línea celular HUVEC indiferenciada se utilizó como una línea celular control sana para determinar el efecto/toxicidad de las proteínas de fusión en células no cancerígenas.

Los resultados obtenidos confirman la posibilidad de superar la resistencia de las líneas celulares a TRAIL mediante la administración de ciertas proteínas de fusión de la invención a células que son naturalmente resistentes a TRAIL. Cuando se administraron las proteínas de fusión de la invención a las células sensibles a TRAIL, en algunos casos se observó una potenciación clara y fuerte de la potencia de la acción, que se manifestaba en la reducción de los valores de CI_{50} de la proteína de fusión, en comparación con CI_{50} para el TRAIL solo. Además, se obtuvo una actividad citotóxica de la proteína de fusión de la invención en las células resistentes al medicamento anticancerígeno clásico doxorrubicina, y en algunos casos era más fuerte que la actividad de TRAIL solo.

Los valores de CI_{50} superiores a 2000 obtenidos para las líneas celulares no cancerígenas muestran la ausencia de efectos tóxicos asociados con el uso de proteínas de la invención para las células sanas, lo que indica una toxicidad sistémica de la proteína potencialmente baja.

Determinación de la actividad citotóxica de preparaciones de proteínas seleccionadas frente a un panel amplio de líneas de células tumorales

La Tabla 5 presenta los resultados de las pruebas de la actividad citotóxica *in vitro* para proteínas de fusión de la invención seleccionadas frente a un amplio panel de células tumorales de diferentes órganos, que se corresponden a una gran variedad de la mayoría de los cánceres comunes. Los valores de CI_{50} obtenidos confirman una actividad citotóxica elevada de las proteínas de fusión y por lo tanto su utilidad potencial en el tratamiento del cáncer.

Tabla 4. Actividad citotóxica de las proteínas de fusión de la invención

Proteína	**Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)**											
	MES-SA		**MES-SA/Dx5**		**HCT116**		**SK-MES-1**		**A549**		**MCF10A**	
	CI_{50}	**±SD**	**CI_{50}**	**±SD**	**CI_{50}**	**±SD**	**CI_{50}**	**±SD**	**CI_{50}**	**±SD**	**CI_{50}**	**±SD**
rhTRAIL95-281	>2000		32,2	2,40	173	31,3	12,2	2,33	>2000		>2000	
Ej. 12	1,33	0,54	2,73	2,23'	1,90	0,22	1,82	1,00	526	107,4	>2000	
Ej. 14	0,09	0,01	0,059	0,08	2,10	0,33	0,06	0,01	672,80	8,20	>2000	

Tabla 5. Análisis de la actividad citotóxica de preparaciones de proteínas seleccionadas frente a un amplio panel de líneas celulares tumorales

Línea celular	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
rhTRAIL95-281	24,9	17,68	10000		10000		10000		10000		10000		2052	466,0	10000	
Ej. 14	2,916	0,70	131,5	33,23	562,5	371,7	3901	2745,7	6,38	3,21	34,75	12,37	1378	377,60	1325	
Línea celular	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
rhTRAIL95-281	120	42,43	2242	1367	10000		10000		10000		93,1	8,34	10000		10000	
Ej. 14	0,766	1,04	3,154	0,21	10000	0,0	6594	3661,4	8172	2585,9	0,007	0,01	3889	864,79	10000	
Línea celular	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD	media	SD
rhTRAIL95-281	5889	111,0	64,71	31,81	10000		1734	218,5	10000		10000		10000		10000	
Ej. 14	0,547	0,25	0,137	0,11	10000	0,00	0,13	0,02	2,95	1,29	0,112	0,1	10000		10000	

2. Eficacia antitumoral de las proteínas de fusión *in vivo* sobre xenoinjertos

La actividad antitumoral de las preparaciones de proteínas se sometió a ensayo en un modelo en ratón de cáncer de colon humano HCT116

Células

Las células HCT116 se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) mezclado en una proporción de 1:1 con Opti-MEM ((Invitrogen, Cat. 22600-134) complementado con 10% de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM. El día que se realizó el injerto de los ratones, las células se separaron del soporte mediante lavado de las células con tripsina (Invitrogen), después las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4°C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio Hanks), se contaron y se diluyeron hasta una concentración de $25x10^6$ células/ml.

Las células PLC/PRF/5 (CLS) se mantuvieron en DMEM (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10% de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM. El día que se realizó el injerto de los ratones, las células se separaron del soporte mediante lavado de las células con tripsina (Invitrogen), después las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4°C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio Hanks), se contaron y se diluyeron hasta una concentración de 25 x 10^6 células/ml.

Las células HepG2 se mantuvieron en MEM (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10% de suero de ternera fetal y glutamina 2 mM. El día que se realizó el injerto de los ratones, las células se separaron del soporte mediante lavado de las células con tripsina (Invitrogen), después las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4°C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio Hanks), se contaron y se diluyeron hasta una concentración de 25 x 10^6 células/ml.

Ratones

El examen de la actividad antitumoral de las proteínas de la invención se llevó a cabo en ratones de 7-9 semanas de edad, CD- sin pelo (Crl:CD1-*Foxn1*^{nu} 1) o en ratones de 4-5 semanas de edad Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, obtenidos de Charles River Alemania. Los ratones se mantuvieron en condiciones específicas exentas de agentes patógenos, con acceso libre a comida y a agua desmineralizada (*ad libitum*). Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas: "Principios y directrices interdisciplinarias para el uso de animales en Investigación, Mercadotecnia y Educación", publicadas por la Academia de Ciencias de Nueva York de la Comisión ad hoc para la Investigación Animal y fueron aprobadas por el IV Comité Local de Ética sobre Experimentación Animal en Varsovia (n° 71/2009).

Curso y evaluación de los experimentos

Modelo de cáncer de colon humano

Ratones Crl:CD1-*Foxn1*^{nu} 1

El día 0, los ratones Crl:CD1-*Foxn1*^{nu} 1 fueron injertados por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5 x 10^6 células HCT116 suspendidas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de ~ 50-140 mm^3 (día 14), los ratones fueron aleatorizados para obtener un tamaño tumoral promedio en el grupo de ~ 70 mm^3 y se asignaron a grupos de tratamiento. A los grupos de tratamiento se les administraron las preparaciones de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 12 y Ej. 14 (10 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como una referencia comparativa y tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, 10% de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) diariamente durante diez días, los días 8-12 y 15-19. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño tumoral promedio de 1000 mm^3, los ratones fueron sacrificados mediante rotura de la médula espinal. El grupo control recibió rhTRAIL114-281.

Ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

El día 0 los ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} fueron injertados por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5 x 10^6 células HCT116 suspendidas en 0,1 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa, con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 200 a 700 mm^3 (día 18), los ratones fueron aleatorizados para obtener un tamaño tumoral promedio en el grupo de ~ 400 mm^3 y se asignaron a grupos de tratamiento. A los grupos de tratamiento se les administraron las preparaciones de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 14 (50 mg/kg), rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una referencia comparativa y tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, 10% de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces cada segundo día. El día 32º del experimento, los ratones fueron sacrificados por rotura de la médula espinal.

Modelo de cáncer de hígado humano

Células PLC/PRF/5

El día 0 ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} fueron injertados por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7 x 10^6 células PLC/PRF/5 suspendidas en 0,1 ml de mezcla de tampón HBSS:Matrigel (3:1) por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 140-300 mm^3 (día 31), los ratones fueron aleatorizados para obtener el tamaño tumoral promedio en el grupo de ~ 200 mm^3 y se asignaron a grupos de tratamiento. A los grupos de tratamiento se les administraron las preparaciones de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 14 (20 mg/kg), rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una referencia comparativa y tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, 10% de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 4 veces cada tercer día y posteriormente 2 veces cada segundo día (q3dx4 y q2dx2). El día 32º del experimento, los ratones fueron sacrificados por rotura de la médula espinal.

Células HepG2

El día 0 ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} fueron injertados por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7 x 10^6 células HepG2 en suspensión en 0,1 ml de tampón HBSS:Matrigel (3:1) por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 250-390 mm^3 (día 19), los ratones fueron aleatorizados para obtener un tamaño tumoral promedio en el grupo de ~ 330 mm^3 y se asignaron a grupos de tratamiento. A los grupos de tratamiento se les administraron las preparaciones de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 14 (50 mg/kg), rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una referencia comparativa y un tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, 10% de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces cada segundo día. El día 31º del experimento, los ratones fueron sacrificados por rotura de la médula espinal.

El tamaño del tumor se midió utilizando un calibrador electrónico, el volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula: (a^2 x b)/2, en donde a = diagonal más corta del tumor 25 (mm) y b = diagonal más larga del tumor (mm). La inhibición del crecimiento del tumor se calculó utilizando la fórmula:

TGI [%] (inhibición del crecimiento tumoral) = (WT/WC) x 100 - 100%

en donde WT se refiere al volumen promedio del tumor en el grupo de tratamiento, WC se refiere al volumen promedio del tumor en el grupo control.

Los resultados experimentales se presentan como un valor medio ± desviación estándar (SD). Todos los cálculos y los gráficos se prepararon usando el programa informático GraphPad Prism 5.0.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:CD1-*Foxn1^{nu}* afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 12 y Ej. 14 y comparativamente con rhTRAIL114-281, se muestran en la Fig. 6 como un diagrama de los cambios del volumen tumoral y en la Figura 7 que muestra la inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) como el porcentaje de control.

Los resultados de los experimentos presentados en los gráficos de las Figuras 6 y 7 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 12 y Ej. 14 causó la inhibición del crecimiento tumoral de HCT116, con una TGI respectivamente de 71%, 67% y 75% con respecto al control el día 28 del experimento. Para rhTRAIL114-281 utilizado como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de las células tumorales en relación con el control, con una TGI a nivel del 44%. Por tanto, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte que en comparación con TRAIL solo.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon HCT116, tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 (20 mg/kg) y comparativamente con rhTRAIL114-281, se muestran en la Fig. 8 como un diagrama de los cambios del volumen del tumor y en la Figura 9 que muestra una inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) como el porcentaje de control.

Los resultados de los experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 8 y 9 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 causó la inhibición del crecimiento tumoral de HCT116, con una TGI del 22,5%, en relación con el control el día 32º del experimento. Para rhTRAIL114-281 utilizado como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de las células tumorales, en relación con el control, con una TGI a nivel del 5,6%. Por tanto, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte que en comparación con TRAIL.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 y comparativamente con rhTRAIL114-281, se muestran en la Fig. 10 como un diagrama de los cambios del volumen del tumor y en la Figura 11 que muestra una inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) como el porcentaje de control.

Los resultados de los experimentos presentados en los gráficos de las Figuras 10 y 11 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 causaba una inhibición del crecimiento tumoral de PLC/PRF/5, con una TGI del 34% con respecto al control el día 49º del experimento. Para rhTRAIL114-281 utilizado como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales, en rela-

ción con el control, con una TGI a nivel del 18%. Por tanto, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte que en comparación con TRAIL.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado HepG2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 y comparativamente con rhTRAIL114-281, se muestran en la Fig. 12 como un diagrama de los cambios del volumen del tumor y en la Figura 13 que muestra una inhibición del crecimiento del tumor (% de TGI) como el porcentaje de control.

Los resultados de los experimentos presentados en los gráficos de las Figuras 12 y 13 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 14 causaba una inhibición del crecimiento tumoral de HepG2, con una TGI del 33,6% con respecto al control el día 31º del experimento. Para rhTRAIL114-281 utilizado como preparación de referencia, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales en relación con el control, con una TGI a nivel del 7%. Por tanto, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL.

Las proteínas de fusión sometidas a ensayo no causaron efectos secundarios significativos, manifestados por una disminución del peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10% del peso corporal inicial). Esto muestra una toxicidad sistémica baja de la proteína.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Adamed Sp. z o.o.

<120> Proteína de fusión anticancerígena

<130> P072 02 PL

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 12
< 211> 449
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 12

```
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1               5                  10                  15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
            20                  25                  30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
        35                  40                  45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
    50                  55                  60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65                  70                  75                  80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
                85                  90                  95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile Asp Glu
            100                 105                 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Phe Ser Thr Glu Glu Gln Gln Glu Gly
        115                 120                 125

Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly
    130                 135                 140

His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys
145                 150                 155                 160

Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val
```

```
                165                 170                 175

Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile
            180                 185                 190

Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe
        195                 200                 205

Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr
    210                 215                 220

Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile
225                 230                 235                 240

Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys
                245                 250                 255

Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Ser Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu
            260                 265                 270

Ala Gly Arg Val Val Arg Gly Ser Gly Gly Gly Glu Arg Gly Pro Gln
        275                 280                 285

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu
    290                 295                 300

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn
305                 310                 315                 320

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His
                325                 330                 335

Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile
            340                 345                 350

Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr
    370                 375                 380

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser
385                 390                 395                 400

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe
                405                 410                 415

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His
            420                 425                 430

Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val
        435                 440                 445

Gly
```

<210> 13
< 211> 449
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 13

```
Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly
1               5                  10                  15

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu
            20                  25                  30

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
        35                  40                  45

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
    50                  55                  60

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
65                  70                  75                  80

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr
                85                  90                  95

Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
            100                 105                 110

Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr
        115                 120                 125

Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser
    130                 135                 140

Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe
145                 150                 155                 160

Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala
```

```
                165                 170                 175

Gly Arg Val Val Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gln Asp Pro Tyr Val Lys
            180                 185                 190

Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val
        195                 200                 205

Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu
    210                 215                 220

Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe
225                 230                 235                 240

Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val
                245                 250                 255

Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys
            260                 265                 270

Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp
        275                 280                 285

Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile Asp Glu Leu Ile Gln Val Met Ala
    290                 295                 300

Glu Phe Ser Thr Glu Glu Gln Gln Glu Gly Pro Tyr Val Lys Glu Ala
305                 310                 315                 320

Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp
                325                 330                 335

Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser
            340                 345                 350

Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu
        355                 360                 365

Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr
    370                 375                 380

Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys
385                 390                 395                 400

Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn
                405                 410                 415

Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu
            420                 425                 430

Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe
        435                 440                 445

Arg
```

<210> 14
< 211> 456
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 14

```
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1               5                  10                  15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
            20                  25                  30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
        35                  40                  45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
    50                  55                  60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65                  70                  75                  80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
                85                  90                  95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile Asp Glu
            100                 105                 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Phe Ser Thr Glu Glu Gln Gln Glu Gly
        115                 120                 125

Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly
    130                 135                 140

His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys
145                 150                 155                 160

Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val
```

```
                165                 170                 175

Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile
            180                 185                 190

Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe
        195                 200                 205

Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr
    210                 215                 220

Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile
225                 230                 235                 240

Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys
                245                 250                 255

Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Ser Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu
            260                 265                 270

Ala Gly Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Arg Val Val Arg Gly Ser Gly
        275                 280                 285

Gly Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
    290                 295                 300

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
305                 310                 315                 320

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
                325                 330                 335

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
            340                 345                 350

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
        355                 360                 365

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
    370                 375                 380

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
385                 390                 395                 400

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
                405                 410                 415

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
            420                 425                 430

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
        435                 440                 445

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
    450                 455
```

<210> 15
< 211> 456
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 15

```
Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly
1               5                   10                  15

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu
            20                  25                  30

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
        35                  40                  45

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
    50                  55                  60

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
65                  70                  75                  80

Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr
                85                  90                  95

Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg
            100                 105                 110

Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr
        115                 120                 125

Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser
    130                 135                 140

Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe
145                 150                 155                 160

Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala
```

```
                165                 170                 175

Gly Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Arg Val Val Arg Gly Ser Gly Gly
            180                 185                 190

Gly Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe
        195                 200                 205

Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly
    210                 215                 220

Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser
225                 230                 235                 240

Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp
                245                 250                 255

Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
            260                 265                 270

Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu
        275                 280                 285

Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile Asp
    290                 295                 300

Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Phe Ser Thr Glu Glu Gln Gln Glu
305                 310                 315                 320

Gly Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala
                325                 330                 335

Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu
            340                 345                 350

Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile
        355                 360                 365

Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser
    370                 375                 380

Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe
385                 390                 395                 400

Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn
                405                 410                 415

Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu
            420                 425                 430

Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg
        435                 440                 445

Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
    450                 455
```

<210> 16
< 211> 281
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

<300>
< 308> GenBank/P50591
< 309> 1996-10-01

<313> (1)..(281)

<400> 16

```
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> 19
< 211> 263
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

<300>
< 308> PDB/1EKUA
< 309> 2008-09-24

<313> (2)..(264)

<400> 19

```
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1               5                   10                  15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
            20                  25                  30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
        35                  40                  45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
    50                  55                  60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65                  70                  75                  80
```

```
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
                85                  90                  95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile Asp Glu
            100                 105                 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Phe Ser Thr Glu Glu Gln Gln Glu Gly
        115                 120                 125

Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly
    130                 135                 140

His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys
145                 150                 155                 160

Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val
                165                 170                 175

Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile
            180                 185                 190

Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe
        195                 200                 205

Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr
    210                 215                 220

Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile
225                 230                 235                 240

Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys
                245                 250                 255

Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
            260
```

<210> 20
< 211> 6
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 20
```
Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1               5
```

<210> 21
< 211> 4
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 21
Arg Val Val Arg
1

<210> 22
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<300>
< 301> Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I.
< 302> Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity.
< 303> Proc Natl Acad Sci USA.
< 304> 97
< 305> 15
< 306> 8548-53
< 307> 2000-07-18
< 308> PMID/10890891
< 309> 2000-07-18

<400> 22
Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu
1 5

<210> 23
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 23
Ala Ala Cys Ala Ala
1 5

<210> 24
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 24
Ser Gly Gly Cys Gly Gly Ser
1 5

<210> 25
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 25
Ser Gly Cys Gly Ser
1 5

<210> 26
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 26
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 27
< 211> 4
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 27
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 28
< 211> 4
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<220>
< 221> misc_feature
< 222> (1) .. (1)
< 223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

<400> 28
Xaa Gly Gly Ser
1

<210> 39
< 211> 951
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 39

gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc 60

ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa gcactgggtc gtaaaattaa tagctgggaa 120

agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtt 180

attcatgaaa aaggttttta ttatatttat agccagacct attttcgttt tcaggaagaa 240

attaaagaaa ataccaaaaa tgataagcag atggttcagt acatttataa atataccagc 300

tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctgttggag caaagatgca 360

gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt ggtatttttg aactgaaaga aaatgatcgt 420

atttttgtta gcgttaccaa tgaacatctg attgatatgg atcatgaagc gagcttttt 480

ggtgcatttc tggttggtgg tagcggtggc ggtccgctgg gtctggcagg tgcgtctggc 540

tgcggtccgg aacgtgttgt tcgtggtagc ggaggcggtc aggatccgta tgttaaagaa 600

gcagaaaatc tgaaaaaata ttttaatgca ggtcatagcg atgttgcaga taatggtaca 660

ctgtttctgg gtattctgaa aaattggaaa gaagaaagcg atcgtaaaat catgcagagc 720

cagattgtga gcttctattt taaactgttc aaaaatttta aagatgatca gagcattcag 780

aaaagcgtgg aaaccatcaa agaagatatg aacgttaaat ttttcaatag caacaaaaaa 840

aaacgtgatg attttgaaaa actgaccaac tatagcgtga ccgatctgaa tgttcagcgt 900

aaagcaattc atgaactgat tcaggttatg gcagaactga gtccggcagc a 951

<210> 40
< 211> 1347
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 40

caggatccgt atgttaaaga agccgagaac ctgaaaaaat attttaatgc cggtcattcc 60

gatgttgcag ataatggcac cctgtttctg ggtattctga aaaattggaa agaggaaagc 120

gatcgcaaaa tcatgcagag ccagattgtg agcttctatt ttaaactgtt caaaaatttt 180

aaagatgatc agagcattca gaaaagcgtg gaaaccatca aagaagatat gaacgttaaa 240

tttttcaata gcaacaaaaa aaaacgtgat gattttgaaa aactgaccaa ctatagcgtg 300

accgatctga atgttcagcg taaagcaatt gatgaactga ttcaggtgat ggcagaattt 360

agcaccgaag aacagcaaga gggtccttat gtgaaagaag cagaaaatct gaaaaaatac 420

ttcaacgcag gtcatagcga cgttgccgat aacggtacac tgttcctggg catcctgaaa 480

aactggaaag aagaatcaga tcgtaaaatc atgcaatccc agatcgtgtc cttctacttc 540

aaactgttca aaaacttcaa agacgaccag tcaatccaga aatcagtgga aacgattaaa 600

gaagatatga acgtcaaatt cttcaattca aacaaaaaaa aacgcgacga cttcgagaaa 660

ctgacgaatt attcagttac cgatctgaac gtgcaacgca aagccatcca tgagctgatc 720

caggttatgg ccgaactgag tccggcagca aaaaccggta aacgtaaacg tagccagatg 780

ctgtttcgtg gtagcggtgg tggtccgctg ggtctggcag gtcgtgttgt tcgtggttca 840

ggtggtggtg aacgtggtcc gcagcgtgtt gcagcacata ttaccggcac ccgtggtcgt 900

agcaataccc tgagcagccc gaatagcaaa aatgaaaaag cactgggtcg caaaatcaat 960

agctgggaaa gcagccgtag cggtcatagc tttctgagca atctgcatct gcgtaatggt 1020

gaactggtga ttcatgaaaa aggcttttat tatatttata gccagaccta ttttcgcttt 1080

caagaagaga ttaaagaaaa taccaaaaat gataaacaaa tggtgcagta catttataaa 1140

tataccagct atccggaccc gattctgctg atgaaaagcg cacgtaatag ctgttggagc 1200

aaagatgcag aatatggtct gtatagcatt tatcagggtg gcatctttga gctgaaagaa 1260

aatgatcgca tctttgttag cgtgaccaac gaacatctga tcgatatgga tcatgaagcc 1320

agctttttg gtgcatttct ggtgggt 1347

<210> 41
< 211> 1350
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 41
gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc 60

ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa gcactgggtc gcaaaatcaa tagctgggaa 120

agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg 180

attcatgaaa aaggctttta ttatatttat agccagacct attttcgctt tcaagaagag 240

attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacaa atggtgcagt acatttataa atataccagc 300

tatccggacc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctgttggag caaagatgca 360

gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt ggcatctttg agctgaaaga aaatgatcgc 420

atctttgtta gcgtgaccaa cgaacatctg atcgatatgg atcatgaagc cagctttttt 480

ggtgcatttc tggtgggtgg tagcggtggt ggtccgctgg gtctggcagg tcgtgttgtt 540

cgtggttcag gtggtggtga acaggatccg tatgttaaag aagccgagaa cctgaaaaaa 600

tattttaatg ccggtcattc cgatgttgca gataatggca ccctgtttct gggtattctg 660

aaaaattgga aagaggaaag cgatcgcaaa atcatgcaga gccagattgt gagcttctat 720

tttaaactgt tcaaaaattt taaagatgat cagagcattc agaaaagcgt ggaaaccatc 780

aaagaagata tgaacgttaa atttttcaat agcaacaaaa aaaaacgtga tgattttgaa 840

aaactgacca actatagcgt gaccgatctg aatgttcagc gtaaagcaat tgatgaactg 900

attcaggtga tggcagaatt tagcaccgaa gaacagcaag agggtcctta tgtgaaagaa 960

gcagaaaatc tgaaaaaata cttcaacgca ggtcatagcg acgttgccga taacggtaca 1020

ctgttcctgg gcatcctgaa aaactggaaa gaagaatcag atcgtaaaat catgcaatcc 1080

cagatcgtgt ccttctactt caaactgttc aaaaacttca aagacgacca gtcaatccag 1140

aaatcagtgg aaacgattaa agaagatatg aacgtcaaat tcttcaattc aaacaaaaaa 1200

aaacgcgacg acttcgagaa actgacgaat tattcagtta ccgatctgaa cgtgcaacgc 1260

aaagccatcc atgagctgat ccaggttatg gccgaactga gtccggcagc aaaaaccggt 1320

aaacgtaaac gtagccagat gctgtttcgt 1350

<210> 42
< 211> 1368
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 42
caggatccgt atgttaaaga agccgagaac ctgaaaaaat attttaatgc cggtcattcc 60

gatgttgcag ataatggcac cctgtttctg ggtattctga aaaattggaa agaggaaagc 120

gatcgcaaaa tcatgcagag ccagattgtg agcttctatt ttaaactgtt caaaaatttt 180

aaagatgatc agagcattca gaaaagcgtg gaaaccatca aagaagatat gaacgttaaa 240

tttttcaata gcaacaaaaa aaaacgtgat gattttgaaa aactgaccaa ctatagcgtg 300

accgatctga atgttcagcg taaagcaatt gatgaactga ttcaggtgat ggcagaattt 360

agcaccgaag aacagcaaga gggtccttat gtgaaagaag cagaaaatct gaaaaaatac 420

ttcaacgcag gtcatagcga cgttgccgat aacggtacac tgttcctggg catcctgaaa 480

aactggaaag aagaatcaga tcgtaaaatc atgcaatccc agatcgtgtc cttctacttc 540

aaactgttca aaaacttcaa agacgaccag tcaatccaga aatcagtgga aacgattaaa 600

gaagatatga acgtcaaatt cttcaattca aacaaaaaaa aacgcgacga cttcgagaaa 660

ctgacgaatt attcagttac cgatctgaac gtgcaacgca aagccatcca tgagctgatc 720

caggttatgg ccgaactgag tccggcagca aaaaccggta aacgtaaacg tagccagatg 780

ctgtttcgtg gtagcggtgg tggtccgctg ggtctggcag gtgcgtctgg ctgcggtccg 840

gaacgtgttg ttcgtggttc aggtggtggt gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat 900

attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa 960

gcactgggtc gcaaaatcaa tagctgggaa agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc 1020

aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg attcatgaaa aaggctttta ttatatttat 1080

agccagacct attttcgctt tcaagaagag attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacaa 1140

atggtgcagt acatttataa atataccagc tatccggacc cgattctgct gatgaaaagc 1200

gcacgtaata gctgttggag caaagatgca gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt 1260

ggcatctttg agctgaaaga aaatgatcgc atctttgtta gcgtgaccaa cgaacatctg 1320

atcgatatgg atcatgaagc cagctttttt ggtgcatttc tggtgggt 1368

<210> 43
< 211> 1368
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> artificial

<400> 43
gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc 60

ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa gcactgggtc gcaaaatcaa tagctgggaa 120

agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg 180

attcatgaaa aaggctttta ttatatttat agccagacct attttcgctt tcaagaagag 240

attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacaa atggtgcagt acatttataa atataccagc 300

tatccggacc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctgttggag caaagatgca 360

gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt ggcatctttg agctgaaaga aaatgatcgc 420

atctttgtta gcgtgaccaa cgaacatctg atcgatatgg atcatgaagc cagctttttt 480

ggtgcatttc tggtgggtgg tagcggtggt ggtccgctgg gtctggcagg tgcgtctggc 540

tgcggtccgg aacgtgttgt tcgtggttca ggtggtggtc aggatccgta tgttaaagaa 600

gccgagaacc tgaaaaaata ttttaatgcc ggtcattccg atgttgcaga taatggcacc 660

ctgtttctgg gtattctgaa aaattggaaa gaggaaagcg atcgcaaaat catgcagagc 720

cagattgtga gcttctattt taaactgttc aaaaatttta aagatgatca gagcattcag 780

aaaagcgtgg aaaccatcaa agaagatatg aacgttaaat ttttcaatag caacaaaaaa 840

aaacgtgatg attttgaaaa actgaccaac tatagcgtga ccgatctgaa tgttcagcgt 900

aaagcaattg atgaactgat tcaggtgatg gcagaattta gcaccgaaga acagcaagag 960

ggtccttatg tgaaagaagc agaaaatctg aaaaaatact tcaacgcagg tcatagcgac 1020

gttgccgata acggtacact gttcctgggc atcctgaaaa actggaaaga agaatcagat 1080

cgtaaaatca tgcaatccca gatcgtgtcc ttctacttca aactgttcaa aaacttcaaa 1140

gacgaccagt caatccagaa atcagtggaa acgattaaag aagatatgaa cgtcaaattc 1200

ttcaattcaa acaaaaaaaa acgcgacgac ttcgagaaac tgacgaatta ttcagttacc 1260

gatctgaacg tgcaacgcaa agccatccat gagctgatcc aggttatggc cgaactgagt 1320

ccggcagcaa aaaccggtaa acgtaaacgt agccagatgc tgtttcgt 1368

<210> 44
< 211> 538
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> ninguno

<400> 44

```
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1               5                  10                  15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
            20                  25                  30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
        35                  40                  45

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
    50                  55                  60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
                85                  90                  95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
            100                 105                 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
        115                 120                 125
```

```
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
    130                 135                 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160

Leu Arg Ser Lys Glu Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Ala Gly
                165                 170                 175

Arg Val Val Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Lys Ser Arg Leu Ser
            180                 185                 190

Glu Gln Leu Asn Thr Ser Leu Ser Phe Ser Arg Met Ile Glu Ala Arg
        195                 200                 205

Val Val Glu Trp Ala Cys Pro Ser Tyr Lys Lys Glu Lys Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Thr Ile Arg Gln Phe Tyr Phe Arg Val Ala Leu Ile Ser Asp Glu Lys
225                 230                 235                 240

Met Leu Pro Thr Glu Thr Val Gly Val Gly Gln Ile Val Cys Ala Glu
                245                 250                 255

Leu Asp Asn Leu Gln Gln Tyr Leu Glu Thr Tyr Phe Lys Asp Leu Leu
            260                 265                 270

Thr Glu Asp Trp Ala Ala Ser Ser Asp Lys Thr Ser Phe Leu Asn Phe
        275                 280                 285

Ile Gln Gln Ile Met Glu His Leu Val Pro Ile Thr Glu Ala Lys Gln
    290                 295                 300

Phe Gln Asn Gly Phe Glu Glu Gln Pro Phe Gly Phe Asp His Arg Asp
305                 310                 315                 320

Lys Leu Cys Ser Phe Leu Ser Ile Arg Arg Met Gln Ala Leu Leu Met
                325                 330                 335

Leu Thr Arg Arg Ser Gly Leu Ser His Thr Gln Pro Leu Asp Cys Pro
            340                 345                 350

Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu
        355                 360                 365

Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Val Ala Ala His Ile Thr
    370                 375                 380
```

```
Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn
385                 390                 395                 400

Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser
                405                 410                 415

Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val
            420                 425                 430

Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg
        435                 440                 445

Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val
    450                 455                 460

Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met
465                 470                 475                 480

Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu
                485                 490                 495

Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg
            500                 505                 510

Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu
        515                 520                 525

Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
    530                 535
```

<210> 46
< 211> 351
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> ninguno

<400> 46

```
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1               5                   10                  15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
            20                  25                  30

Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
        35                  40                  45
```

```
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
    50                  55                  60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
                85                  90                  95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
            100                 105                 110

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
        115                 120                 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
    130                 135                 140

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160

Leu Arg Ser Lys Glu Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Ala Gly
                165                 170                 175

Arg Val Val Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Lys Ser Arg Leu Ser
            180                 185                 190

Glu Gln Leu Asn Thr Ser Leu Ser Phe Ser Arg Met Ile Glu Ala Arg
        195                 200                 205

Val Val Glu Trp Ala Cys Pro Ser Tyr Lys Lys Glu Lys Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Thr Ile Arg Gln Phe Tyr Phe Arg Val Ala Leu Ile Ser Asp Glu Lys
225                 230                 235                 240

Met Leu Pro Thr Glu Thr Val Gly Val Gly Gln Ile Val Cys Ala Glu
                245                 250                 255

Leu Asp Asn Leu Gln Gln Tyr Leu Glu Thr Tyr Phe Lys Asp Leu Leu
            260                 265                 270

Thr Glu Asp Trp Ala Ala Ser Ser Asp Lys Thr Ser Phe Leu Asn Phe
        275                 280                 285

Ile Gln Gln Ile Met Glu His Leu Val Pro Ile Thr Glu Ala Lys Gln
    290                 295                 300

Phe Gln Asn Gly Phe Glu Glu Gln Pro Phe Gly Phe Asp His Arg Asp
305                 310                 315                 320

Lys Leu Cys Ser Phe Leu Ser Ile Arg Arg Met Gln Ala Leu Leu Met
                325                 330                 335

Leu Thr Arg Arg Ser Gly Leu Ser His Thr Gln Pro Leu Asp Cys
            340                 345                 350
```

<210> 47
< 211> 166
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> ninguno

<210> 48
< 211> 1614
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> ninguno

<400> 48

tgtgatttac cacaaacaca ttcattagga tcaagaagaa cattaatgtt attagcacaa 60

atgagaagaa tatcattatt ttcatgttta aaggatagac atgattttgg atttccacaa 120

gaagaatttg gaaatcaatt tcaaaaggca gaaacaatac cagtgttaca tgaaatgata 180

caacaaatat ttaatttatt ttcaacaaag gattcatcag cagcatggga tgaaacatta 240

ttagataagt tttatacaga attatatcaa caattaaatg atttagaagc atgtgtgata 300

caaggagtgg gagtgacaga aacaccatta atgaaggaag attcaatatt agcagtgaga 360

aagtattttc aaagaataac attatattta aaggaaaaga agtattcacc atgtgcatgg 420

gaagtggtga gagcagaaat aatgagatca ttttcattat caacaaattt acaagaatca 480

ttaagatcaa aggaaggagg aggaggatca ccattaggat tagcaggaag agtggtgaga 540

tcaggaggag gaggatcaga aaagtcaaga ttatcagaac aattaaatac atcattatca 600

ttttcaagaa tgatagaagc aagagtggtg gaatgggcat gtccatcata taagaaggaa 660

aagttatatt taacaataag acaattttat tttagagtgg cattaatatc agatgaaaag 720

atgttaccaa cagaaacagt gggagtggga caaatagtgt gtgcagaatt agataattta 780

caacaatatt tagaaacata ttttaaggat ttattaacag aagattgggc agcatcatca 840

gataagacat cattttaaa ttttatacaa caaataatgg aacatttagt gccaataaca 900

gaagcaaagc aatttcaaaa tggatttgaa gaacaaccat ttggatttga tcatagagat 960

aagttatgtt cattttatc aataagaaga atgcaagcat tattaatgtt aacaagaaga 1020

tcaggattat cacatacaca accattagat tgtccattag gattagcagg aagagtggtg 1080

agagcatcag gatgtggacc agaaccatta ggattagcag gaagagtggt gagagtggca 1140

gcacatataa caggaacaag aggaagatca aatacattat catcaccaaa ttcaaagaat 1200

gaaaaggcat taggaagaaa gataaattca tgggaatcat caagatcagg acattcattt 1260

ttatcaaatt tacatttaag aaatggagaa ttagtgatac atgaaaaggg attttattat 1320

atatattcac aaacatattt tagatttcaa gaagaaataa aggaaaatac aaagaatgat 1380

aagcaaatgg tgcaatatat atataagtat acatcatatc cagatccaat attattaatg 1440

aagtcagcaa gaaattcatg ttggtcaaag gatgcagaat atggattata ttcaatatat 1500

caaggaggaa tatttgaatt aaaggaaaat gatagaatat ttgtgtcagt gacaaatgaa 1560

catttaatag atatggatca tgaagcatca ttttttggag catttttagt ggga 1614

<210> 50
< 211> 4
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> ninguno

<400> 50
Gly Gly Ser Gly
1

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:

un dominio (a) que es un fragmento funcional de una secuencia de la proteína hTRAIL, cuyo fragmento comienza con un aminoácido en una posición no inferior a hTRAIL95, o un homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos 70% de identidad de secuencia;

en donde dicho fragmento funcional o un homólogo del mismo tiene la capacidad de unirse a receptores de muerte de la superficie celular e inducir la apoptosis en células de mamífero; y

un dominio (b) que es una secuencia de un péptido efector inmunoestimulador seleccionado a partir del grupo que consiste en el seudodímero de interferón gamma de SEQ Nº 19 y el seudodímero de interferón alfa 2b de SEQ Nº 46,

en donde la secuencia del dominio (b) está fijada al extremo C-terminal o N-terminal del dominio (a).

2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el dominio (a) comprende el fragmento de la secuencia de la proteína hTRAIL que comienza con un aminoácido del intervalo hTRAIL95 a hTRAIL122 inclusive, y termina con el aminoácido hTRAIL281.

3. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en la que el dominio (a) se selecciona a partir del grupo que consiste en fragmentos de hTRAIL114-281, comenzando con un aminoácido en la posición 95, 116, 120, 121 o 122.

4. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene entre el dominio (a) y el dominio (b) al menos un dominio (c) que comprende un sitio de escisión de proteasas seleccionado a partir del grupo que consiste en una secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP, una secuencia reconocida por la urocinasa uPA y combinaciones de las mismas.

5. La proteína de fusión según la reivindicación 4, en donde la secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP es SEQ. Nº 20 y la secuencia reconocida por la urocinasa uPA es SEQ. Nº 21.

6. La proteína de fusión según las reivindicaciones 4 o 5, en donde el dominio (c) es una combinación de la secuencia reconocida por la metaloproteasa MMP y la secuencia reconocida por la urocinasa uPA situadas una junto a la otra.

7. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que contiene entre dos dominios (c) un dominio (d) de un enlazador para la fijación de una molécula PEG, seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ. Nº 22, SEQ. Nº 23, SEQ. Nº 24 y SEQ. Nº 25.

8. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende adicionalmente un enlazador de glicina-serina estérico flexible entre los dominios (a), (b), (c) y/o (d).

9. La proteína de fusión según la reivindicación 8, en donde el enlazador de glicina-serina se selecciona a partir del grupo que consiste en SEQ. Nº 26, SEQ. Nº 27, SEQ. Nº 28 y SEQ. Nº 50.

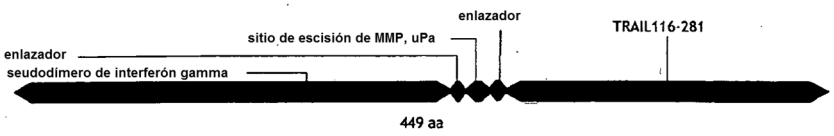
10. La proteína de fusión según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona a partir del grupo que consiste en SEQ. Nº 12; SEQ. Nº 13; SEQ. Nº 14; SEQ. Nº 15; y SEQ. Nº 44.

11. Una secuencia de polinucleótidos, que codifica la proteína de fusión definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

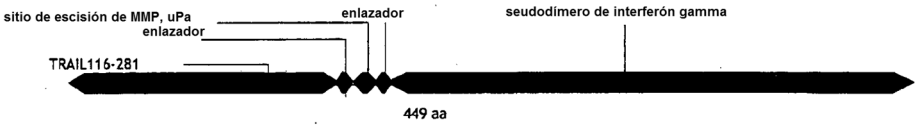
12. La secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 11, seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ. Nº 40; SEQ. Nº 41; SEQ. Nº 42; SEQ. Nº 43; y SEQ. Nº 48.

13. Una composición farmacéutica, que comprende como ingrediente activo la proteína de fusión según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

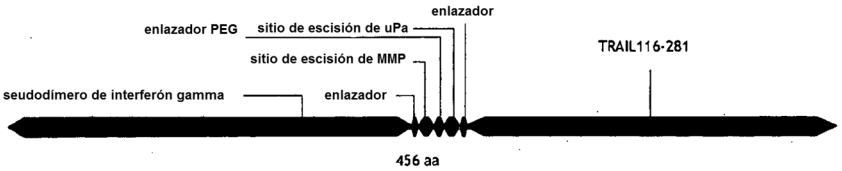
14. La proteína de fusión según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en el tratamiento de enfermedades cancerígenas en mamíferos, incluyendo seres humanos.



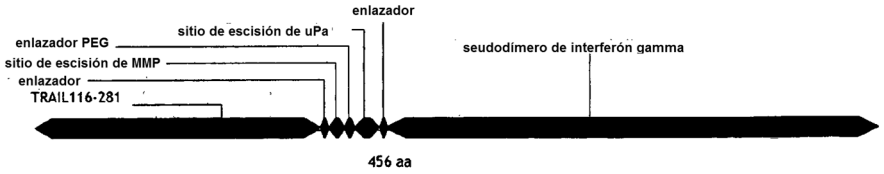
Ej. 12



Ej. 13

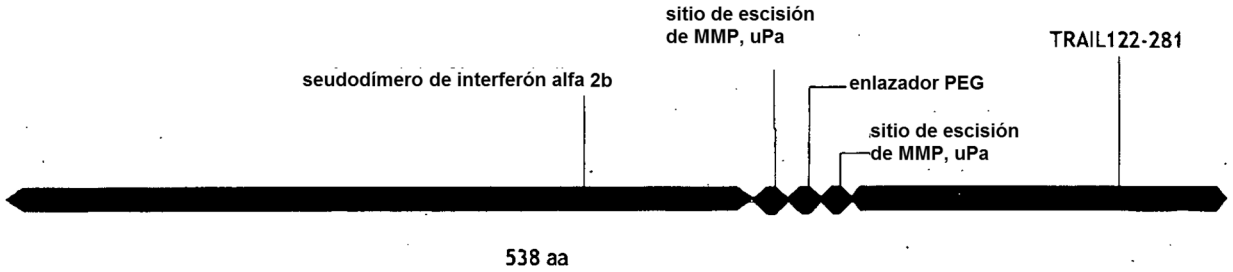


Ej. 14



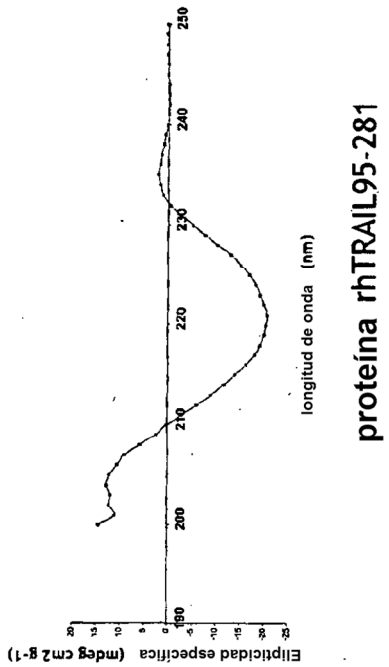
Ej. 15

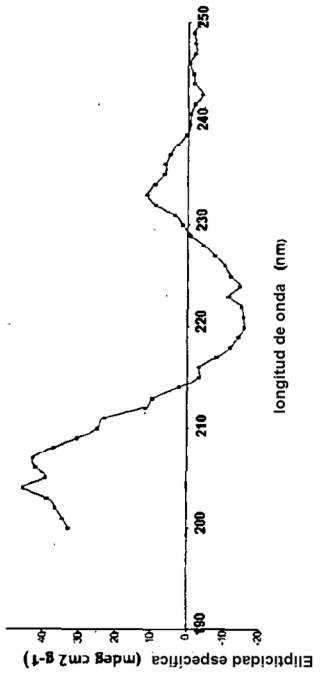
Fig. 3


sitio de escisión
de MMP, uPa
TRAIL122-281
seudodímero de interferón alfa 2b
enlazador PEG
sitio de escisión
de MMP, uPa
538 aa

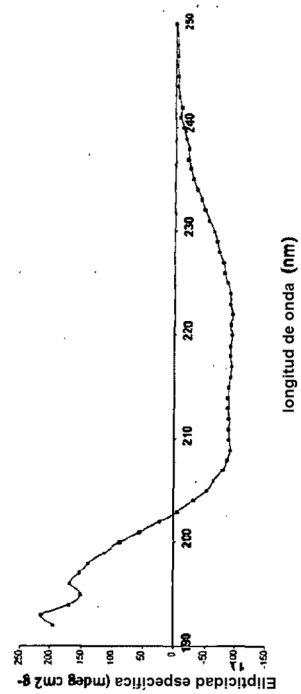
Ej. 16

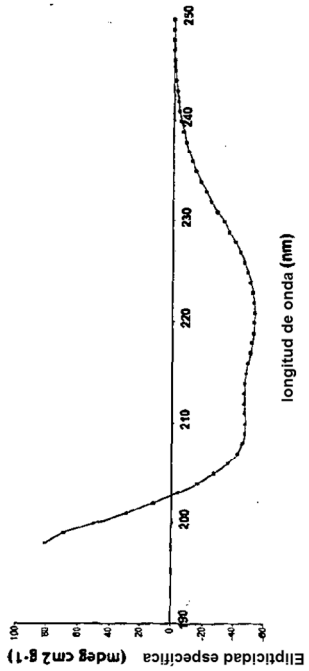
Fig. 4





Ej. 12





Ej. 14

Fig. 5

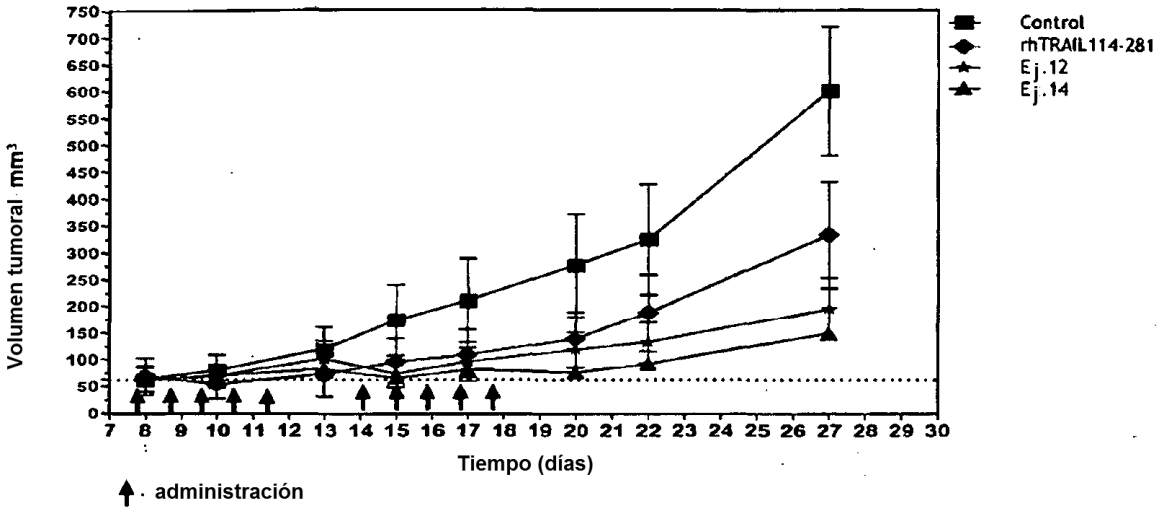

Volumen tumoral mm³
Tiempo (días)
administración
Control
rhTRAIL114-281
Ej.12
Ej.14

Fig. 6

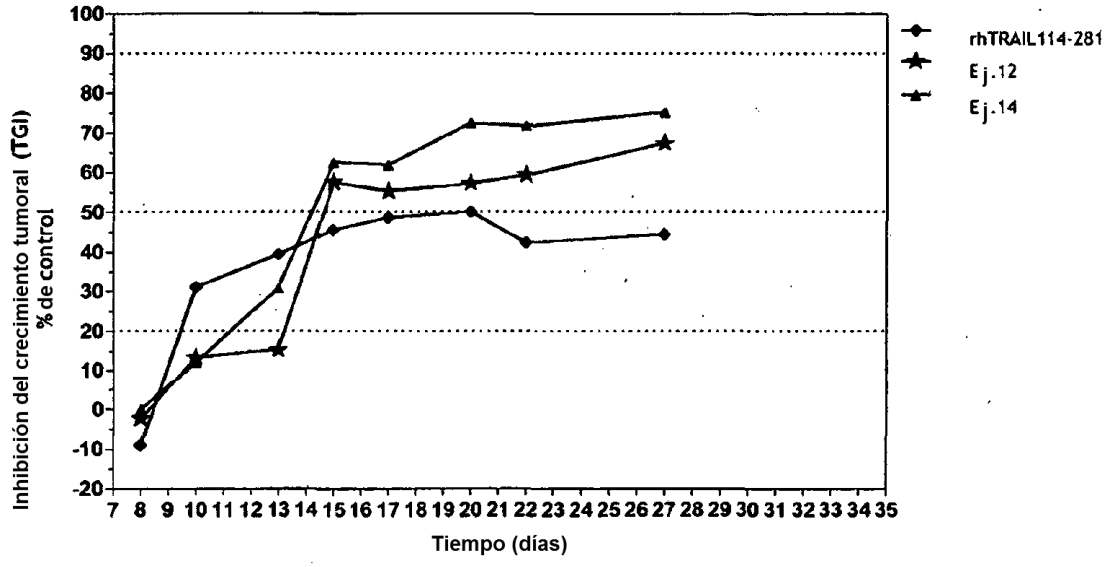

Inhibición del crecimiento tumoral (TGI)
% de control
Tiempo (días)
rhTRAIL114-281
Ej.12
Ej.14

Fig. 7

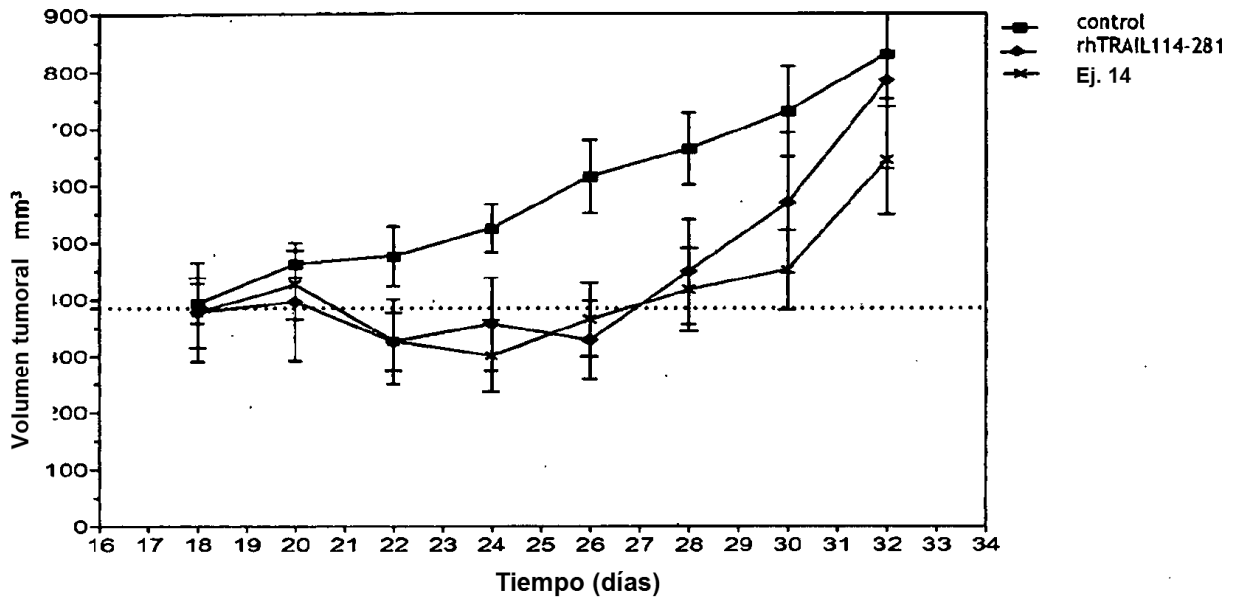

Volumen tumoral mm³
900
800
100
0
16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34
Tiempo (días)
control
rhTRAIL114-281
Ej. 14

Fig. 8

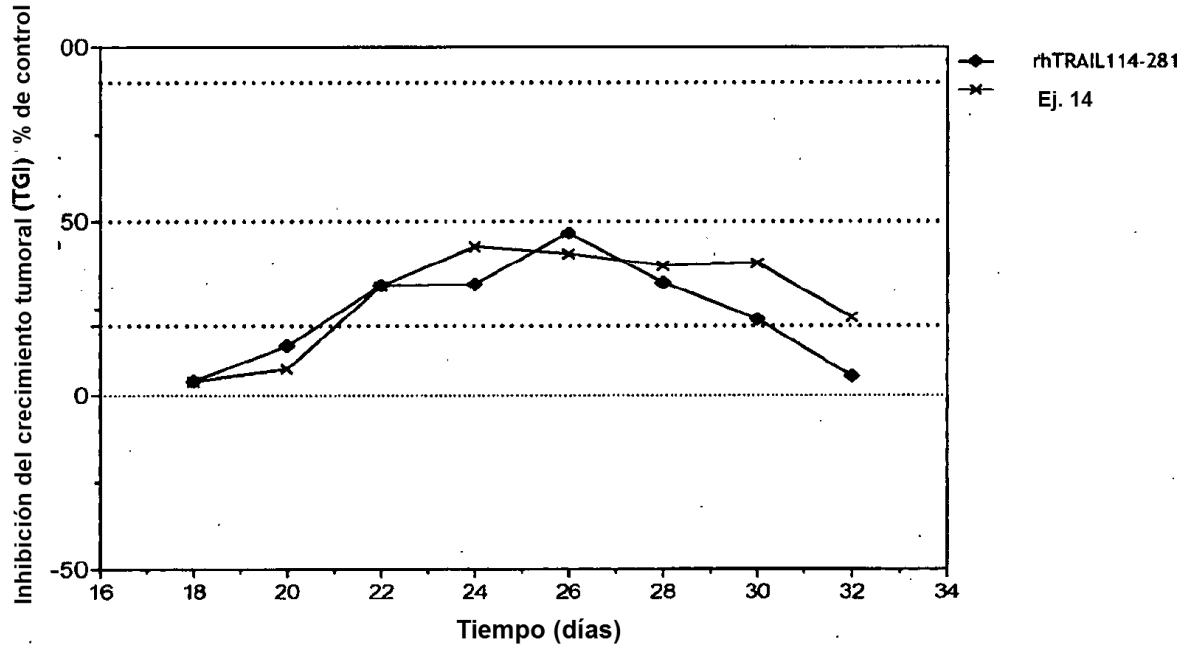

Inhibición del crecimiento tumoral (TGI) % de control
00
50
0
-50
16 18 20 22 24 26 28 30 32 34
Tiempo (días)
rhTRAIL114-281
Ej. 14

Fig.9

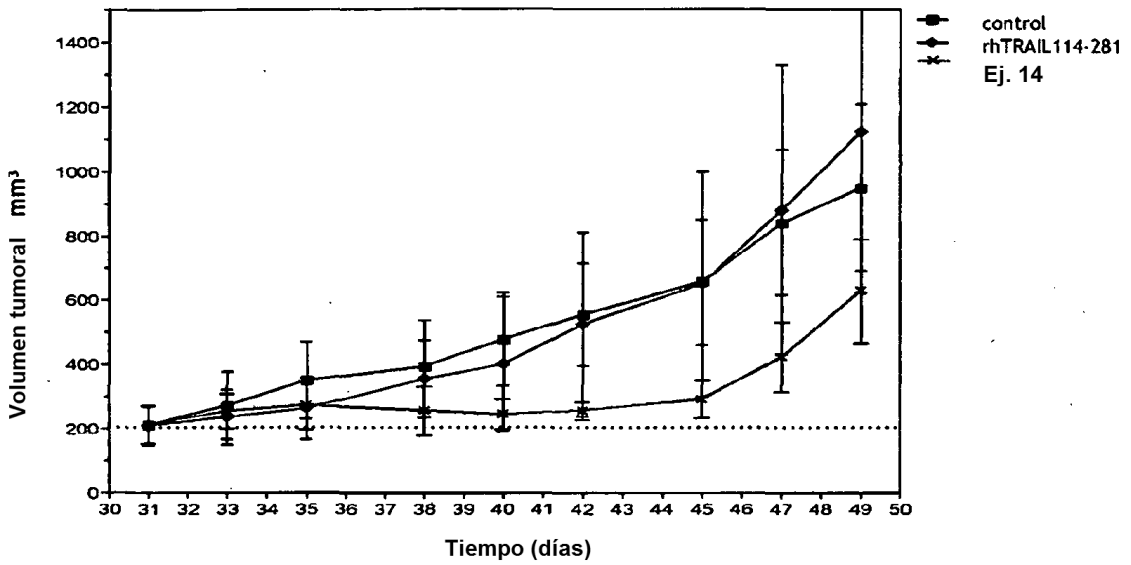

control
rhTRAIL114-281
Ej. 14
Volumen tumoral mm³
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
Tiempo (días)

Fig. 10

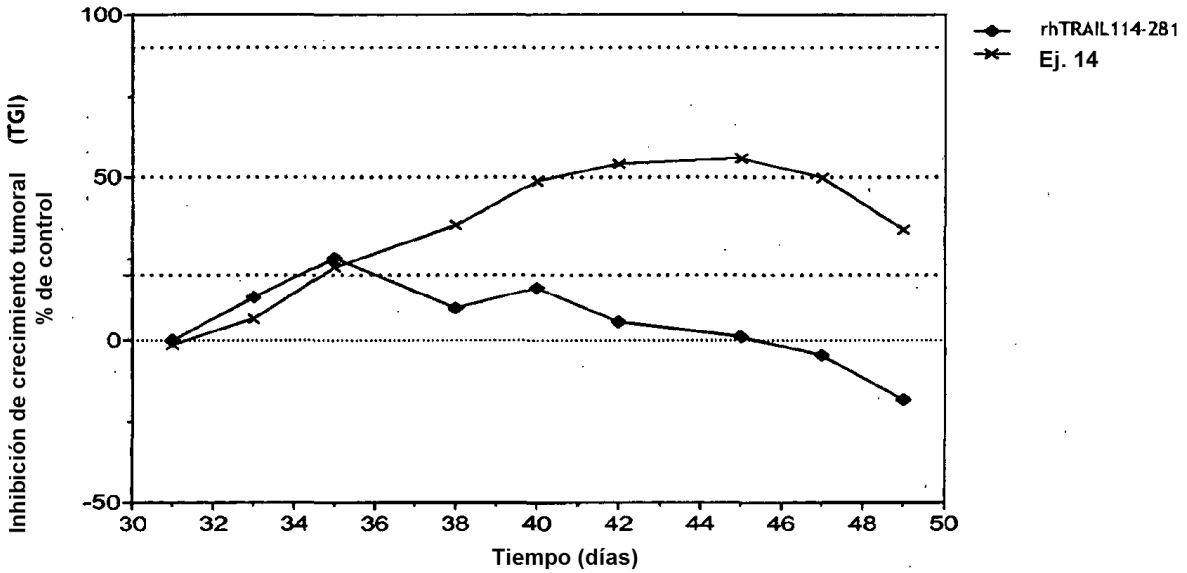

rhTRAIL114-281
Ej. 14
Inhibición de crecimiento tumoral (TGI)
% de control
100
50
0
-50
30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50
Tiempo (días)

Fig.11

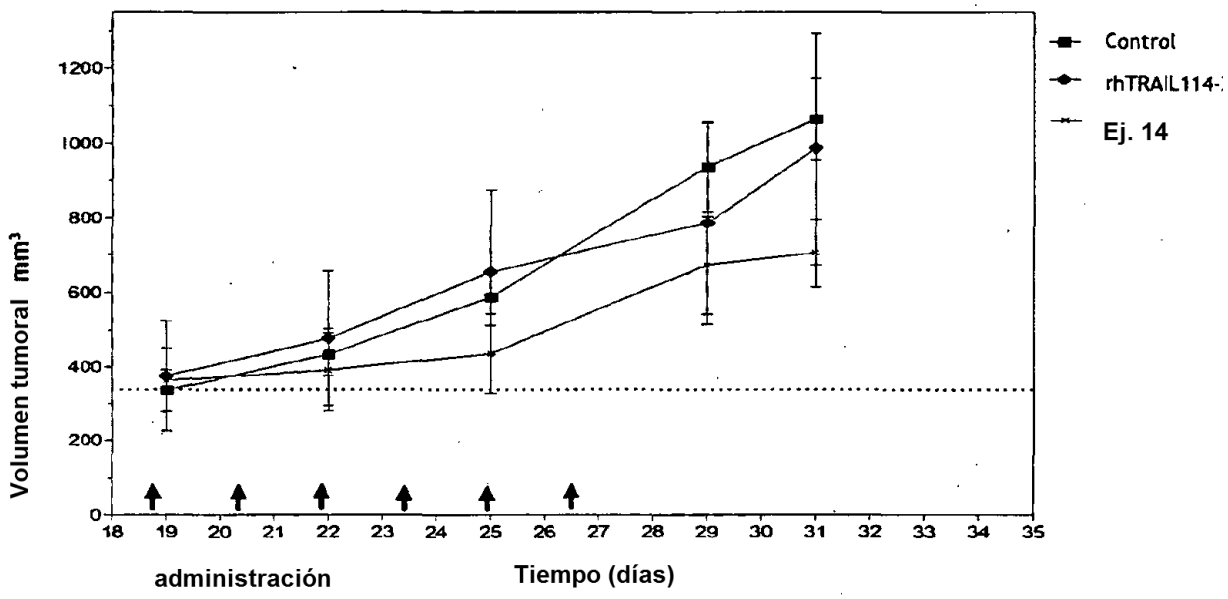

Control
rhTRAIL114-
Ej. 14
Volumen tumoral mm³
1200
1000
800
600
400
200
0
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
administración
Tiempo (días)

Fig. 12

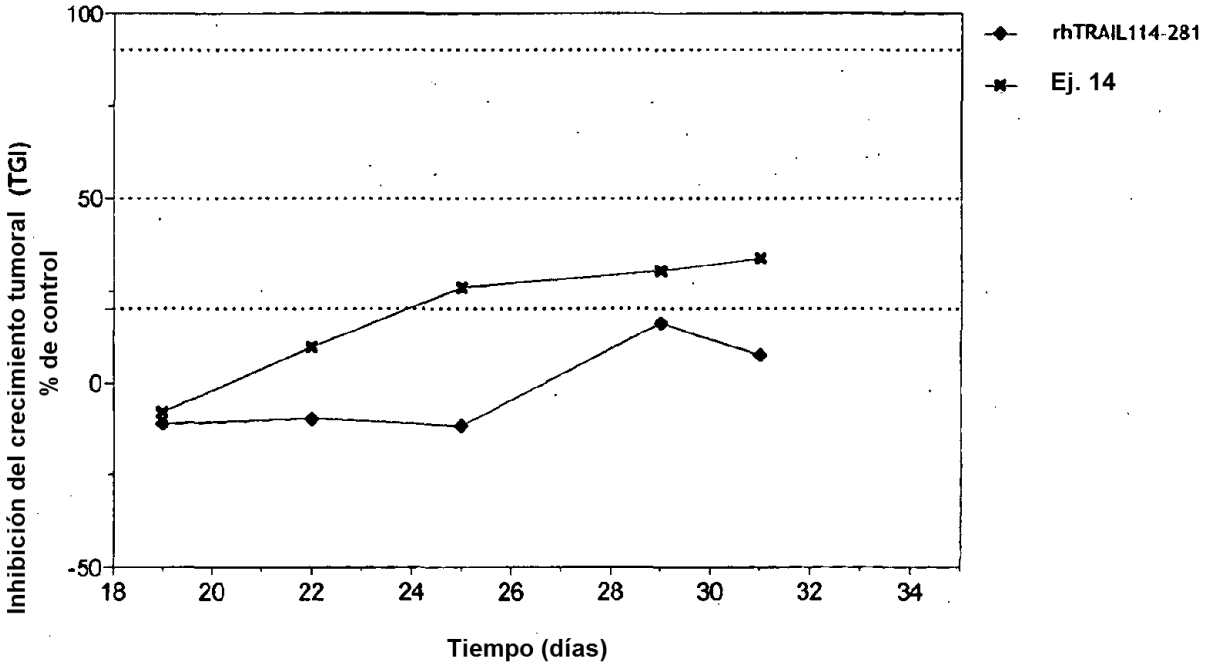

rhTRAIL114-281
Ej. 14
Inhibición del crecimiento tumoral (TGI)
% de control
100
50
0
-50
18 20 22 24 26 28 30 32 34
Tiempo (días)

Fig. 13