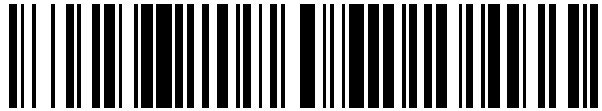


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 879**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C07K 14/525** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2009 E 13152482 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2604693**

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

30 Prioridad:

**21.07.2008 EP 08013112**

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

**27.05.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 571 879 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Moléculas de una sola cadena de TNFSF

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

**Estado de la Técnica**

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

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

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

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

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

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

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

**40 Sumario de la Invención**

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

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

que es sustancialmente no-agregante.

50 La invención se refiere, además, a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según se describe en esta memoria y a una célula o un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico según se describe en esta memoria.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula según se describe en esta memoria.

La invención también se refiere a una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico o una célula según se describe en esta memoria para su uso en terapia, p. ej., el uso de una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula según se describe en esta memoria para la preparación de una composición farmacéutica en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos causados por, asociados con y/o acompañados de la disfunción de citoquinas de TNFSF, en particular trastornos proliferativos tales como tumores, p. ej., tumores sólidos o linfáticos; enfermedades infecciosas; enfermedades inflamatorias; enfermedades metabólicas; trastornos autoinmunes, p. ej., enfermedades reumatoides y/o artríticas; enfermedades degenerativas, p. ej., enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple; enfermedades asociadas a la apoptosis o rechazos de trasplantes.

**Descripción de las Figuras**

- 10    Figura 1            Estructura del dominio del polipéptido de fusión de cadena sencilla de la invención. I., II., III. dominios de citoquinas de la familia de TNF solubles.
  
- Figura 2            Imagen esquemática que representa la estructura general de proteínas de la TNF-SF. ■ ■ ■ membrana celular, extremo N situado dentro de la célula, 1. Pliegue  $\beta$  anti-paralelo del dominio de unión al receptor (RBD), 2. Interfaz de RBD y membrana celular, 3 sitio de escisión de proteasa.
  
- 15    Figura 3            Imagen esquemática que representa la estructura del trímero de la TNF-SF nativo. Las estructuras cilíndricas representan RBDs, Los extremos N conectan RBD con la membrana celular.
  
- Figura 4            Imagen esquemática que representa la estructura de tres dominios solubles que comprenden el dominio de unión al receptor de una citoquina TNF. I., II., III. dominios de citoquinas de la familia TNF solubles.
  
- 20    Figura 5            Trimerización de los dominios solubles que comprenden el RBD de una citoquina TNF, caracterizado porque los extremos N y C de los tres dominios solubles forman una superficie.
  
- Figura 6            Imagen esquemática que representa la estructura de la TNF-SF de una sola cadena que comprende toda o una parte de la región de tallo que ilustra el requisito de enlazadores más largos para compensar la distancia al extremo N del siguiente dominio soluble.
  
- 25    Figura 7            Proteína de fusión scFv-TNF-SF conocida de la técnica.
  
- Figura 8            Proteína de fusión Fc-TNF-SF conocida de la técnica.
  
- Figura 9            9A Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento adicional de anticuerpo Fab. 9B Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento adicional de anticuerpo scFv.
  
- 30    Figura 10           Dimerización de dos polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma N-terminal a través de puentes disulfuro.
  
- Figura 11           Dimerización de dos polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma C-terminal a través de puentes disulfuro.
  
- Figura 12           Dimerización de polipéptidos de fusión de cadena sencilla a través de un enlazador.
  
- 35    Figura 13           Polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende un fragmento de anticuerpo Fab adicional fusionado adicionalmente a un segundo polipéptido de fusión o a un polipéptido de fusión scFv.
  
- Figura 14           Dimerización de dos polipéptidos de fusión scFab a través de puentes disulfuro.
  
- Figura 15           Polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma N-terminal que comprenden adicionalmente un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
  
- 40    Figura 16           Polipéptidos de fusión ScFc fusionados de forma C-terminal que comprenden adicionalmente un fragmento de anticuerpo Fv y/o Fab.
  
- Figura 17           Análisis SEC de miembros de la TNF-SF expresados de manera recombinante, purificados, en condiciones nativas. Se muestran a modo de ejemplo dos análisis SEC de los miembros de la

- 5 TNF-SF purificados en una columna Superdex200 bajo condiciones nativas (p. ej.: PBS, pH 7,4). Los diagramas muestran la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La flecha en negro indica el pico de elución para la fracción que contiene proteína de la TNF-SF trimérica soluble, definida. El triángulo indica el pico de elución para la TNF-SF oligomerizada. La flecha en blanco indica el volumen vacío de la columna de la SEC que contiene agregados de proteína, que son demasiado grandes para ser separados (> 800 kDa).
- Figura 17A: Agregación de proteína de la TNF-SF El Diagrama A muestra de modo ilustrativo un análisis de una preparación de proteína de la TNF-SF que contiene una alta cantidad de proteína oligomerizada/agregada (indicada por la alta cantidad de proteína que eluye en el volumen vacío y la alta cantidad de proteína oligomérica).
- 10 Figura 17 B: Proteína soluble definida por proteína de la TNF-SF El Diagrama B muestra de modo ilustrativo un análisis para un preparado de proteína de la TNF-SF que contiene casi exclusivamente proteína soluble definida (indicado por la ausencia de proteína que eluye en el volumen vacío y por la cantidad muy limitada de proteína que eluye como oligómero).
- 15 Figura 18 Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SSSS purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SSSS en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 14,56 ml, correspondiente a un MW (peso molecular) aparente de 68 kDa. No hay picos de proteínas adicionales con menor volumen de retención, lo que indica que se podía observar proteína oligomerizada/agregada.
- 20 Figura 19 Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SNSN purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILR2-SNSN en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 14,12 ml, correspondiente a un MW aparente de 87 kDa. No hay picos de proteínas adicionales con menor volumen de retención, lo que indica que se podía observar proteína oligomerizada/agregada.
- 25 Figura 20 Análisis SEC de Fab-scTRAILwt-SNSN purificado por afinidad y expresado de manera recombinante. Análisis SEC de Fab-scTRAILwt-SNSN en una columna Superdex200 utilizando PBS, pH 7,4. El diagrama muestra la absorción a 280 nm (mAU) representada frente al volumen de elución (ml). La proteína eluye como un pico distinto con un volumen de elución de 13,99 ml, correspondiente a un MW aparente de 94 kDa. Se podía observar un pequeño pico de proteína adicional en 12,00 ml. El Mw aparente de este pico corresponde a aproximadamente 270 kDa, lo que indica una trimerización definida de Fab-scTRAILwt-SNSN. La cantidad de proteína total del pico a 12,00 ml representa <3% de la proteína total. Más de 97% del Fab-scTRAILwt-SNSN analizado tiene un estado soluble definido (el ensamblaje correcto de los tres módulos de unión al receptor). El pico a 16,12 ml, que corresponde a un MW de 28 kDa, contiene polipéptido Fab de cadena ligera y no se incluyó para el análisis de áreas de los picos.
- 30 Figura 21 Glicosilación del Enlazador scTRAIL Humano
- 35 Figura 21 A Secuencia de aminoácidos del o de los enlazadores utilizada para combinar los módulos de unión al receptor de construcciones individuales TRAIL de cadena sencilla. Gly281 codifica el último aminoácido de un módulo de unión a receptor respectivo, la secuencia GSGN/SGN/SGS codifica la secuencia de enlazador, Arg121 codifica el primer aminoácido del siguiente dominio de unión al receptor de TRAIL. Las secuencias de enlazador diseñadas contienen dos sitios de glicosilación N-enlazadas putativas en la posición 1 ó 2 según se indica. Estas posiciones fueron permutadas según se indica (versión I, II, III).
- 40 Figura 21 B Combinación de posiciones de enlazador: Las moléculas scTRAIL contienen tres módulos homólogos (barriles grises) que están conectados con enlazador 1 y enlazador 2 según se indica. Cada uno de los dos enlazadores puede ser diseñado para la glicosilación ligada a N según se describe en "A". Se puede diseñar un conjunto completo de 9 proteínas diferentes que contienen todas las combinaciones posibles de enlazadores sobre la base de las secuencias mostradas en B para los enlazadores 1 y 2. (Se expresaron seis de estas proteínas - véase "C").
- 45
- 50

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

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

### Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

La proteína de fusión de cadena sencilla comprende tres dominios solubles derivados de una citoquina de la superfamilia de TNF. Preferiblemente, esos dominios solubles se derivan de una citoquina de mamífero, en particular ser humano, incluyendo variantes alélicas y/o derivados de los mismos. Los dominios solubles comprenden la porción extracelular de una citoquina TNFSF, incluyendo el dominio de unión al receptor sin dominios de la membrana localizados. Proteínas de la superfamilia de TNF están ancladas a la membrana a través de una porción N-terminal de 15-30 aminoácidos, la denominada región del tallo. La región del tallo contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia a la membrana celular. Sin embargo, la región del tallo no es parte del dominio de unión al receptor (RBD).

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

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

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

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

El polipéptido de fusión puede comprender uno, dos o tres sitios funcionales de unión al receptor de citoquina, es decir, secuencias de aminoácidos capaces de formar un complejo con un receptor de citoquinas. Así, al menos uno

de los dominios solubles es capaz de unirse al receptor de citoquina correspondiente. En una realización, al menos uno de los dominios solubles es capaz de la activación del receptor, con lo que se puede efectuar una actividad apoptótica y/o proliferativa. En una realización adicional, se seleccionan uno o más de los dominios solubles que no son capaces de la activación del receptor.

5 El dominio soluble se puede derivar de miembros de la superfamilia del TNF, p. ej., TNFSF-1-18 humana y EDA-A1 a -A2 según se indica en la Tabla 1, preferiblemente de LTA (SEQ ID NO: 1), TNF $\alpha$  (SEQ ID NO: 2), LTB (SEQ ID NO: 3), OX40L (SEQ ID NO: 4), CD40L (SEQ ID NO: 5), CD95L (SEQ ID NO: 6), CD27L (SEQ ID NO: 7), CD30L (SEQ ID NO: 8), CD137L (SEQ ID NO: 9), TRAIL (SEQ ID NO: 10), RAN KL (SEQ ID NO: 11), TWEAK (SEQ ID NO: 12), APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), BAFF (SEQ ID NO: 15), LIGHT (SEQ ID NO: 16), TL1A (SEQ ID NO: 17), GITRL (SEQ ID NO: 18), EDA-A1 (SEQ ID NO: 19) y EDA-A2 (SEQ ID NO: 20). Dominios solubles preferidos de las proteínas respectivas se indican en la Tabla 1 (NH<sub>2</sub>-aa a COOH-aa) y, p. ej., comprende los aminoácidos 59-205, 60-205 ó 64-205 de LTA (SEQ ID NO: 1), 86-233 de TNF $\alpha$  (SEQ ID NO: 2), 82-244 u 86-244 de LTB (SEQ ID NO: 3), 52-183 ó 55-183 de OX40L (SEQ ID NO: 4), 112-261, 117-261 ó 121-261 de CD40L (SEQ ID NO: 5), 51-193 ó 56-193 de CD27L (SEQ ID NO: 7), 97-234, 98-234 ó 102-234 de CD30L (SEQ ID NO: 8), 86-254 de CD137L (SEQ ID NO: 9), 161 -317 de RANKL (SEQ ID NO: 11), 103-249, 104-249, 105-249 ó 106-249 de TWEAK (SEQ ID NO: 12), 112-247 de APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), 112-250 de APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), 140-285 de BAFF (SEQ ID NO: 15), 91-251, 93-251 ó 97-251 de TL1A (SEQ ID NO: 17), 52-177 de GITRL (SEQ ID NO: 18), 245-391 de EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), 245-389 de EDA-A2 (SEQ ID NO: 20).

10 Más preferiblemente, los dominios solubles se derivan de CD95L, TRAIL o LIGHT. En una realización especialmente preferida, los dominios solubles se seleccionan de CD95L humano, en particular a partir de los aminoácidos 144, 145 ó 146, y comprenden particularmente los aminoácidos 144-261 ó 145-281 ó 146-281 de SEQ ID NO: 6, o TRAIL humano, en particular a partir de los aminoácidos 120-122 y comprenden, en particular, los aminoácidos 120-281, 121-281 ó 122-281 de SEQ ID NO: 10. Opcionalmente, el amino ácido Lys145 de SEQ ID NO: 6 puede ser reemplazado por un aminoácido no cargado, p. ej., Ser o Gly. Opcionalmente, el aminoácido Arg121 de SEQ ID NO: 10 puede ser reemplazado por un ácido amino no cargado, p. ej., Ser o Gly. En una realización preferida adicional, los dominios solubles se seleccionan de LIGHT humano, en particular a partir de los aminoácidos 93, 94 ó 95 de SEQ ID NO: 16 y, en particular, comprenden los aminoácidos 93-240, 94-240 ó 95-240 de SEQ ID NO: 16.

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

25 En una realización adicional preferida de la invención, el dominio de citoquina soluble (i) comprende un mutante de la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión al receptor de la misma que se une a y/o activa el receptor de TRAIL-1 (TRAILR1) y/o el receptor de TRAIL-2 (TRAILR2). La unión y/o actividad del mutante puede determinarse, p. ej., por los ensayos como se describe en van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103: 8634-8639), Kelley et al. (J. Biol.Chem, 2005, 280:2205-2215) o MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65:11265-11270).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (a) Arg144 - (Gly/Ser) 145 - Val (146)
- (b) (Gly/Ser) 144 - Lys145 - Val (146) y
- (c) (Gly/Ser) 144 - (Gly/Ser) 145 -Val (146).

Además, se prefiere que el dominio de CD95L termine con el aminoácido Leu 281 de CD95L humano.



El dominio soluble de CD95L puede comprender una secuencia de tipo salvaje de un mamífero, p. ej., un ser humano. En determinadas realizaciones, sin embargo, la secuencia de CD95L puede comprender una mutación que resulta en una reducción o inhibición completa de la unión a la matriz extracelular, p. ej., una mutación en la posición Lys177, p. ej., Lys177 → Glu, Asp o Ser y/o una mutación que reduce y/o inhibe la unión al receptor de CD95L, p. ej., una mutación en la posición Tyr218, p. ej., Tyr218 → Arg, Lys, Ser, Asp. En determinadas realizaciones de la presente invención, una de los tres módulos solubles de CD95L es una variante de secuencia con una unión reducida al receptor. En otra realización, dos de los módulos contienen mutaciones que resultan en una unión reducida al receptor.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los dominios solubles de citoquinas de la familia de TNF (i), (iii) y (v) son dominios solubles de TRAIL, en particular dominios solubles de TRAIL humano. El primer dominio soluble de TRAIL (i) se puede seleccionar de secuencias nativas, acortadas y/o mutadas. Por lo tanto, el primer dominio soluble de TRAIL (i) tiene una secuencia N-terminal que puede comenzar entre el aminoácido Glu116 y Val122 de TRAIL humano, y en donde Arg121 puede ser reemplazado por un aminoácido neutro, p. ej., por Ser o Gly. Los segundo y tercer dominios solubles de TRAIL (iii) y (v) tienen una secuencia N-terminal acortada que comienza preferiblemente entre el aminoácido Gly120 y Val122 de TRAIL humano, y en donde Arg121 puede ser reemplazado por otro aminoácido, p. ej., Ser o Gly.

Preferiblemente, la secuencia N-terminal de los dominios solubles de TRAIL (iii) y (v) se selecciona de:

- (a) Arg121 - Val122 - Ala123 y
- (b) (Gly/Ser) 121.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Ejemplos

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

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

### 1.1 Estructura del polipéptido

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

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

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

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

### 1.2 Casete de genes que codifica el polipéptido

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

### 1.3 Estrategia de clonación

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

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

### 2.1 Estructura del polipéptido

- A) Aminoácidos Met1 -Gly20  
Péptido señal Ig-kappa, asumida escisión de peptidasa señal después del aminoácido Gly20

B) Aminoácidos Gln21-Gly182

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

5 C) Aminoácidos Gly183-Ser190

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

D) Aminoácidos Arg191-Gly351

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

10 E) Aminoácidos Gly352-Ser359

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

F) Aminoácidos Arg360-Lys538

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

G) Aminoácido Gly521-Lys538

Elemento enlazador peptídico con un motivo Strep-tag II.

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

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

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

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

## 2.2 Casete de genes que codifica el polipéptido

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

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

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

### 3.1 Estructura del polipéptido

A) Aminoácidos Met1 –Ser29

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

45 B) Aminoácidos Arg29-Gly190

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

C) Aminoácidos Gly191-Ser198

Primer elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son como se indica en el Ejemplo 2.

5 D) Aminoácidos Arg199-Gly359

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

E) Aminoácidos Gly360-Ser367

Segundo elemento enlazador peptídico, en donde los dos aminoácidos designados X son como se indica en el Ejemplo 2.

10 F) Aminoácidos Arg368-Gly528

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

G) Aminoácido Gly529-Lys546

Enlazador peptídico con un motivo Strep-tag II.

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

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

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

### 3.2 Casete de genes que codifica el polipéptido

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

## 25 4. Expresión y Purificación

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

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

40 La SEC se realizó en una columna Superdex 200 utilizando un sistema de cromatografía Äkta (GE-Healthcare). La columna se equilibró con solución salina tamponada con fosfato y el polipéptido concentrado, purificado con streptactina, se cargó en la columna de la SEC a un caudal de 0,5 ml/min. El perfil de elución del polipéptido se controló mediante absorbancia a 280 nm.

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

## 5. Ensayo de la Apoptosis

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

### 5.1 Ensayo de la muerte de la célula

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

## 6. Ensayo de Estabilidad/Agregación

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

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

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

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

Si se produce la agregación de proteínas, el análisis SEC muestra picos de proteínas adicionales con volúmenes de retención inferiores. Para miembros de la familia TNF-SF la agregación de proteínas solubles se produce de una manera característica. Las proteínas tienden a formar oligómeros de los "trímeros", formando nonámeros (3 x 3) y 27meros (3 x 9). Estos oligómeros sirven como semillas de agregación y un alto contenido de oligómeros conduce en potencia a la agregación de la proteína. Oligómeros de gran peso molecular y los agregados eluyen en el volumen vacío de la columna Superdex200 y no pueden ser analizados mediante SEC con respecto a su peso molecular nativo. En la Figura 17 se muestran ejemplos para el análisis SEC de un trimérico soluble definido y un preparado oligomerizado/agregado de proteínas de TNF-SF.

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

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

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

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

## 5 6.2 Análisis de agregación mediante SEC de variantes sc-TRAIL purificadas

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

Las proteínas analizadas mediante SEC eran:

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

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

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

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

## 35 6.3 Glicosilación diferencial de variantes de sc-TRAIL-enlazador

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

Basado en este análisis los autores de la invención reivindican la glicosilación diferencial de las construcciones sc-TRAIL mediante la modificación de la posición de los asparaginas dentro de la o las secuencias de enlazador. La glicosilación protege la secuencia de enlazador hacia la degradación proteolítica y podría estabilizar la proteína.

Además, la glicosilación de la secuencia de enlazador potencialmente impide el reconocimiento de la secuencia de enlazador por parte del sistema inmune y reduce potencialmente la inmunogenicidad de la proteína. Por lo tanto, la glicosilación de la secuencia de enlazador es beneficiosa con respecto a la inmunogenicidad y la estabilidad proteolítica de las construcciones sc-TRAIL y tiene una influencia potencial sobre la semivida de la proteína. La glicosilación diferencial específica para el enlazador se puede utilizar para modificar la inmunogenicidad y la estabilidad de los miembros de TNF-SF recombinantes.

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

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

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

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

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

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

Además, se han construido proteínas de fusión Fc-TNF-SF, en donde cada una de las proteínas de fusión comprende un dominio Fc intramolecular N-terminal y un dominio soluble C-terminal (Figura 8). La dimerización de los dominios solubles se logra mediante el ensamblaje de dos dominios Fc a través de puentes disulfuro. Subsiguientemente se obtienen trímeros mediante una combinación de dos dominios solubles de una proteína de fusión Fc-TNF-SF y un dominio soluble de otra proteína de fusión Fc-TNF-SF. Como se puede deducir a partir de la Fig. 4, la dimerización de trímeros también está mediada por la fusión del Fc-TNF-SF N-terminal. En conclusión, por cada uno de los dímeros del trímero están presentes tres fragmentos de anticuerpo Fc. Sin embargo, tales proteínas de fusión son propensas a formar agregados de peso molecular más alto, lo que representa una desventaja importante.

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

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

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

```

1   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA
   PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY
61  NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL
   GPSFYFDYWG QGTLVTVSSA
121 STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW
   NSGALTSGVH TFPAVLQSSG
45 181  LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC
    
```

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



1 DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP  
 GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS  
 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ  
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP  
 121 SDEQLKSGTA SWVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT  
 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

**7.2.1**

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

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

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

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

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

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

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

- 20 1. DKTHTG(S)a(G)b; (a = 0-5; b = 0 ó 1)  
 2. DKTHTGS(S)a(GS)BG(S)c (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)  
 3. DKTG(S)a(G)b; (a = 0-5; b = 0 ó 1)  
 4. DKTG(S)a(GS)BG(S)c (a, b = 0,1-6; c = 0 ó 1)  
 5. SSG(S)a(GS)BG(S) c (a, b = 0,1 -6; c = 0 ó 1)  
 6. SS(GGGS)aG(S)b (a = 0, 4.1, b = 0 ó 1)  
 25 7. GSPGSSSSS(G)a (a = 0 o

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

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

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

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

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

En el caso de las proteínas de fusión Fab-scTNF-SF, es necesaria la co-expresión de dos cadenas de polipéptidos para lograr el correcto ensamblaje del módulo de Fab además del módulo scTNF-SF (véase la figura 9A). Los módulos de cadena pesada y ligera de Pertuzumab (SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34) estaban equipados con un

péptido señal, retro-traducido y los genes sintéticos resultantes (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42) estaban genéticamente fusionados aguas arriba de los módulos de genes específicos para scTRAILwt o scTRAILR2 (SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32). Ejemplos para las casetas de genes resultantes se muestran en SEQ ID NO: 46, 48 y 50. Después de la subclonación en vectores de expresión apropiados, se utilizó una selección de los plásmidos resultantes para la expresión de proteína transitoria en células HEK293T. Los plásmidos de expresión TRAIL de cadena pesada o TRAIL de cadena ligera fueron transfectados ya sea solos o en combinación con los vectores codificadores de la cadena ligera o de la cadena pesada necesarios del fragmento Fab (Figura 26). Sorprendentemente, la combinación de módulos dentro de las proteínas de fusión influyó en la estabilidad relativa de la proteína scTRAIL durante la expresión basada en la secreción. Si el módulo de la cadena ligera del dominio Fab está fusionado N-terminal al dominio scTRAIL (ejemplificado en la SEQ ID NO: 51), el producto de expresión es estable por sí mismo y es secretado, cuando se expresa por separado (Pistas 1-4, figura 26). Se puede por lo tanto esperar que, cuando un polipéptido de fusión de este tipo se coexpresa con un módulo de cadena pesada, se formarán dos especies de proteínas principales durante un proceso de producción potencial: (1) la proteína de fusión Fab-scTRAIL que consiste en dos cadenas polipeptídicas y (2) como contaminación una proteína de fusión scTRAIL de cadena ligera sin un dominio Fab funcional. Por lo tanto, fusionando el módulo de la cadena pesada N-terminal al módulo scTNF-SF para la expresión se prefiere evitar esta desventaja técnica.

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

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

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

#### 7.2.2

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

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

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

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

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

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

7.2.3

5 En una realización adicional, el polipéptido de fusión de la invención comprende un fragmento de anticuerpo Fc N- o C-terminal adicional (Figs. 10 y 11). Preferiblemente, el dominio del fragmento de anticuerpo Fc se deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina G humana, en particular de una cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 humana. En una realización especialmente preferida, la secuencia de aminoácidos del dominio Fc se muestra en la SEQ ID NO: 37.

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

10 Los aminoácidos Lys1-Glu16 definen la región bisagra.  
 Para una fusión C-terminal (Fig. 11) el dominio Fc comprende preferiblemente el dominio constante completo (aminoácidos 17-230 de SEQ ID NO: 37) y una parte o la región de bisagra completa, p. ej., la región de bisagra completa o la región de bisagra a partir del aminoácido Asp4.  
 15 Enlazadores preferidos para la conexión de un fragmento de anticuerpo Fc C-terminal (p. ej., Fig. 11) se muestran en lo que sigue:

Enlazador 8

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

Enlazador 9

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

20 Enlazador 10

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

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

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

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

30

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

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

- 5 Para la purificación y caracterización, una Strep-tag II (secuencia de aminoácidos WSHQPFEK) se colocó en posición C-terminal con respecto al dominio Fc. Esta etiqueta de afinidad estaba enlazada al dominio CH3 por un elemento enlazador flexible (secuencia de aminoácidos SSSSSSA), en sustitución del residuo de lisina C-terminal de la secuencia CH3. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión scTNF-SF, así como para los módulos de proteínas descritos se retro-tradujeron y su uso de codones se optimizó para la expresión basada en células de mamífero. La síntesis de genes fue realizada por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). Las casetes de expresión para proteínas de fusión mayores fueron ensambladas por procedimientos de clonación de ADN comunes que comienzan con módulos de ADN de tamaño adecuado y el patrón de enzima de restricción adecuado. A modo de ejemplo, la casete de gen resultante para la proteína de fusión TRAILwt FC01 de cadena sencilla (scTRAILwt-FC01) se muestra en SEQ ID NO: 44 y la secuencia de la proteína codificada se muestra en la SEQ ID NO: 43. Los casetes de genes que codifican las variantes de enlazador acortadas (Tabla 1) se generaron mediante estrategias de subclonación basadas en PCR, partiendo de SEQ ID NO: 44. Los casetes de expresión finales se liberaron de vectores de clonación intermedios y se subclonaron en pCDNA4-HisMax-cadena principal, utilizando sitios del plásmido únicos Hind-III, Not-I o Xba-I. Para el ensamblaje de las proteínas de fusiones Fab y Fc, se introdujo un sitio único SgS-I en la cadena principal del vector, reemplazando al sitio Not-I. Todas las casetes de expresión se verificaron rutinariamente mediante secuenciación de ADN. Las proteínas se expresaron transitoriamente en células HEK293T y los sobrenadantes de cultivo de células se vigilaron con respecto a su actividad pro-apoptótica. Tal como se muestra en la figura 27, las proteínas de fusión scTRAIL-Fc de la invención fueron capaces de inducir un aumento pronunciado en la actividad de caspasa, lo que confirma la potencia de la dimerización basada en Fc de dos módulos scTRAILwt. Se obtuvieron resultados similares para las proteínas de fusión Fc scTRAIL(específico paraR2) (datos no mostrados).
- 25 Si un fragmento de anticuerpo Fc se fusiona al extremo N de una proteína de fusión scTNF-SF (véase la Fig. 10), la secuencia de aminoácidos del módulo Fc es, preferiblemente, como se muestra en SEQ ID NO: 38:

```

1  METDTLLLWVLLLWVPAAGNG DKHTHTCPPCP APELLGGPSV
   FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
61  CVWVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
   RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
121  CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
   NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
181  WESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
   NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
241  LSLSPG

```

- Los aminoácidos 1-20 (subrayados) constituyen un péptido señal secretor N-terminal.
- 30 Para conectar el módulo Fc a la proteína de fusión ScTNF-SF, preferiblemente se utilizan enlazadores Gly/Ser. Todos los enlazadores comienzan preferiblemente con una serina y terminan preferiblemente con glicina o serina. Secuencias de enlazadores preferidos 11-12 se muestran en lo que sigue:

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

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

### 35 7.3 Dimerización de las proteínas de fusión de cadena sencilla de la invención

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

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

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

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

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

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

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

- 13. DKTHTC $\underline{C}$ PGSS(GS)<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
- 14. DKTHTC $\underline{C}$ PGSS<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
- 15. DKTHTC $\underline{C}$ (GSSGS)<sub>a</sub>GSG(S)<sub>b</sub>
- 16. DKTHTC $\underline{C}$ GSS(GS)<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
- 17. DKTHTC $\underline{C}$ GSS<sub>a</sub>G(S)<sub>b</sub>
- 18. DKTHTC $\underline{C}$ (GSSGS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
- 19. DKTHTC $\underline{C}$ PP $\underline{C}$ PGSSGSGSGS(G)<sub>b</sub>
- 20. DKTHTC $\underline{C}$ PP $\underline{C}$ P(GSSGS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
- 21. DKTHTC $\underline{C}$ PP $\underline{C}$ PGSS(GS)<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>
- 22. DKTHTC $\underline{C}$ PP $\underline{C}$ PGSS<sub>a</sub>GS(G)<sub>b</sub>

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

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

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Apogenix GmbH
- 5 <120> Moléculas de cadena sencilla de ligando de CD95
- <130> 38556P EP
- <160> 32
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 205
- 15 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 20 <223> LTA humano
- <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 25 <210> 2

<211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> TNFa humano

10 <400> 2

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

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

15 <220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.

<223> LTA humano

<220>

<221> CARÁCTERÍSTICA MISC.

5 <223> LTB humano

<400> 3

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

10

<210> 4

<211> 183

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARÁCTERÍSTICA MISC.



ES 2 571 879 T3

<223> OX40L humana

<400> 4

```

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

```

5

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

10

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

15

<400> 5

ES 2 571 879 T3

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

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

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

<400> 6

ES 2 571 879 T3

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu Pro Cys  
 20 25 30  
 Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro  
 35 40 45  
 Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro  
 50 55 60  
 Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly  
 65 70 75 80  
 Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly  
 85 90 95  
 Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala  
 100 105 110  
 Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu  
 115 120 125  
 Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg  
 130 135 140  
 Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr  
 165 170 175  
 Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr  
 180 185 190  
 Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met  
 210 215 220  
 Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His  
 245 250 255  
 Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser  
 260 265 270  
 Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu  
 275 280

<210> 7  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo

20 sapiens

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

25 <400> 7

ES 2 571 879 T3

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

Pro

- <210> 8
- 10 <211> 234
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 15 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- <223> CD30L humana
- <400> 8

ES 2 571 879 T3

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

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

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

<400> 9

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

- <210> 10
- <211> 281
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.
- 10 <223> TRAIL humana
- <400> 10

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala  
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys  
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr  
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val  
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser  
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro  
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly  
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu  
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly  
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile  
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe  
180 185 190

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

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys  
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr  
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile  
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala  
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
275 280

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

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

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 571 879 T3

260

265

270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu  
275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp  
290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp  
305 310 315

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

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

10 <400> 12

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro  
1 5 10 15

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

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala  
35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu  
50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp  
65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro  
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu  
100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly  
115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu  
130 135 140

Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu  
145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr  
165 170 175

ES 2 571 879 T3

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

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

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

10 <400> 13

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

ES 2 571 879 T3

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

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

<220>  
 <221> CARÁCTERÍSTICA MISC.  
 <223> APRIL\_ver2 humana

10 <400> 14

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

ES 2 571 879 T3

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

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

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

10 <400> 15

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

ES 2 571 879 T3

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

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

10

- <400> 16

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

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

ES 2 571 879 T3

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

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

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

10 <400> 17

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

ES 2 571 879 T3

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

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

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

10 <400> 18

ES 2 571 879 T3

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

Ser

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

5

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

10

<400> 19  
 Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala



ES 2 571 879 T3

20 25 30  
 Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly  
 35 40 45  
 Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu  
 50 55 60  
 Arg Ser Glu Leu Arg Arg Glu Arg Gly Ala Glu Ser Arg Leu Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu  
 85 90 95  
 Asp Pro Asp Ser Pro Ile Thr Ser His Leu Gly Gln Pro Ser Pro Lys  
 100 105  
 Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln  
 115 120 125  
 Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys  
 130 135 140  
 Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly  
 165 170 175  
 Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 180 185 190  
 Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile  
 195 200 205  
 Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 210 215 220  
 Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln  
 245 250 255  
 Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn  
 260 265 270  
 Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro  
 275 280 285  
 Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr  
 290 295 300

ES 2 571 879 T3

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

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

5

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

10

<400> 20

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

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

<210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Enlazador

10 <400> 21

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
1 5

5 <210> 22  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
10 <223> Enlazador  
  
<400> 22

Gly Gly Ser Gly Ser Gly  
1 5

15 <210> 23  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
20 <220>  
<223> Enlazador  
  
<400> 23

Gly Gly Ser Gly  
1

25 <210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
30 <220>  
<223> Enlazador  
  
<400> 24

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly  
1 5

35 <210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
40 <220>  
<223> Enlazador  
  
<400> 25

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly  
1 5

45 <210> 26  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
50 <220>  
<223> Enlazador  
  
<400> 26

Gly Gly Asn Gly Ser Gly  
 1 5

<210> 27  
 <211> 472  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> proteína de fusión scCD95L

10 <400> 27

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

ES 2 571 879 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Tyr Lys Leu Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 450 455 460

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 465 470

5 <210> 28  
 <211> 538  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 571 879 T3

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



ES 2 571 879 T3

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

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

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

ES 2 571 879 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 571 879 T3

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

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

<220>  
 <223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scCD95L

10 <400> 30

ES 2 571 879 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gactgacacc ctgctgttgt gggtcctact gctttgggtc    60
cctgcaggaa atggatccga attgcgtagc gtcgcacatc tgacagggaa gtccaacagc    120
agaagtatgc cctcgaatg ggaggatacc tatgggattg tgctccttc aggcgtgaaa    180
tacaagaagg gtgggctcgt catcaatgaa actggattgt acttcgtcta ttcaaaggtt    240
tactttcgtg gtcaatcttg taataacttg cctctcagcc ataaggtcta tatgcgtaac    300
tccaaatacc cacaagacct cgttatgatg gagggtaaga tgatgagtta ctgcaccaca    360
gggcaaagtgt gggccaggag tagttacctt ggcgcggtgt ttaacctcac tagcgccgat    420
catttgtacg ttaatgtcag cgagctgtcc ttggtgaact tcgaggaaag ccaaaccattc    480
tttggttat acaaactcgg tggcagcggg agtggctccg gaagaagcgt cgcacacttg    540
actggcaaat ctaattcccg ttcaatgcct ctggagtggg aagacactta tggcatcgtc    600
ttgctgtctg gtgtaaagta taagaagggt ggctgtgga ttaacgaaac cggcttgtag    660
ttcgtgtata gcaaagtcta cttcagagga cagagctgca acaacttgcc tctgtcccat    720
aaagtgtata tgaggaatag taaatatcca caggatctag ttatgatgga agggaagatg    780
atgtcgtatt gtacgaccgg ccagatgtgg gctcgcagca gctatctggg tgccgtattc    840
aacttgactt ctgaggatca cctctatgtg aacgtgtccg aattgtcgtt ggtgaatttt    900
gaggagtac agaccttctt cggactctac aagctgggag gcagtggtag tggtagcggc    960
cgctctgttg ctcatctgac gggaaagagc aactctagga gtatgccgct ggagtgggag   1020
gacacatacg gtatcgtgct gttatccggc gttaagtaca agaaaggcgg attggtcattc   1080
aacgagactg gactctactt tgtctactcg aagggtgact ttcgcggcca atcctgcaac   1140
aaccttccac tctctcaca ggtctacatg aggaactcca agtaccacaca ggacttgggtg   1200
atgatggagg gcaagatgat gagctactgc actaccggac agatgtgggc acgatcctcg   1260
taccttggtg cgtcttcaa cctgacatca gccgaccatc tgtacgtcaa cgtcagcgaa   1320
ctgtctctgg tcaacttcca ggaaagtcag acgttcttcg gtttgtataa gctcggcggg   1380
cctggctcga gtagcagcag ttcagcttgg agtcaccac agttcgagaa gtaataggcg   1440
cgccgctcta ga . . . . .                               1452

```

5 <210> 31  
 <211> 1650  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scTRAILwt  
 <400> 31

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

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

- <220>
- 10 <223> secuencia de nucleótidos; proteína de fusión scTRAILR2
- <400> 32

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

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido de fusión de cadena sencilla que comprende:
  - (i) un primer dominio de citoquinas de la familia de TNF soluble,
  - (ii) un primer enlazador peptídico,
  - 5 (iii) un segundo dominio de citoquinas de la familia TNF soluble,
  - (iv) un segundo enlazador peptídico, y
  - (v) un tercer dominio de citoquinas de la familia TNF soluble,

en donde el polipéptido de fusión es sustancialmente no-agregante, y en donde los dominios de citoquinas de la familia TNF (i), (iii) y (v) son dominios LIGHT humanos solubles, que comprenden una secuencia de aminoácidos que parte de los aminoácidos 93, 94 ó 95 de SEQ ID NO: 16.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el dominio LIGHT humano soluble comprende los aminoácidos 93-240, 94-240 ó 95-240 de SEQ ID NO: 16.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 ó 2, en donde los dominios solubles comprenden mutaciones que alteran las propiedades de unión de los dominios solubles.
- 15 4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde los segundo y tercer dominios LIGHT (iii) y (v) solubles comienzan entre los aminoácidos Pro94 y Ala 95 de SEQ ID NO: 16.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los primer y segundo enlazadores de péptidos tienen independientemente una longitud de 3-8 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos, y preferiblemente son enlazadores de glicina/serina, que comprenden opcionalmente un residuo asparagina que puede estar glicosilado.
- 20 6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que adicionalmente comprende un dominio de péptido señal N-terminal, que puede comprender un sitio de escisión de proteasa, y/o que adicionalmente comprende un elemento C-terminal que puede comprender y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación.
- 25 7. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que adicionalmente comprende en posición N-terminal y/o C-terminal un dominio adicional, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cadena sencilla tal como un dominio Fab o de fragmento Fc.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, preferiblemente en enlace operativo con una secuencia del control de la expresión.
- 30 9. Una célula aislada o un organismo no humano, transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde la célula es, p. ej., una célula procariota o una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, o más preferiblemente una célula humana.
10. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende, como agente activo, una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8
- 35 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en terapia.
12. Una composición de diagnóstico que comprende, como un agente activo, una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

Figura 1

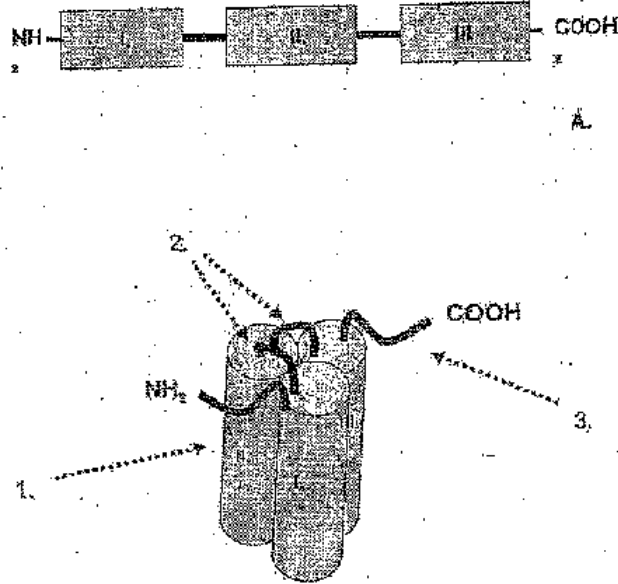


Figura 2

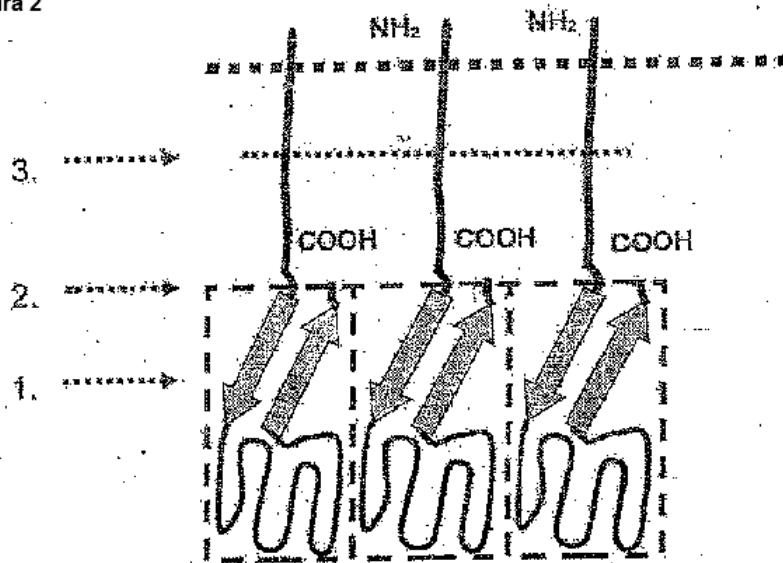




Figura 3

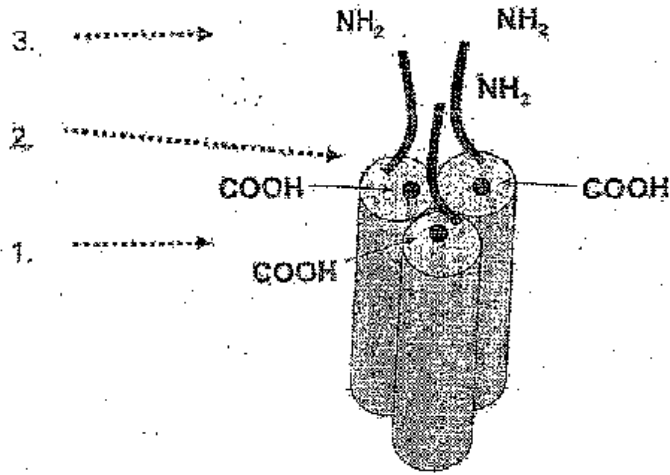


Figura 4

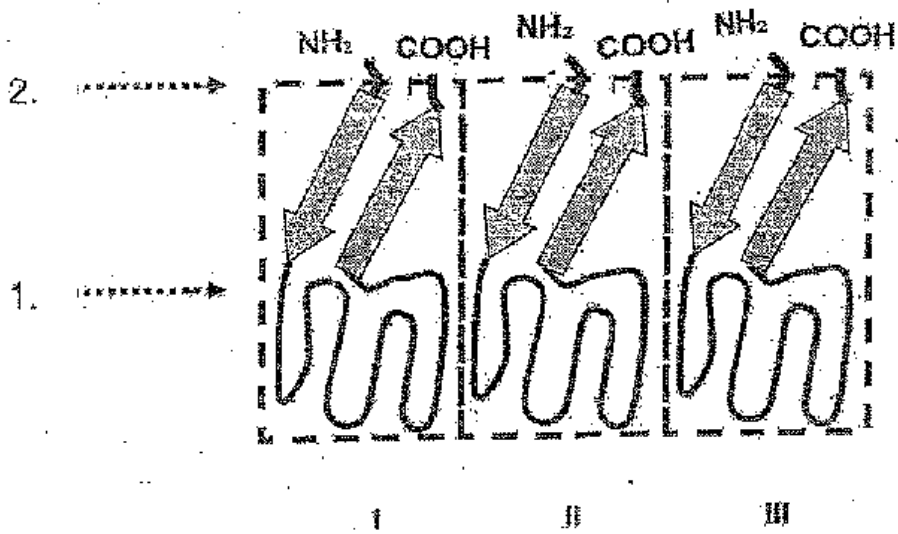


Figura 5

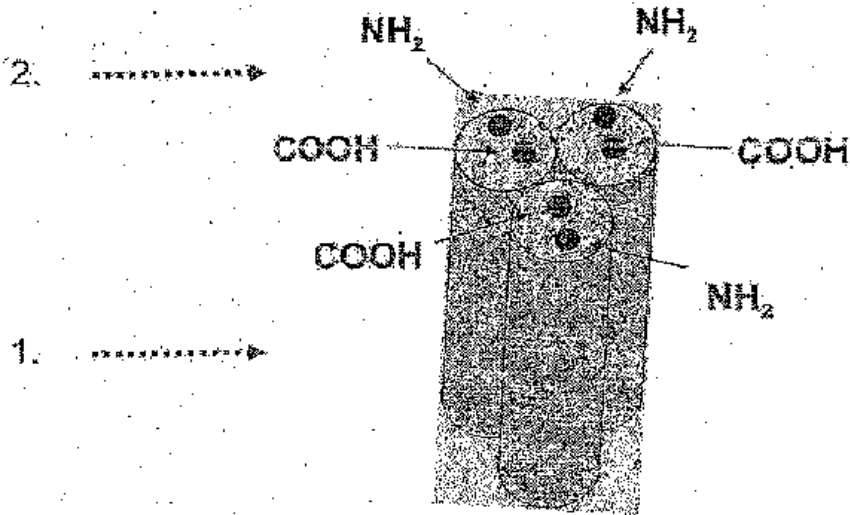


Figura 6

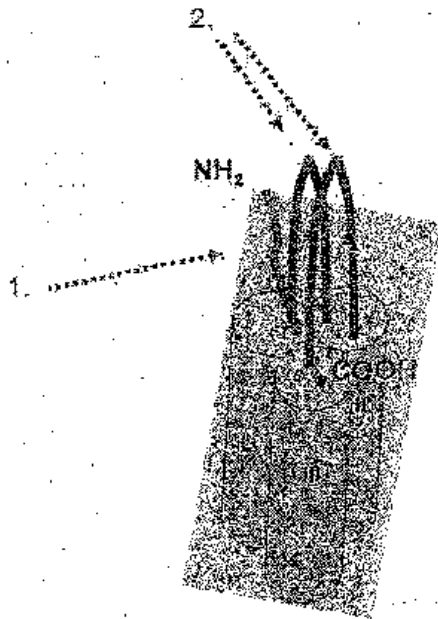


Figura 7

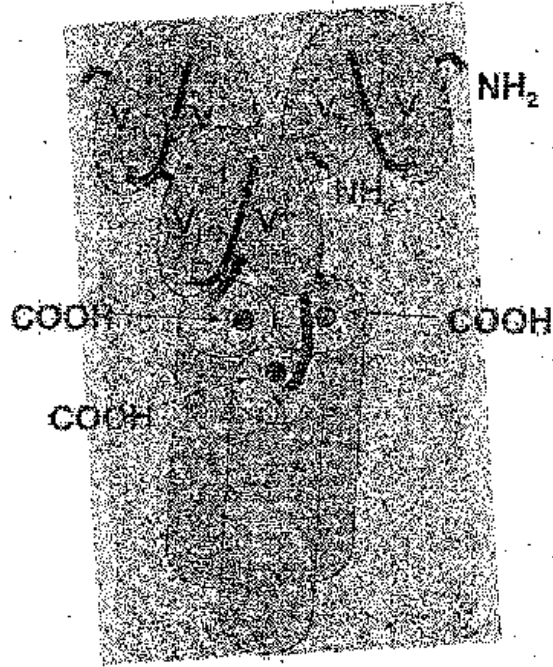


Figura 8

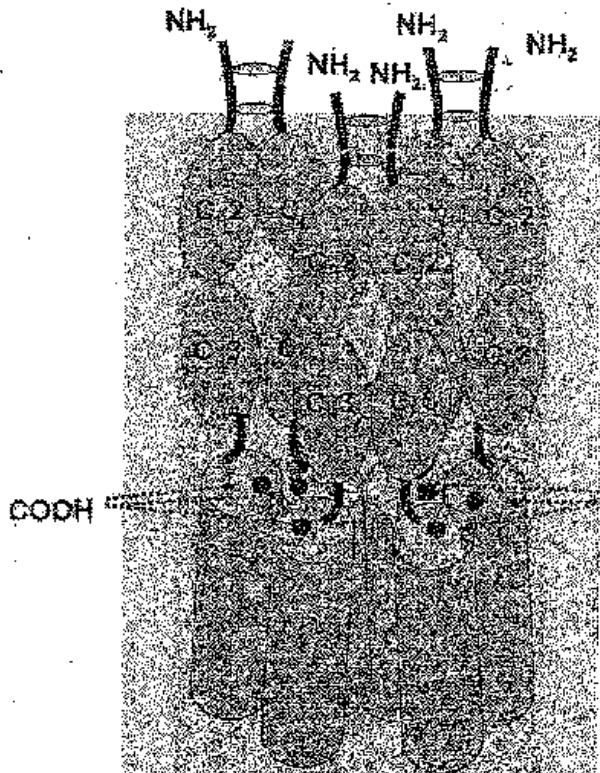


Figura 9

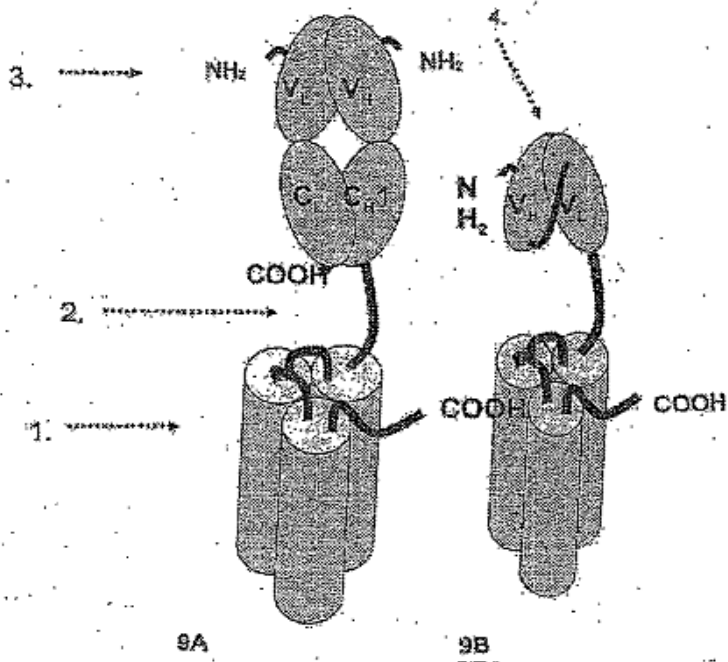


Figura 10

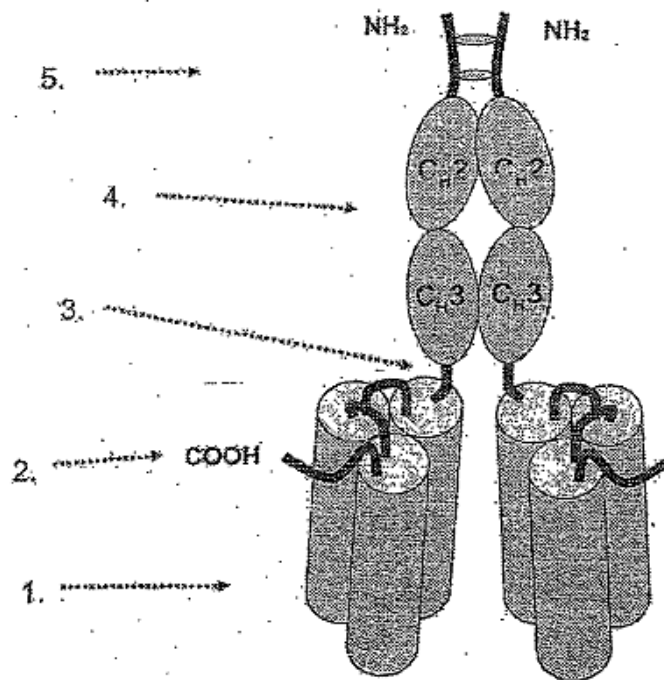


Figura 11

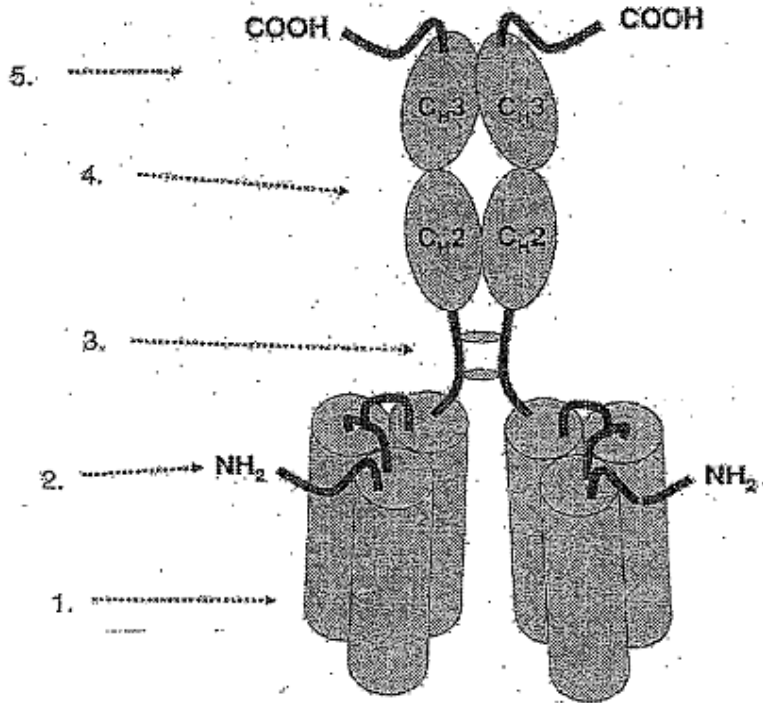


Figura 12

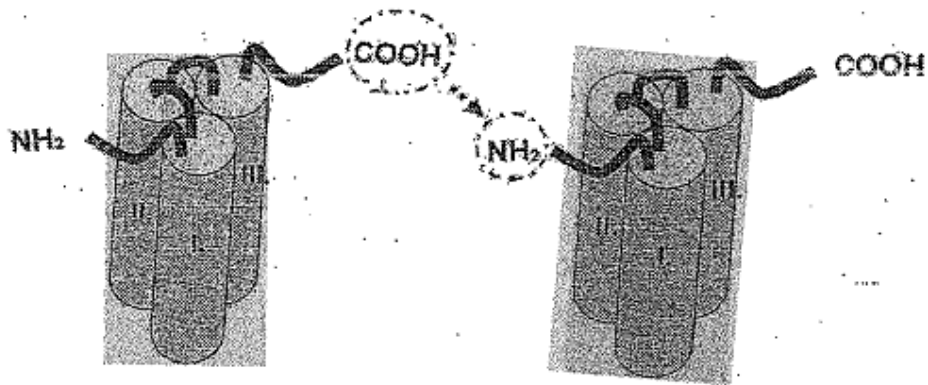


Figura 13

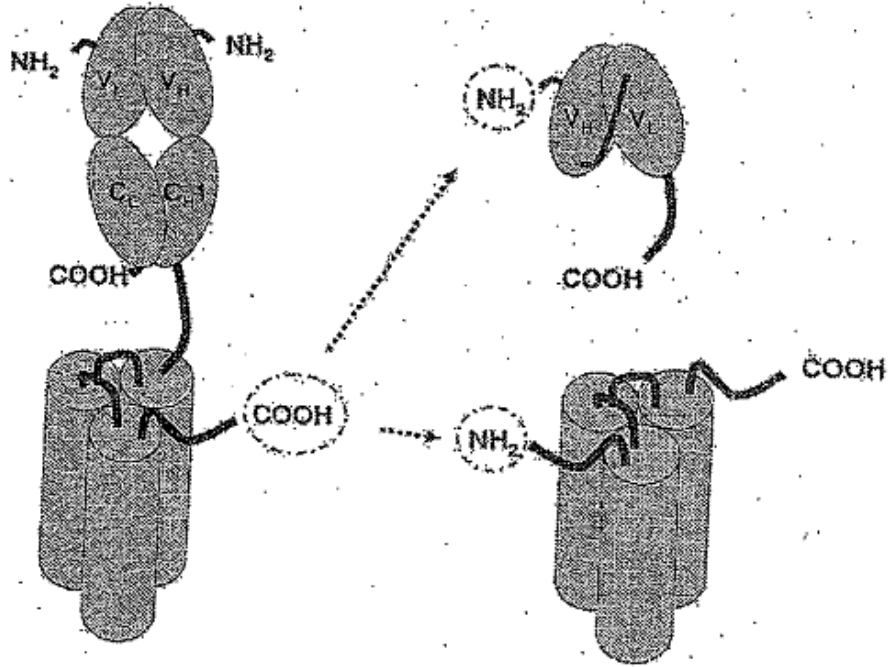


Figura 14

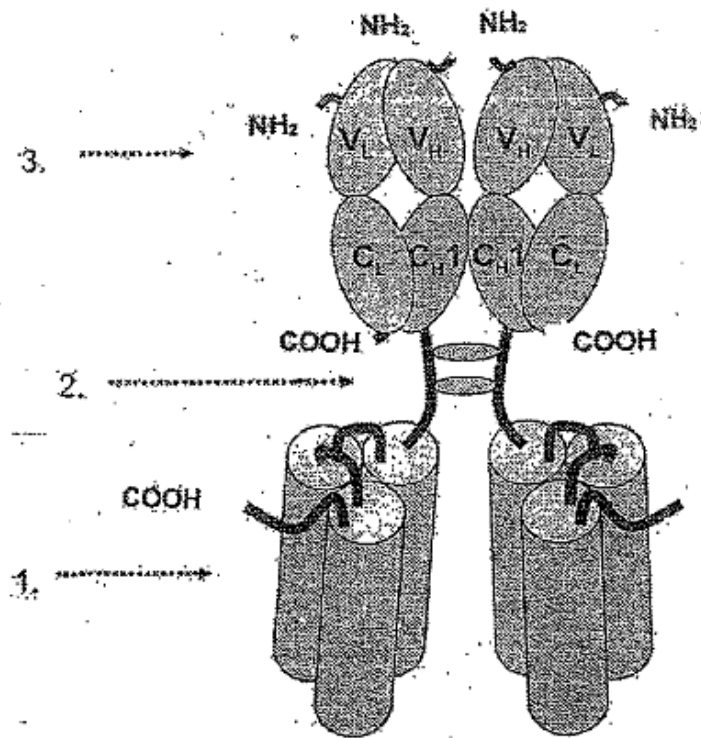


Figura 15

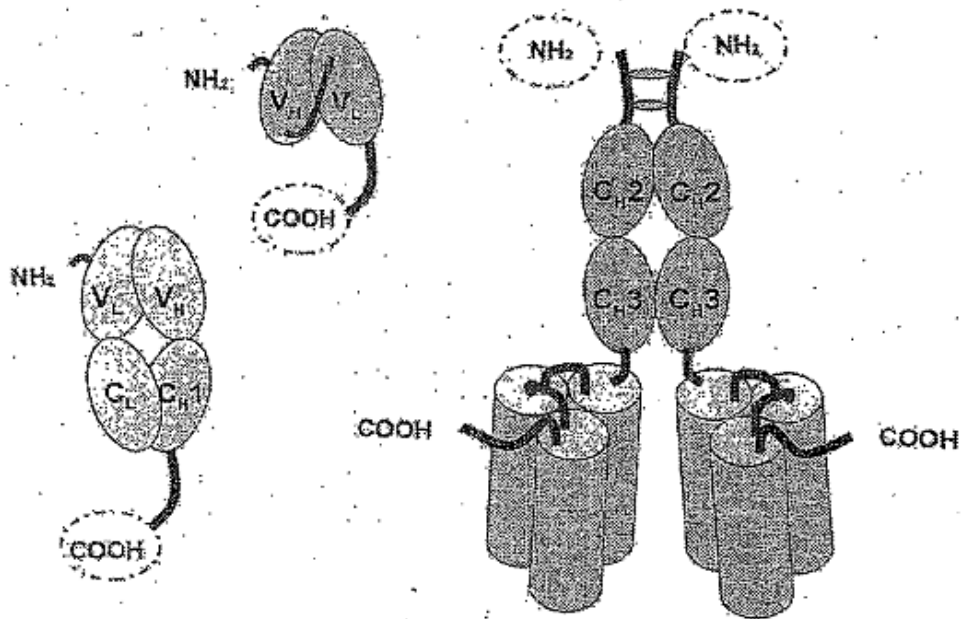


Figura 16

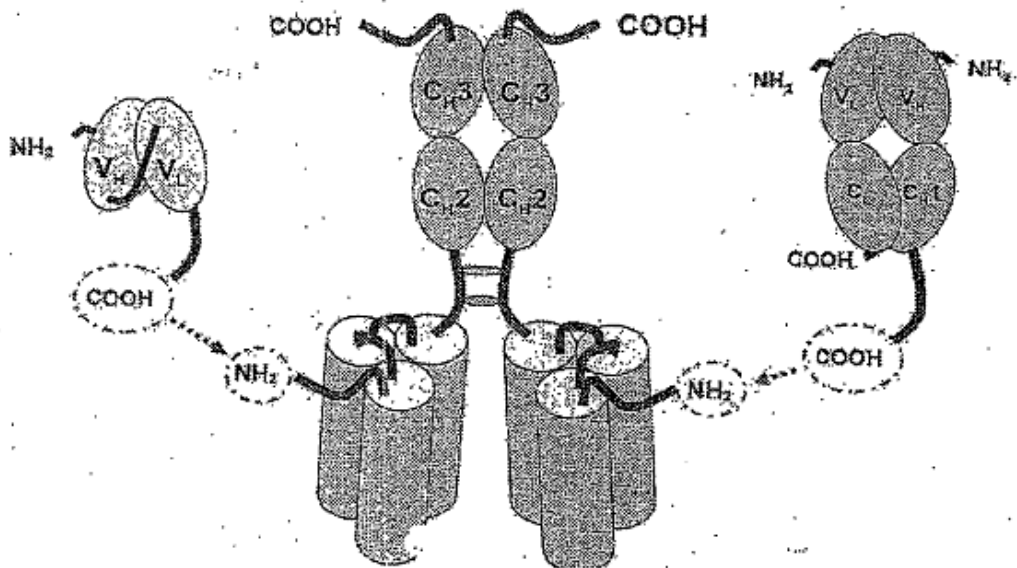
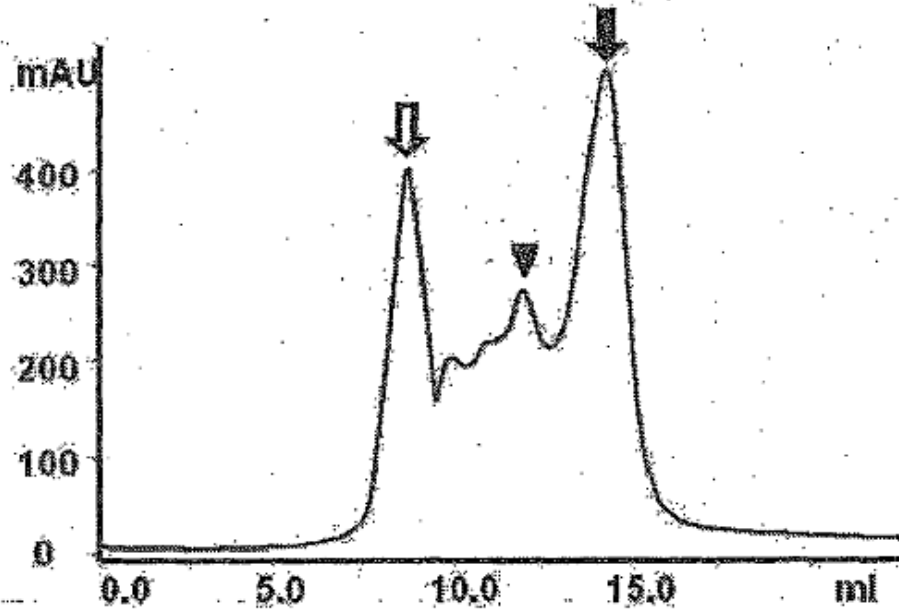


Figura 17

A. Agregación de proteína de TNF-SF



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

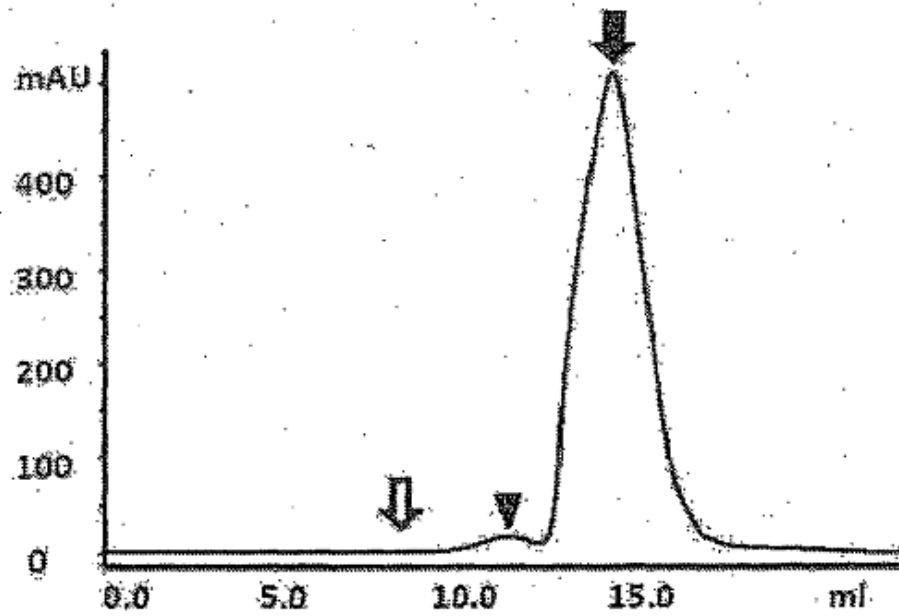




Figura 18

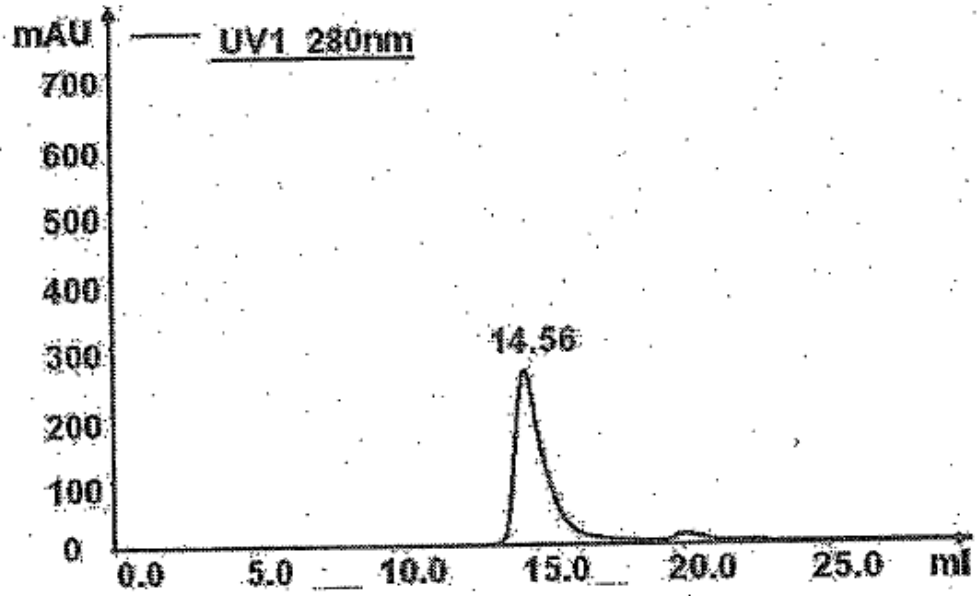


Figura 19

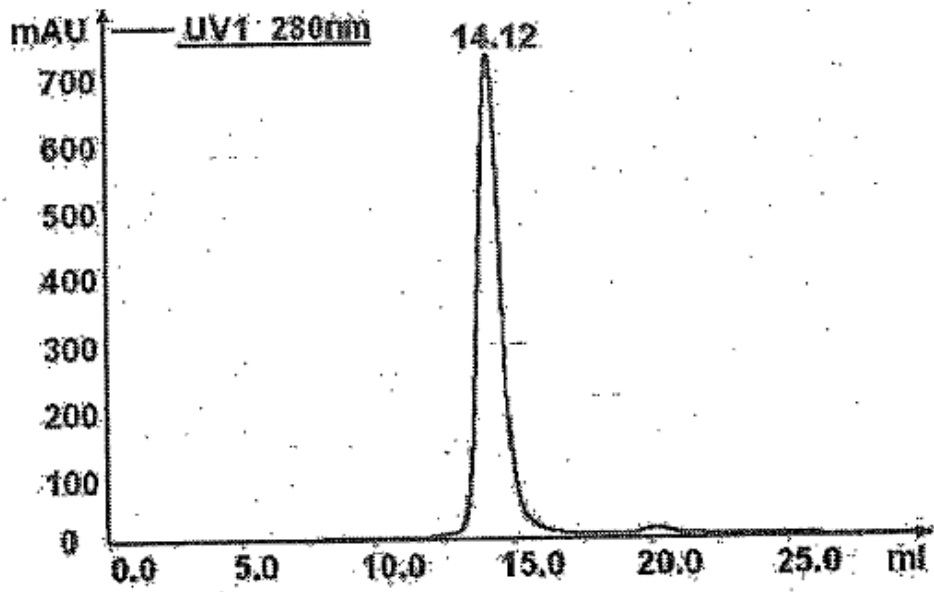


Figura 20

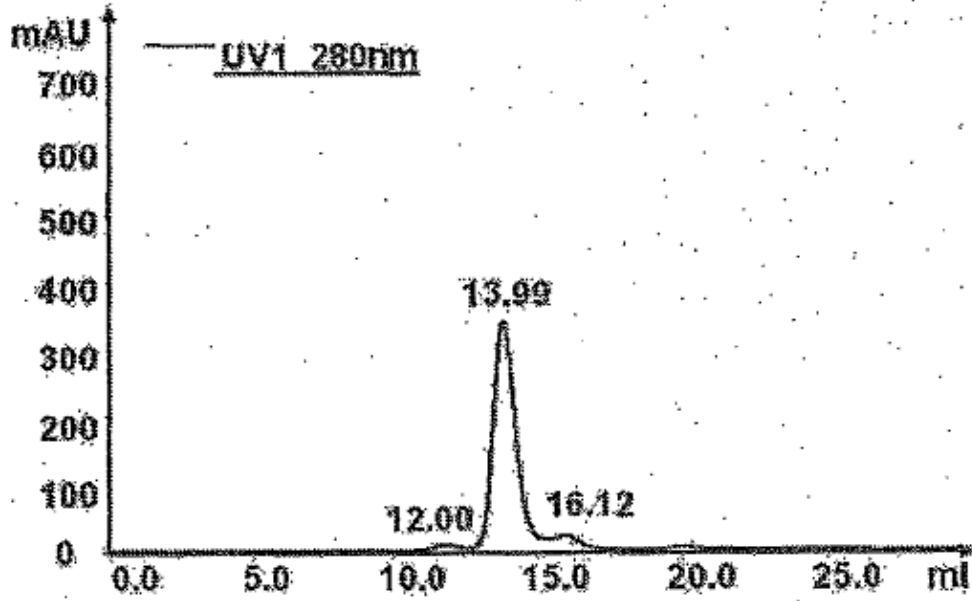


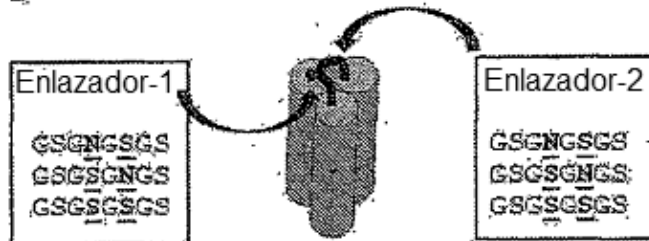
Figura 21

A

```

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

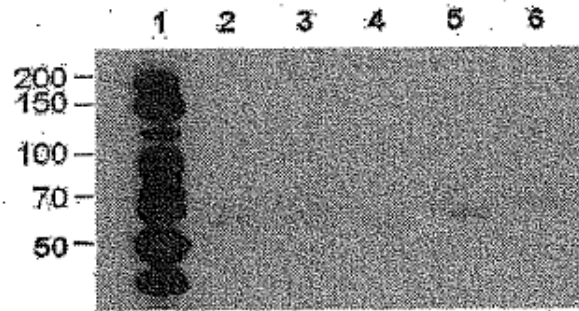
B



C

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

Figura 22



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

Figura 23

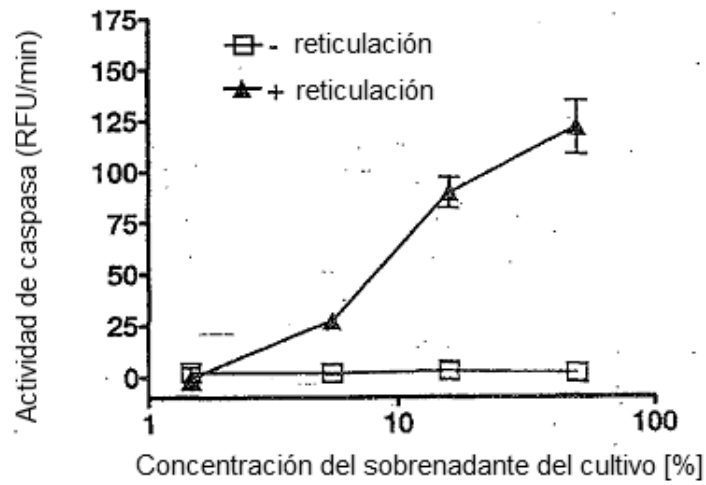


Figura 24

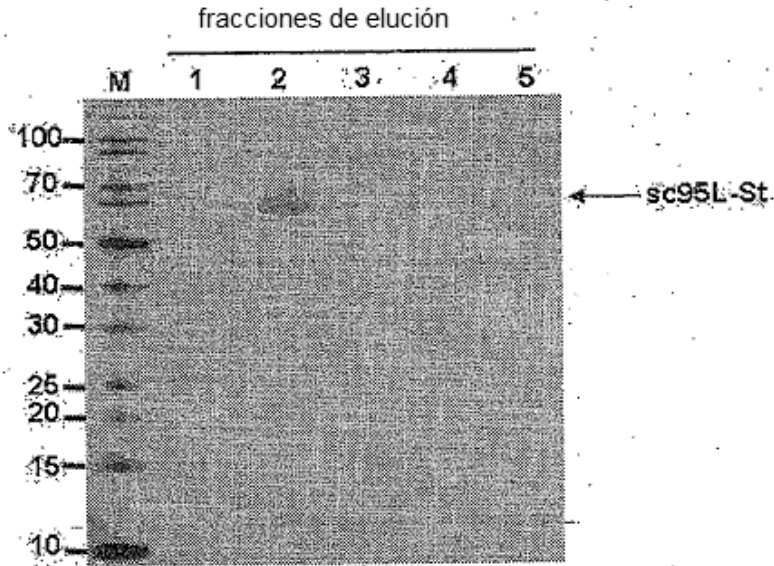


Figura 25

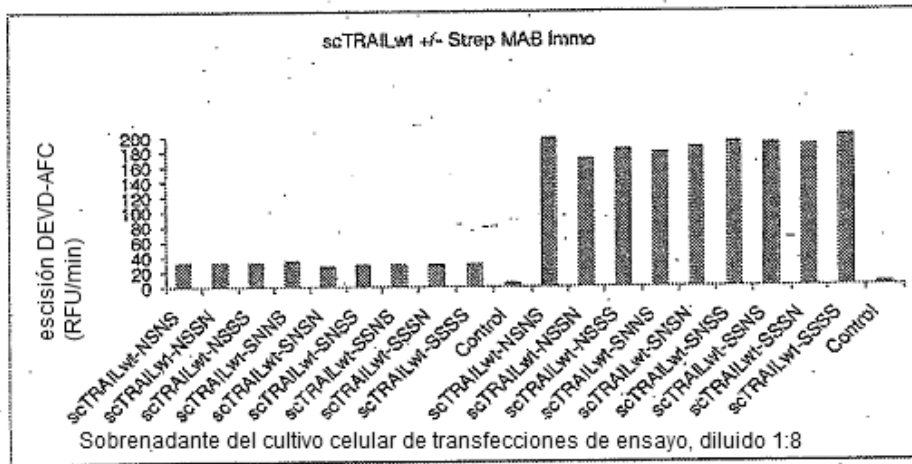


Figura 26

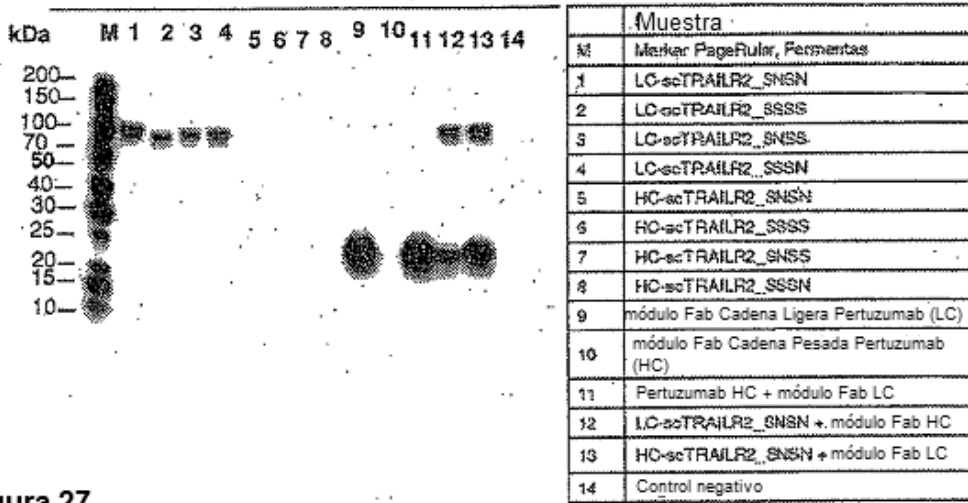


Figura 27

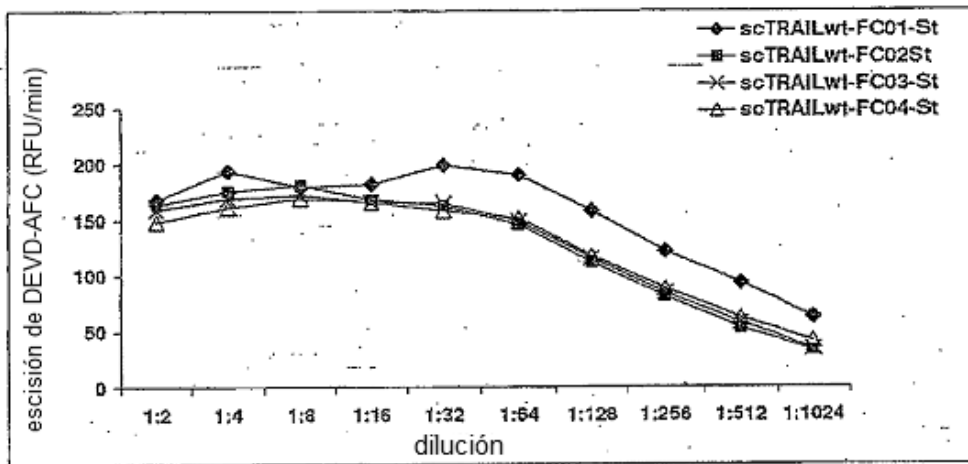


Figura 28

