

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 049**

51 Int. Cl.:

C07K 14/525 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2009 PCT/EP2009/050233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10078966**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2009 E 09778928 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2382236**

54 Título: **Proteínas de fusión que forman trímeros**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2016

73 Titular/es:
**APOGENIX AG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 584
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:
**HILL, OLIVER;
BRANSCHAEDEL, MARCUS;
GIEFFERS, CHRISTIAN y
THIEMANN, MEINOLF**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 593 049 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

Proteínas de fusión que forman trímeros

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden una región de cuello y dominio de reconocimiento de carbohidrato de un dominio de trimerización de colectina, un elemento enlazador y un polipéptido efector. Las proteínas de fusión son adecuadas como composición farmacéutica o para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o investigación como se describe en este documento.

Antecedentes

Se sabe que las proteínas colectina forman oligómeros estables. Las colectinas son uno de los 18 miembros del grupo que componen la superfamilia de proteínas lectina que contiene un plegamiento proteico estructural llamado dominio de lectina tipo C (Zelensky et al., FEBS Journal 2005, Vol. 272, pág. 6179-6217). Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos y las lectinas tipo C requieren calcio para la unión. Como el dominio de lectina tipo C está implicado en la unión a carbohidrato, este dominio también se llama el dominio de reconocimiento de carbohidrato (CRD). Las colectinas pertenecen a la inmunidad innata y entre otras funciones neutralizan los patógenos por unión a los carbohidratos, por ejemplo, presentes en virus y bacterias. Además, las colectinas regulan funciones inmunitarias tales como activación del complemento e influyen en la inflamación. Las características estructurales básicas de las colectinas son un dominio colagenoso y un dominio de lectina que son los componentes que dan el nombre de las colectinas. Algunos miembros han demostrado contener características estructurales adicionales, por tanto, contienen los siguientes componentes: i) un dominio de colágeno N-terminal conectado a ii) un segmento alfa-helicoidal que también se menciona como región de cuello y iii) el CRD en el extremo C-terminal (Figura 35). Las colectinas trimerizan de forma no covalente mediante el "colágeno triplehelicoidal", el "cuello superenrollado" y las regiones CRD. En seres humanos, el grupo colectina contiene una o más proteínas séricas de unión a manosa, colectinas del hígado, riñones, placenta y pulmón. Se conocen cuatro colectinas pulmonares, incluyendo la proteína tensioactiva pulmonar-A y -D (SP-A y SP-D) que contienen cisteínas N-terminales que están implicadas en la oligomerización mediada por disulfuro de trímeros pre-formados. Por ejemplo, SP-D forma tetrámeros de trímeros y SP-A forma hexámeros de trímeros (Kishore et al., Mol. Immunol. 2006, Vol. 43, 1293-1315).

En el intento por proporcionar complejos triméricos de citoquinas de la superfamilia de TNF se han sugerido proteínas de fusión recombinantes que comprenden una citoquina TNF y un componente de multimerización como un posible enfoque (por ejemplo, el documento WO 0149866). Las construcciones descritas, sin embargo, mostraban dominios de trimerización con un gran peso molecular y con propiedades ineficaces de trimerización.

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

Shiraishi et al. (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) describen que el dominio de unión al receptor de CD95L puede estabilizarse por motivos α -helicoides superenrollados (cremallera de leucina) artificiales posicionados de forma N-terminal. Se descubrió, sin embargo, que la orientación de las cadenas polipeptídicas entre sí, por ejemplo, orientación paralela o anti-paralela, apenas puede predecirse. Además, las cantidades óptimas de repeticiones hepta-d en el motivo de cremallera superenrollada son difíciles de determinar. Además, las estructuras superenrolladas tienen la tendencia a formar agregados macromoleculares después de alteración del pH y/o la fuerza iónica.

Mc Alinden et al. (J of Biol Chem, 2002, 277(43):41274-41281) describe la preparación de una proteína de fusión entre una secuencia de aminoácidos de procolágeno de tipo MA humano y una secuencia de 14 aminoácidos correspondiente a las dos primeras repeticiones hepta-d del dominio de cuello de la proteína tensioactiva (SP-D) de rata.

El documento WO 01/42298 describe la preparación de una proteína de fusión entre la proteína-D tensioactiva que comprende la secuencia señal, el dominio de colágeno y el dominio de cuello y CD40L. La desventaja de esas proteínas de fusión es que conducen a agregados multiméricos que son muy inmunogénicos y que no producen ligandos triméricos bioquímicamente definidos.

Evitar los problemas nombrados existentes en la técnica podría conseguirse usando dominios de trimerización de colectina como una herramienta para formar trímeros controlados. Se han realizado en la técnica intentos para esto. Sin embargo, solamente se ha usado la región de cuello superenrollado de los dominios de trimerización de colectina (CRD) en dichos intentos. La región de cuello de tipo superenrollado de SP-D puede usarse en sí misma como dominio de trimerización, fusionada N- o C-terminal a dominios proteicos como se describe en el documento

WO95/31540.

Sin embargo, si se usa únicamente la región de cuello superenrollado, la cantidad óptima de repeticiones hepta-d para conseguir un trímero estable (la longitud global) es difícil de determinar. La parte presentada de la región de cuello de SP-D no forma trímeros suficientemente estables por sí mismos y necesita optimizarse con respecto a su longitud o grado de repetición para generar proteínas de fusión triméricas establecidas. Además, las estructuras superenrolladas tienden a forma agregados macromoleculares después de la alteración del pH y/o la fuerza iónica. Por consiguiente, un haz α -helicoidal de la región de cuello de colectina existe solamente como una molécula trimérica en condiciones que imitan o se aproximan a las condiciones fisiológicas. Esto implica que las estrategias de purificación que emplean desplazamientos de pH y/o la alteración de la fuerza iónica podrían tener un efecto negativo sobre el estado trimérico de proteínas de fusión basadas únicamente en el cuello.

Además, se ha intentado la oligomerización de fragmentos de anticuerpo usando dominios de trimerización de colectina. Por ejemplo, se han investigado proteínas de fusión que comprenden un Fab anti-CD89 o un Fab anti-CD64 fusionado al fragmento SP-D humano recombinante (cuello+dominio CRD) y se ha descubierto que son eficaces en el direccionamiento de patógenos hacia neutrófilos. Las proteínas de fusión presentadas se habían generado por reticulación química produciendo una mezcla de productos proteicos con la necesidad de un régimen complejo de purificación para conseguir la especie de proteína deseada.

Para SP-D humana se ha descrito un mutante en que el aminoácido fenilalanina 335 (correspondiente al aminoácido 355 de la SEQ ID NO: 21) se ha mutado en alanina (SPD_F335A, Crouch et al., JBC 281: 18008-18014). Este mutante mostró unión muy débil a carbohidrato.

Para permitir un proceso de fabricación eficaz para proteínas de fusión basadas en Fab-SP-D, sería deseable un proceso que no necesite procedimientos laboriosos de purificación, pero permita una producción controlada de productos definidos en lugar de mezclas en bruto.

Los inventores descubrieron que las proteínas de fusión descritas en este documento superan los problemas presentes en la técnica y permiten una generación controlada de trímeros de diferentes polipéptidos efectores tales como citoquinas de las superfamilia de TNF o también de fragmentos de anticuerpo o anticuerpos de cadena sencilla. Un objetivo de la presente invención fue proporcionar proteínas de fusión formadoras de trímeros que permiten la fabricación recombinante y eficaz combinada con buenas propiedades de trimerización y propiedades farmacéuticas mejoradas.

Sumario de la invención

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

(i) un dominio de trimerización de la familia de colectina que comprende

- a. un dominio de reconocimiento de carbohidrato de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D; y
- b. una región de cuello de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D;

(ii) un elemento enlazador;

(iii) el polipéptido efector TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo respectivo, donde el polipéptido efector está localizado de forma N-terminal de la región de cuello de la familia de colectina, y

(iv) un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo de cadena sencilla, fusionado al extremo C-terminal del dominio de reconocimiento de carbohidrato.

El documento describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se describe en este documento y un trastorno proliferativo de células o un organismo no humano asociado con disfunción de citoquinas TNF que comprende tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas y rechazos de trasplante.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión como se describe en este documento. La proteína de fusión como se describe en este documento puede usarse para la preparación de una composición farmacéutica en el tratamiento de trastornos proliferativos asociados con disfunción de citoquinas TNF que comprenden tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas y rechazos de trasplante.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: SEC de CD95L-ASPD purificada por afinidad

Figura 2: Gel de plata de las fracciones SEC A1-A11 de CD95L-ASPD purificada por afinidad

Figura 3: Actividad caspasa en células Jurkat inducida por las fracciones SEC A1-A15 de CD95L-ASPD

- purificada por afinidad
- Figura 4:** Citotoxicidad de CD95L-ASPD sobre células WM35, HT1080 y HeLa
- Figura 5:** SEC de LIGHT-ASPD purificada por afinidad
- Figura 6:** Unión de HVEM-Fc a LIGHT-ASPD inmovilizada
- 5 **Figura 7:** Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones de TRAIL
- Figura 8:** Actividad caspasa en células Jurkat T
- Figura 9:** Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAIL-ASPD
- Figura 10:** Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD contra células cancerosas humanas
- 10 **Figura 11:** Actividad caspasa inducida por TRAIL-ASPD en Jurkat
- Figura 12:** Ensayo de citotoxicidad con TRAIL-ASPD o TRAIL-DSPD sobre células HT1080
- Figura 13:** Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones de TRAIL-SPD o construcciones de TRAIL-receptor selectivo SPD.
- Figura 14:** Ligandos selectivos del receptor de TRAIL (TRAILR1mut y TRAILR2mut) inmovilizados en placas de estreptactina, se detectan de forma diferencial por receptor 1 de TRAIL-Fc o receptor 2 de TRAIL-Fc
- 15 **Figura 15:** Unión de receptores de TRAIL a ligandos de "muteína" selectivos de ligando
- Figura 16:** Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad
- Figura 17:** SDS-PAGE teñido con plata de las secciones SEC A1-A14 de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad
- 20 **Figura 18:** Actividad caspasa de las fracciones SEC A1-A14 de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad sobre células Jurkat
- Figura 19:** Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad
- Figura 20:** SDS-PAGE teñido con plata de las fracciones SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad
- 25 **Figura 21:** Ensayo de eliminación de Jurkat de las fracciones SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad
- Figura 22:** Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD, TRAILR1mut-ASPD y TRAILR2mut-ASPD sobre células cancerosas humanas.
- Figura 23:** Proteínas TRAIL-SPD selectivas de receptor son muy solubles
- 30 **Figura 24:** SEC de TRAIL-ASPD_F335A purificada por afinidad
- Figura 25:** SDS-PAGE teñido con plata de las fracciones SEC A1-A13
- Figura 26:** Efecto citotóxico de TRAIL-ASPD_F335A sobre células cancerosas humanas
- Figura 27:** SEC de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad
- 35 **Figura 28:** SDS-PAGE teñido con plata de SEC de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad
- Figura 29:** Efecto citotóxico de TRAIL-SPD_F335D sobre células cancerosas humanas
- Figura 30:** Unión de proteína de fusión TRAIL-ASPD a carbohidratos
- Figura 31:** Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-ASPD (A) o TRAIL-ASPD_F335D (B)
- Figura 32:** Actividad caspasa en hepatocitos humanos primarios
- 40 **Figura 33:** Transferencia de Western de sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con construcciones APRIL trimerizadas
- Figura 34:** TACI-Fc se une a APRIL-ASPD
- Figura 35:** Dibujo esquemático de la organización de dominios de la colectina SP-D. Las regiones de colágeno y cuello trimerizan las colectinas y el extremo N-terminal oligomeriza adicionalmente los trímeros en tetrámero o hexámeros de trímeros. El CRD media la unión a carbohidratos y también está implicado en la trimerización.
- 45 **Figura 36:** Imagen esquemática que representa la estructura general de proteínas TNF-SF. "■ ■ ■" designa membrana celular; extremo N-terminal localizado dentro de la célula, 1. plegamiento β anti-paralelo del dominio de unión a receptor (RBD), 2. superficie de contacto de RBD y membrana celular, 3. Sitio de escisión de proteasa.
- 50 **Figura 37:** Imagen esquemática que representa la estructura del trímero TNF SF nativo. Las estructuras cilíndricas (1) representan RBD, extremos N-terminales (2) que forman el tronco y que conectan el RBD con la membrana celular.
- Figura 38:** Imagen esquemática que representa la modificación introducida para minimizar el TNF-SF-RBD. El tronco N-terminal está delecionado. 1. plegamiento β anti-paralelo del dominio de unión a receptor (RBD), 2. superficie de contacto de RBD y membrana celular.
- 55 **Figura 39:** Gel de plata de Sp-sc006-ASPD-St purificada por afinidad
- Figura 40:** Cromatografía por exclusión de tamaño de Sp-sc006-ASPD-St purificada por afinidad.

Descripción detallada de la invención

60 La proteína de fusión descrita en este documento puede ser una proteína monomérica o una proteína multimérica. Preferiblemente, la proteína de fusión está presente como un complejo trimérico que consiste en tres unidades monoméricas que pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, un complejo trimérico consiste en tres proteínas de fusión idénticas. En una realización preferida adicional, el complejo se forma por enlace covalente entre tres de las proteínas de fusión descritas en este documento, por ejemplo, un enlace covalente de puentes disulfuro entre cisteínas del dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento.

65

El complejo trimérico tal cual muestra actividad biológica. Se descubrió, sin embargo, que oligómeros del complejo trimérico, por ejemplo, complejos definidos donde la estructura trimérica básica está presente 2, 3 o 4 veces, también tienen actividad biológica. Por tanto, también se prefiere un oligómero del complejo trimérico.

5 La proteína de fusión comprende los siguientes elementos:
 (i) un dominio de trimerización de la familia de colectina que comprende

10 a. un dominio de reconocimiento de carbohidrato de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D; y
 b. una región de cuello de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D;

15 (ii) un elemento enlazador;
 (iii) el polipéptido efector TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo respectivo, donde el polipéptido efector está localizado de forma N-terminal de la región de cuello de la familia de colectina, y
 (iv) un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo de cadena sencilla, fusionado al extremo C-terminal del dominio de reconocimiento de carbohidrato.

20 Un dominio de trimerización de colectina como se usa en este documento se obtiene generalmente de la parte C-terminal de la proteína tensioactiva D. El dominio de trimerización como se usa en este documento comprende una región superenrollada (en ciertas realizaciones mencionada como región de cuello) y un dominio de reconocimiento de carbohidrato (mencionado en este documento también como CRD).

25 Los miembros de colectina y sus estructuras se resumen en, por ejemplo, Hakansson et al. (Protein Science, 2000, 9:1607-1617) y pueden comprender proteína tensioactiva D (ace. n.º: P35247), proteína tensioactiva A 1 (ace. n.º: Q8IWL2), proteína tensioactiva A 2 (ace. n.º: Q8IWL1), proteína C de unión a manano (n.º de acceso: P11226), colectina hepática 1 (ace. n.º: Q9Y6Z7), colectina placentaria 1 (ace. n.º: Q5KU26) o colectina-11 (ace. n.º: Q9BWP8). De acuerdo con la invención, tanto la región superenrollada (región de cuello) como el CRD son de la proteína tensioactiva D.

30 El dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de una especie diferente que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. Como alternativa, el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de la misma especie que la citoquina TRAIL o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. En una realización preferida, el dominio de colectina como se describe en este documento es de ser humano y la citoquina TRAIL o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento es de ser humano.

40 El CRD puede comprender un mutante, es decir, un mutante de la proteína tensioactiva D que no se une a manosa. Dichos mutantes pueden identificarse por métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, los métodos descritos en Crouch et al. (J Biol Chem, 2006, 281 (26):18008-18014). El dominio de trimerización de colectina (ii) puede comprender adicionalmente un mutante que comprende al menos una sustitución de aminoácido como se describe en este documento y puede generarse como se describe en este documento. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden modificar la unión del dominio de trimerización de colectina a su ligando manosa y conducir a una alteración de la tasa de eliminación de una proteína de fusión como se describe en este documento cuando se usa en terapia y/o como composición farmacéutica. La modificación puede provocar una unión disminuida o ausente a manosa y una baja tasa de eliminación. Dichas modificaciones pueden conseguirse por, por ejemplo, sustitución de aminoácido que afecta a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, particularmente por las sustituciones de aminoácidos F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K o F355R.

50 Es especialmente preferida la sustitución F355D. Como alternativa, la modificación puede provocar una unión aumentada a manosa y una alta tasa de eliminación. Dichas modificaciones pueden conseguirse por, por ejemplo, sustitución de aminoácido que afecta a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, particularmente por las sustituciones de aminoácidos F355L, F355Y o F355W.

55 Una región de cuello como se usa en este documento puede comprender una estructura superenrollada. El cuello puede estar localizado adyacente al CRD de colectinas o puede estar localizado, en ciertos casos, remoto del CRD.

60 De acuerdo con la invención, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello y el dominio de unión a carbohidrato (CRD) de la proteína tensioactiva D, particularmente los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21.

65 Un elemento enlazador flexible está localizado entre el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento y el polipéptido efector TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo. El elemento enlazador flexible preferiblemente tiene una longitud de 25 aminoácidos o menos. En ciertas realizaciones el elemento

enlazador tiene una longitud de 3-30 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 30 aminoácidos. En una realización, la longitud del elemento enlazador es de 5-25 aminoácidos, 8-20 aminoácidos o 10-20 aminoácidos. Más preferiblemente, la longitud del enlazador es de 9-15 aminoácidos. Generalmente el elemento enlazador usado en este documento puede estar compuesto de cualquier aminoácido conocido o de derivados artificiales de aminoácido. En ciertas realizaciones los elementos enlazadores se componen de aminoácidos no cargados pequeños e hidrófilos. Generalmente, el elemento enlazador de acuerdo con la invención puede comprender aminoácidos seleccionados de G, S, A y T. El elemento enlazador es preferiblemente un enlazador de glicina/serina, es decir, un enlazador peptídico que consiste sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. En una realización especialmente preferida, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos (GSS)a(SSG)b(GSG)c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Está claro para los expertos en la materia que en casos en que la citoquina TRAIL o un dominio de unión a receptor de la misma ya termina con una G, por ejemplo, TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) dicha G puede formar la primera G del enlazador en la secuencia enlazadora (GSS)a(SSG)b(GSG)c. Debe entenderse que, en principio, los elementos básicos para los elementos enlazadores pueden estar compuestos de 1, 2, 3, 4 o más aminoácidos de modo que los enlazadores útiles en este documento no están restringidos a enlazadores hechos de elementos básicos de 3 elementos. Generalmente, un elemento enlazador como se usa en este documento puede estar compuesto de elementos básicos o también de una secuencia de aminoácidos.

El polipéptido efector como se usa en este documento es TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo respectivo. TRAIL puede ser de cualquier origen y puede seleccionarse de, por ejemplo, polipéptidos de mamífero, polipéptidos de vertebrado, polipéptidos de insecto, polipéptidos bacterianos, polipéptidos vegetales, polipéptidos de levadura. Los polipéptidos de mamífero pueden comprender polipéptidos de ratón, rata, ser humano, caballo, cabra, perro, conejo, gato, oveja, hámster, burro, mono y otros polipéptidos. En ciertas realizaciones, los polipéptidos son polipéptidos humanos o polipéptidos humanizados.

Preferiblemente, TRAIL es una citoquina de mamífero, particularmente humana, o un dominio de unión a receptor de la misma incluyendo variantes alélicas y/o derivados de la misma, por ejemplo, o un dominio de unión a receptor de la misma. Los dominios de unión a receptor de diferentes proteínas se indican en la Tabla 1 (NH₂-aa a COOH-aa) y comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 59-205 o 60-205 de LTA (SEQ ID NO: 1), 86-233 de TNF α (SEQ ID NO: 2), 82-244 o 86-244 de LTB (SEQ ID NO: 3), 52-183 o 55-183 de OX40L (SEQ ID NO: 4), 112-261 o 117-261 de CD40L (SEQ ID NO: 5), 51-193 o 56-193 de CD27L (SEQ ID NO: 7), 97-234, 98-234 o 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 o 105-249 de TWEAK (SEQ ID NO: 12), 112-247 o 113-247 de APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), 112-250 o 113-250 de APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), 140-285 de BAFF (SEQ ID NO: 15), 91-240 de LIGHT (SEQ ID NO: 16), 91-251 o 93-251 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).

En una realización especialmente preferida, TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo comprende la parte extracelular de TRAIL incluyendo el dominio de unión a receptor sin dominios localizados en membrana.

En una realización preferida adicional, TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo de la proteína de fusión es TRAIL humano (SEQ ID NO: 10), particularmente los aminoácidos 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano. En otra realización preferida, TRAIL humano comprende cualquier aminoácido de 95-120 como aminoácido inicial - aminoácido 281 de la SEQ ID NO: 10.

En una realización preferida adicional de la invención, TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo de la proteína de fusión como se describe en este documento comprende un mutante de TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo que se une a y/o activa el receptor 1 de TRAIL (TRAILR1) y/o receptor 2 de TRAIL (TRAILR2). La unión y/o actividad del mutante puede determinarse, por ejemplo, por los ensayos descritos en este documento, por ejemplo, en los Ejemplos o por los ensayos descritos 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).

El mutante puede generarse por cualquier técnica y se sabe por los expertos en la materia, por ejemplo, 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) que cualquiera puede comprender cualquier tipo de mutaciones estructurales, por ejemplo, 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 TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento. En una realización preferida, la sustitución puede afectar a al menos uno de los aminoácidos de TRAIL humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 10). Las sustituciones preferidas a este respecto afectan a al menos 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, Las sustituciones preferidas de aminoácidos de TRAIL humano de la 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.

La sustitución o sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, por ejemplo, TRAIL

humano, a o sobre cualquiera de TRAILR1 o TRAILR2. Como alternativa, la sustitución o sustituciones de aminoácidos pueden afectar a la unión y/o actividad de TRAIL, por ejemplo, TRAIL humano, a o sobre ambos, TRAILR1 y TRAILR2. La unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 puede verse afectada de forma positiva, es decir, unión más fuerte, más selectiva o específica y/o más activación del receptor. Como alternativa, la unión y/o actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 puede verse afectada de forma negativa, es decir, unión más débil, menos selectiva o específica y/o activación menor o ausente del receptor.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustituciones de aminoácidos que afectan a la unión y/o actividad de TRAILR1 y TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las dos siguientes sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 Y213W y S215D o la siguiente sustitución única de aminoácido Y189A.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustituciones de aminoácidos que afectan a la unión y/o actividad de TRAILR1 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las cuatro siguientes sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 N199V, K201R, Y213W y S215D o las cinco siguientes sustituciones de aminoácidos Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D o en la Tabla 2 de Kelley et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las seis siguientes sustituciones de aminoácidos Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V, y K201R o Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R, y K201R.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con sustituciones de aminoácidos que afectan a la unión y/o actividad de TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) o en la Tabla 2 de Kelley et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las seis siguientes sustituciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L, y D267Q o en la Tabla 2 de van der Sloot et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con la siguiente sustitución única de aminoácido D269H, las dos siguientes sustituciones de aminoácidos D269H y E195R o D269H y T214R.

La citoquina TRAIL de la superfamilia de TNF usada como polipéptido efector en este documento puede estar truncada, en ciertas realizaciones, en el lado N-terminal. El truncamiento, como se usa a este respecto, se referirá a la omisión de todos los aminoácidos de la región de tronco, o a la omisión de parte de los aminoácidos de la región de tronco. Las proteínas de la superfamilia de TNF están ancladas a la membrana mediante una porción N-terminal de 15-30 aminoácidos, la llamada región de tronco. La región de tronco contribuye a la trimerización y proporciona una cierta distancia hasta la membrana celular. Sin embargo, la región de tronco no forma parte del dominio de unión a receptor (RBD).

De forma importante, el RBD se caracteriza por una localización particular de su isla de aminoácidos C-terminales. Dichos aminoácidos están inmediatamente adyacentes y están localizados centrales a los ejes de los trímeros. Los primeros aminoácidos N-terminales del RBD forman una hebra beta anti-paralela con los aminoácidos C-terminales del RBD (Fig. 36 y 38).

Por tanto, la hebra beta anti-paralela del RBD forma una superficie de contacto con la membrana celular, que está conectada a y anclada dentro de la membrana celular mediante los aminoácidos de la región de tronco.

En ciertas realizaciones de la invención, la región de tronco de la citoquina TRAIL de la superfamilia de TNF usada como polipéptido efector está omitida. Esto tiene la ventaja particular de que puede evitarse la impedancia estérica entre la región de tronco y el enlazador-colectina. De lo contrario, el enlazador que conecta el extremo C-terminal de uno del dominio RBD de TRAIL con el extremo N-terminal del dominio de colectina estaría impedido estéricamente por el tronco, lo que podría provocar la inestabilidad y/o formación de agregados. En ciertas realizaciones, el truncamiento de la citoquina TRAIL omitiendo la región de tronco del extremo N-terminal es un requisito previo para el posicionamiento C-terminal del dominio de trimerización de colectina.

En ciertas realizaciones, es muy preferido que la proteína de fusión trimérica basada en colectina comprenda un dominio de unión a receptor de la citoquina TRAIL que carezca de cualquier aminoácido de la región de tronco.

La capacidad del polipéptido de fusión de TRAIL trimérico basado en colectina, donde TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo respectivo está posicionado de forma N-terminal del dominio de trimerización de colectina, de formar una estructura trimérica ordenada que comprende al menos un sitio de unión funcional para el receptor respectivo de citoquina, está asociado, en ciertas realizaciones de la invención, de forma crucial con la omisión total o parcial de la región de tronco de TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo.

En la proteína de fusión de la invención como se describe en este documento, el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal del polipéptido efector TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo. Por tanto, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido efector como se describe en este documento y un dominio de trimerización de colectina que comprende un dominio de cuello de la familia de colectina y un dominio CRD de la familia de colectina, es decir, el dominio de cuello y el CRD de la proteína tensoactiva D como se describe en este documento, donde esos dominios están localizados de forma C-terminal del polipéptido

efector.

Las proteínas de fusión descritas en este documento comprenden el polipéptido efector de forma N-terminal al dominio de trimerización de colectina. Los inventores descubrieron que la formación controlada de trímeros puede lograrse solamente si se obedece esta orientación. Solamente las construcciones que tienen el polipéptido efector de forma N-terminal del dominio de trimerización de colectina conducen a trímeros estables controlados y son mínimamente propensos a formar agregados más grandes durante la manipulación y purificación. A partir de la estructura cristalina publicada (Shrive, A.K., et al., 2003, J. Mol. Biol. 331: 509-523) de la parte de cuello-CRD de la SP-D humana recombinante, puede obtenerse la posición relativa del aminoácido N- y C-terminal de cada monómero. Mientras los aminoácidos amino-terminales (A205[A225]<*>) del trímeros están expuestos al disolvente y localizados en proximidad directa al principio de la estructura superenrollada paralela, la cadena lateral de los aminoácidos C-terminales (F355[F375]<*>) del trímero están enterrados dentro del dominio CRD y posicionados en una simetría distante triangular entre sí. Los grupos COOH de F355[F375]<*> están formando un triángulo isósceles con aproximadamente 23 angstrom de longitud lateral. De forma importante, el núcleo proteico del trímero de cuello-CRD están dentro de este triángulo, por tanto, solamente el espacio radial al núcleo de cuello-CRD es accesible para los compañeros de fusión.

Puede concluirse que, por su posición relativa entre sí, los aminoácidos N-y C-terminales en la parte de cuello-CRD del trímero de SP-D no son equivalente con respecto a su uso como punto de unión para la construcción de proteínas de fusión.

Como desventaja en el caso de proteínas TNF-SF, una fusión C-terminal (esto significa fusionar el fragmento TRAIL hacia el aminoácido C-terminal del cuello-CRD; F355[F375]*) que comprende la región extracelular con la región de tronco provocaría un agregado molecular grande debido a la fuerza de trimerización del propio fragmento TRAIL. *Los números dados en [] se refieren a la SEQ ID NO: 21.

Por lo tanto, fusionar un dominio TRAIL con su tronco endógeno C-terminal a la construcción de cuello-CRD no provocaría un ensamblaje trimérico definido. Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la invención, se usan polipéptidos truncados del RBD de TRAIL (dominio de unión a receptor de TRAIL) que carecen de la región de tronco como polipéptidos efectores.

De acuerdo con la invención, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, concretamente el CRD y el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Las proteínas de fusión preferidas a este respecto son las SEQ ID NO: 26 o 27. La proteína de fusión anterior comprende adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)a(SSG)b(GSG)c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o mutante de TRAIL como se describe en este documento, por ejemplo, los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 43 (TRAIL de tipo silvestre), los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 47 (TRAILR1mut) o los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 48 (TRAILR2mut). Además, la proteína de fusión comprende un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello y el CRD de SP-D humana, por ejemplo, los aminoácidos 193-230 y 231-384 de la SEQ ID NO: 43, respectivamente, o un mutante de la misma como se describe en este documento, por ejemplo, los mutantes mostrados en la SEQ ID NO: 49 o 50. El polipéptido de fusión comprende tanto la región de cuello como el CRD de SP-D humana. La citoquina y el dominio de colectina se conectan mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

Las proteínas de fusión preferidas a este respecto comprenden (i) la SEQ ID NO: 43, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 43, (ii) la SEQ ID NO: 44, particularmente los aminoácidos 21-230 de la SEQ ID NO: 44, (iii) la SEQ ID NO: 47, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 47, (iv) la SEQ ID NO: 48, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 48, (v) la SEQ ID NO: 49, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 49 o (vi) la SEQ ID NO: 50 particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 50.

La proteína de fusión como se describe en este documento puede comprender adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, que permite el procesamiento, por ejemplo, secreción extracelular, en una célula hospedadora adecuada. Preferiblemente, el dominio de péptido señal N-terminal comprende un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, una peptidasa señal y por tanto puede retirarse después de o durante la expresión para obtener la proteína madura. En una realización preferida, el dominio de péptido señal N-terminal comprende la

secuencia SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.

Además, la proteína de fusión puede comprender un dominio de reconocimiento/purificación, por ejemplo, un dominio de marca estrep. y/o un dominio poli-His, que puede estar localizado en el extremo N-terminal o C-terminal.

La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un elemento flexible C-terminal, que tiene una longitud de, por ejemplo, 1-50, preferiblemente 10-30 aminoácidos que pueden incluir y/o conectar con un dominio de reconocimiento/purificación como se describe en este documento.

De acuerdo con la invención, la proteína de fusión comprende adicionalmente un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo de cadena sencilla fusionado al extremo C-terminal del CRD. Dicho anticuerpo puede servir, en ciertas realizaciones para, por ejemplo, dirigir la proteína de fusión a ciertas moléculas o sitios. Además, dichas construcciones pueden ofrecer una oportunidad de crear polipéptidos de fusión con al menos dos especificidades diferentes de antígeno.

Se describe adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se describe en este documento. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN, por ejemplo, una molécula de ADN bicatenario o monocatenario, o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión o un precursor de la misma, por ejemplo, una pro- o pre-proforma de la proteína de fusión que puede comprender una secuencia señal como se describe en este documento u otras partes heterólogas de aminoácidos para la secreción o purificación que están localizadas preferiblemente en el extremo N- y/o C-terminal de la proteína de fusión como se describe en este documento. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión donde las partes heterólogas de aminoácidos pueden ligarse al primero y/o segundo dominio mediante un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por Factor X3, trombina o proteasa de IgA.

La molécula de ácido nucleico puede unirse de forma funcional a una secuencia de control de la expresión, por ejemplo, una secuencia de control de la expresión que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar localizada en un vector, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago, un vector vírico, un vector de integración cromosómica, 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.

Pueden usarse diversos sistemas de vector de expresión/célula hospedadora para expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la presente invención. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, aunque sin limitación, células procariontas tales como bacterias, por ejemplo *E. coli*, células hospedadoras eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células vegetales o células animales, preferiblemente células de mamífero y, más preferiblemente, células humanas. La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión como se describe en este documento puede optimizarse en vista de su uso de codones para la expresión en células hospedadoras adecuadas, por ejemplo, *E. coli*, células de levadura, células vegetales, células de insecto, células animales, por ejemplo, células de mamífero o células humanas.

Se describe adicionalmente un organismo no humano, por ejemplo, ratón o rata, transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como se describe en este documento. Dichos organismos pueden comprender organismos knock-out, generados por métodos conocidos de transferencia genética incluyendo recombinación homóloga. Como alternativa, dichos organismos pueden comprender organismos transgénicos que comprenden varias copias de la molécula de ácido nucleico como se describe en este documento. La generación de organismos transgénicos es conocida en la técnica.

La proteína de fusión, así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejo triméricos, todos como se describe en este documento, pueden usarse para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o investigación. Para estas aplicaciones, se prefieren usar proteínas de fusión en que tanto el polipéptido efector como se describe en este documento como el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento son de la misma especie para minimizar los efectos inmunológicos, por ejemplo, de ser humano cuando se aplican dichas proteínas a seres humanos. Además, la fusión de un polipéptido efector como se describe en este documento a un dominio de trimerización de colectina de cuello y CRD como se describe en este documento, es decir, el dominio de cuello y CRD de la proteína tensioactiva D, puede conducir a baja eliminación. El uso de mutantes del dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede modificar la tasa de eliminación de la proteína de fusión de un modo como se describe en este documento.

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, así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejos triméricos, todos como se describe en este documento.

Al menos una proteína de fusión, así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejos triméricos, todos como se describe en este documento pueden usarse en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos

seleccionados de trastornos proliferativos asociados con disfunción de citoquinas TNF, tales como tumores, por ejemplo, tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, enfermedades reumatoideas y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazos de trasplante.

La proteína de fusión como se describe en este documento puede usarse en terapia de enfermedades, por ejemplo, como un medicamento o para la preparación de una composición farmacéutica en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, inflamatorias, infecciosas, degenerativas, genéticas, proliferativas y vasculares, y de afecciones cancerosas premalignas y malignas, cáncer y errores congénitos.

En ciertas realizaciones de la invención, las enfermedades degenerativas pueden comprender enfermedades degenerativas de diferentes tejidos u órganos tales como enfermedades neurodegenerativas, enfermedades degenerativas de huesos y el esqueleto, enfermedades degenerativas de la piel, del epitelio mucoso y pueden comprender, por ejemplo, osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Alzheimer y similares.

En una realización, las enfermedades proliferativas son tumores. Los tumores pueden comprender tumores de la cabeza y el cuello, tumores del tracto respiratorio, tumores del tracto anogenital, tumores del tracto gastrointestinal, tumores del sistema urinario, tumores del sistema reproductor, tumores del sistema endocrino, tumores del sistema nervioso central y periférico, tumores de la piel y sus apéndices, tumores de los tejidos blandos y huesos, tumores del sistema linfopoyético y hematopoyético, etc. Los tumores pueden comprender, por ejemplo, neoplasias tales como tumores benignos y malignos, carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas o displasias. En una realización particular, el tumor es, por ejemplo, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer del tracto respiratorio, cáncer del tracto anogenital, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de la piel y sus apéndices, cáncer del sistema nervioso central y periférico, cáncer del sistema urinario, cáncer del sistema reproductor, cáncer del sistema endocrino, cáncer de los tejidos blandos y huesos, cáncer del sistema hematopoyético y linfopoyético.

La composición puede administrarse como monoterapia o como terapia de combinación con medicamentos adicionales, por ejemplo, agentes citostáticos o quimioterapéuticos, corticosteroides y/o antibióticos. Preferiblemente, la composición se administra junto con agentes sensibilizantes y/o inductores de apoptosis selectiva de tumor, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2.8.

La proteína de fusión se administra a un sujeto que lo necesita, particularmente un paciente humano, en una dosis suficiente para el tratamiento de las afecciones específicas por medios adecuados. Por ejemplo, la proteína de fusión puede formularse como una composición farmacéutica junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La eficacia terapéutica y toxicidad puede determinarse de acuerdo con protocolos convencionales. La composición farmacéutica puede administrarse de forma sistémica, por ejemplo, por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa o local, por ejemplo, por vía intranasal, subcutánea o intratecal. Se prefiere administración intravenosa.

La dosis de la proteína de fusión administrada dependerá, por supuesto, del sujeto a tratarse, del peso del sujeto, el tipo y gravedad de la enfermedad, el modo de administración y el criterio del médico a cargo. Para la administración de proteínas de fusión, es adecuada una dosis diaria de 0,001 a 100 mg/kg.

Referencias

1. Locksley RM, Killeen N y Lenardo MJ (2001) *Cell* 104: 487-501
2. Bodmer JL, Schneider P y Tschopp J (2002) *Trends Biochem. Sci.* 27: 19-26
3. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M., Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K y Scheurich P (1995) *Cell* 83: 793-802
4. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A y Tschopp J (1998) *J. Exp. Med.* 187: 1205-1213
5. Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, Bartke T, Gerlach E, Schonherr U, Peters N, Scheurich P y Pfizenmaier K (2001) *Oncogene* 20: 4101 - 4106
6. Haswell LE, Glennie MJ y Al-Shamkhani A (2001) *Eur. J. Immunol.* 31: 3094-31008
7. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, Tinel A, Deperthes D, Calderara S, Schulthess T, Engel J, Schneider P y Tschopp J (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23: 1428-1440
8. Stone GW, Barzee S, Snarsky V, Kee K, Spina CA, Yu XF y Kornbluth RS (2006) *J. Virol.* 80: 1762-177216
9. Mundle SD y Raza A (2002) *Trends Immunol.* 23: 187-194
10. Siegel RM, Muppidi JR, Sarker M, Lobito A, Jen M, Martin D, Straus SE y Lenardo MJ (2004) *J. Cell Biol.* 167: 735-744
11. Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K y Wajant H (2005) *J. Cell Biol.* 168: 1087-1098

Estructura básica de una proteína de fusión

A continuación, se muestra la estructura básica de las proteínas recombinantes descritas en este documento ejemplificada para las citoquinas de la superfamilia de TNF como se describe en este documento.

Como estructura básica la proteína de fusión comprende los siguientes elementos:

(i) un dominio de trimerización de la familia de colectina que comprende

- a. un dominio de reconocimiento de carbohidrato de la familia de colectina; y
- b. una región de cuello de la familia de colectina;

(ii) un elemento enlazador; y

(iii) un polipéptido efector, donde el polipéptido efector está localizado de forma N-terminal de la región de cuello de la familia de colectina.

El tema de la invención es solamente esas proteínas de fusión definidas en las reivindicaciones.

1.1 Secuencias de los péptidos señal

MNFGFSLIFLVLVLKGVQC (SEQ ID NO: 23)
 METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 24)
 METDTLLLWVLLLWVPAGNG (SEQ ID NO: 25)

1.2 Marca-epítipo/sitio de procesamiento de enteroquinasa

DYKDDDDKD

1.3 Colectinas humanas

Proteína tensioactiva D (SEQ ID NO: 21)

1 MLLFLLSALV LLTQPLGYLE AEMKTYSHRT TPSACTLVMC SSVESGLPGR
 DGRDGGREGPR
 61 GEKGDPLPG AAGQAGMPGQ AGPVGPKGDN GSVGEPGPKG DTGPGPPGP
 PGVPGPAGRE
 121.GPLGKQGNIG PQGKPGKGE AGPKGEVGAP GMQGSAGARG LAGPKGERGV
 PGERGVPGNA
 181 GAAGSAGAMG PQGSPGARGP PGLKGDKGIP GDKGAKGESG LPDVASLRQQ
 VEALQGQVQH
 241 LQAAFSQYKK VELFPNGQSV GEKIFKTAGF VKPFTEAQLL CTQAGGQLAS
 PRSAAENAAL
 301 QQLWAKNEA AFLSMTDSKT EGKFTYPTGE SLVYSNWAPG EPNDDGGSED
 CVEIFTNGKW
 361 NDRACGEKRL VVCEF

Colectina-11 (SEQ ID NO: 22)

1 MRGNLALVGV LISLAFLLSLL PSGHPQAGD DACSVQILVP GLKGDAGEKG
 DKGAPGRPGR
 61 VGPTGEKGDGMD GDKGQKGSVG RHGKIGPIGS KGEKGDSDI GPPGPNGEPG
 LPCECSQLRK
 121 AIGEMDNQVS QLTSELKFIK NAVAGVRETE SKIYLLVKEE KRYADAQLSC
 QGRGGTLSMP
 181 KDEAANGLMA AYLAQAGLAR VFIGINDLEK EGAFVYSDHS PMRTFNKWR
 GEPNNAYDEE
 241 DCVEMVASGG WNDVACHTTM YFMCEFDKEN M

Son concebibles diversos fragmentos de las colectinas humanas proteína tensioactiva D y colectina 11 como dominios de trimerización como se describe en este documento.

1.4 Elemento enlazador flexible

(GSS)a(SSG)b(GSG)c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

1.5 Citoquina de la superfamilia de TNF/dominio de unión a receptor de la misma (véase también la Tabla 1)

- 5 SEQ-ID-01
 SEQ NP_000586_TNFSF1_LTA
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 CARACTERÍSTICAS
 ORIGEN
- 1 MTPPERLFLP RVCGTTLHLL LLGLLLVLPP GAQGLPGVGL TPSAAQTARQ
 HPKMHLAHST
 61 LKPA AHLIGD PSKQNSLLWR ANTDR AFLQD GFSLSNNSLL VPTSGIYFVY
 SQVVFSGKAY
 121 SPKATSSPLY LAHEVQLFSS QYPFHVPLLS SQKMVYPGLQ EPWLHSMYHG
 AAFQLTQGDQ
 10 181 LSTHTDGIPH LVLSPSTVFF GAFAL
- 15 SEQ-ID-02
 SEQ NP_000585_TNFSF2_TNFa
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN
- 1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL
 LHFGVIGPQR
 61 EEFPRDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN
 ALLANGVELR
 121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGC PSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL
 SAIKSPCQRE
 181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL
- 20 SEQ-ID-03
 SEQ NP_002332_TNFSF3_LTB
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN
- 1 MGALGLEGRG GRLQGRGSL L AVAGATSLV TLLLAVPITV LAVLALVPQD
 QGGLVTETAD
 61 PGAQAQQLG FQKLPEEEPE TDLSPQLPAA HLI GAPLKGQ GLGWETTKEQ
 AFLTSGTQFS
 121 DA EGLALPQD GLYLYCLV G YRGRAPPGGG DPQGRSVTLR SSLYRAGGAY
 GPGTPELLEL
 181 GAETVTPVLD PARRQGYGPL WYTSVGF GGL VQLRRGERVY VNI SHPDMVD
 FARGKTFFGA
 25 241 VMVG
- 30 SEQ-ID-04
 SEQ NP_003317_TNFSF4_OX40L
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN
- 1 MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLG LLLCF TYICLHFSAL
 QVSHRYPRIQ
 61 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKG YFS
 QEVNISLHYQ
 121 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL
 ILIHQNPGEF
 181 CVL
- 35 SEQ-ID-05
 SEQ NP_000065_TNFSF5_CD40L
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MIETYNQTSR RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRR
 DKIEDERNLH
 61 EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS
 FEMQKGDQNP
 121 QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVLENGKQ LTVKRQGLYY
 IYAQVTFCSN
 181 REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE
 LQPGASVFN
 241 VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L

SEQ-ID-06
 SEQ NP_000630_TNFSF6_CD95L
 5 PALABRA CLAVE PROTEINA
 ORIGEN

1 MQQPFNYPPY QIYVWDSSAS SPWAPPQTVL PCPTSVPRRP GQRRPPPPPP
 PPPLPPPPPP
 61 PPLPPLPLPP LKKRGNHSTG LCLLVMFFMV LVALVGLGLG MFQLFHLQKE
 LAELRESTSQ
 121 MHTASSLEKQ IGHPSPPPEK KELRKVAHLT GKSNRSRSMPL EWEDTYGIVL
 LSGVKYKGGG
 181 LVINETGLYF VYSKVYFRGQ SCNNLPLSHK VYMRNSKYPQ DLVMEGKMM
 SYCTTGQMWAA
 10 241 RSSYLGAVERN LTSADHLYVN VSELSLVNFE ESQTFFGLYK L

SEQ-ID-07
 SEQ NP_001243_TNFSF7_CD27L
 15 PALABRA CLAVE PROTEINA
 ORIGEN

1 MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQQLPL
 ESLGWDVAEL
 61 QLNHTGPOQD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV
 TLAICSSTTA
 121 SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN
 LTGTLLPSRN
 181 TDETFFGVQW VRP

SEQ-ID-08
 20 SEQ NP_001235_TNFSF8_CD30L
 PALABRA CLAVE PROTEINA
 ORIGEN

1 MDPGLQQALN GMAPPQDTAM HVPAGSVASH LGTTSRSYFY LTTATLALCL
 VFTVATIMVL
 61 VVQRTDSIPN SPDNVPLKGG NCSEDLLCIL KRAPFKKSWA YLQVAKHLNK
 TKLSWPKDGI
 121 LHGVRYQDGN LVIQFPGLYF IICQLQFLVQ CPNNSVDLKL ELLINKHIKK
 QALVTVCESG
 181 MQTKHVYQNL SQFLLDYLVQ NTTISVNVDT FQYIDTSTFP LENVLSIFLY SNSD

SEQ-ID-09
 30 SEQ NP_003802_TNFSF9_CD137L
 PALABRA CLAVE PROTEINA
 ORIGEN

1 MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA
 CPWAVSGARA
 61 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY
 SDPGLAGVSL
 121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL
 RSAAGAAALA
 181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ
 GATVGLGLFRV
 241 TPEIPAGLPS PRSE

SEQ-ID-10
 SEQ NP_003801_TNFSF10_TRAIL

PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MAMMEVQGGP SLGQTCVLIV IFTVLLQSLC VAVTYVYFTN ELKQMQDKYS
KSGIACFLKE
61 DDSYWDPNDE ESMNSPCWQV KWQLRQLVRK MILRTSEETI STVQEKQQNI
SPLVRERGPQ
121 RVAAHITGTR GRSNTLSSPN SKNEKALGRK INSWESSRSG HSFLSNLHLR
NGELVIHEKG
181 FYYIYSQTYF RFQEEIKENT KNDKQMVQYI YKYTSYPDPI LLMKSARNSC
WSKDAEYGLY
5 241 SIYQGGIFEL KENDRIFVSV TNEHLIDMDH EASFFGAFLV G

SEQ-ID-11
SEQ NP_003692_TNFSF11_a_RANKL
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

10 1 MRRASRDYTK YLRGSEEMGG GPGAPHEGPL HAPPPPAPHQ PPAASRSMFV
ALLGLGLGQV
61 VCSVALFFYF RAQMDPNRIS EDGTHCIYRI LRLHENADFQ DTTLESQDTK
LIPDSCRRIK
121 QAFQGAVQKE LQHIVGSQHI RAEKAMVDGS WDLAKRSKL EAQPFAHLTI
NATDIPSGSH
181 KVSLSWYHD RGWAKISNMT FSNGKLIVNQ DGFYLYANI CFRHHETSGD
LATEYLQLMV
241 YVTKTSIKIP SSHTLMKGG S TKYWSGNSEF HFYSINVGGF FKLRSGEIS
IEVSNPSLLD
301 PDQDATYFGA FKVRDID

15 SEQ-ID-12
SEQ NP_003800_TNFSF12_TWEAK
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MAARRSQRRR GRRGEPGTAL LVPLALGLGL ALACLGLLLA VVSLGSRASL
SAQEPAQEEEL
61 VAEEDQDPSE LNPQTEESQD PAPFLNRLVR PRRSAPKGRK TRARRAIAAH
YEVHPRPGQD
121 GAQAGVDGTV SGWEEARINS SSPLRYNRQI GEFIVTRAGL YYLYCQVHFD
EGKAVYLKLD
181 LLVDGVLALR CLEEFSATAA SSLGPQLRLC QVSGLLALRP GSSLRIRTLF
WAHLKAAPFL
20 241 TYFGLFQVH

25 SEQ-ID-13
SEQ NP_742085_TNFSF13_APRIL_ver1
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSVA LWLSWGAALG AVACAMALLT
QQTELQSLRR
61 EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK
QKKQHSVLHL
121 VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QYGVRIQDA GVYLLYSQVL
FQDVTFTMQ
181 VVSREGQGRQ ETLFRCIRSM PSHPDRAYNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP
RARAKLNLSP
241 HGTFLL

30 SEQ-ID-14
SEQ NP_003799_TNFSF13_APRIL_ver2
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSA LWLSWGAAALG AVACAMALLT
 QQTELQSLRR
 61 EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK
 QKKQHSVLHL
 121 VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GVYLLYSQVL
 FQDVTFTMGQ
 181 VVSREGQGRQ ETLFRCIRSM PSHPDRAVNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP
 RARAKLNLSP
 241 HGTFLGFVKL

5 SEQ-ID-15
 SEQ NP_006564_TNFSF13b_BAFF
 PALABRÁ CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MDDSTEREQS RLTSCLKKRE EMKLKECVSI LPRKESPSVR SSKDGKLLAA
 TLLLALLSCC
 61 LTVVSFYQVA ALQGDLASLR AELQGHHAEK LPAGAGAPKA GLEEAPAVTA
 GLKIFEPPAP
 121 GEGNSSQNSR NKRAVQGPEE TVTQDCLQLI ADSETPTIQK GSYTFVPWLL
 SFKRGSALEE
 181 KENKILVKET GYFFIYGQVL YTDKTYAMGH LIQRKKVHVF GDELSLVTLF
 RCIQNMPETL
 241 PNNSCYSAGI AKLEEGDELQ LAIPRENAQI SLDGDVTFFG ALKLL

10 SEQ-ID-16
 SEQ NP_003798_TNFSF14_LIGHT
 PALABRÁ CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLMGAG
 LAVQGWFLQ
 61 LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLIQERRSH EVNPA AHLTG ANSSLTSGGG
 PLLWETQLGL
 121 AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YIIYSKVQLG GVGCPGLAS TITHGLYKRT
 PRYPELELL
 181 VSQQSPCGRA TSSSRVWWD SFLGGVVHLE AGEKVVRVL DERLVRLRDG
 TRSYFGAFMV

15 SEQ-ID-17
 SEQ NP_005109_TNFSF15_TL1A
 PALABRÁ CLAVE PROTEÍNA
 20 ORIGEN

1 MAEDLGLSFG ETASVEMLPE HGSCRPKARS SSARWALTCC LVLLPFLAGL
 TTYLLVSQLR
 61 AQGEACVQFQ ALKGQEFAPS HQQVYAPLRA DGDK PRAHLT VVRQTPTQHF
 KNQFPALHWE
 121 HELGLAFTKN RMNYTNKFL IPESGDYFIY SQVTFRGMTS ECSEIRQAGR
 PNKPDSITVV
 181 ITKVTDSYPE PTQLLMGTKS VCEVGSNWFO PIYLGAMFSL QEGDKLMVNV
 SDISLVDYTK
 241 EDKTFFGAFL L

25 SEQ-ID-18
 SEQ NP_005083_TNFSF18_GITRL
 PALABRÁ CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MCLSHLENMP LSHSRTQGAQ RSSWKLWLFCS SIVMLLFLCS FSWLIFIFLQ
 LETAKEPCMA
 61 KFGPLPSKWQ MASSEPPCVN KVSDWKLEIL QNGLYLIYGO VAPNANYNDV
 APFEVRLYKN
 121 KDMIQTLTNK SKIQNVGGTY ELHVGDTIDL IFNSEHQVLK NNTYWGIIIL
 ANPQFIS

30 SEQ-ID-19
 SEQ NP_001390_EDA-A1
 PALABRÁ CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

```

1      MGYPEVERRE LLPAAAPRRER GSQGC GCGGA PARAGEGN SC LLFLGFFGLS
LALHLLTLCC
61     YLELRSELRR ERGAESRLGG SGTPGTSGTL SSLGGLDPDS PITSHLGQPS
PKQQPLEPGE
121    AALHSDSQDG HQMALLNFFF PDEKPYSEEE SRRVRRNKRS KSNEGADGPV
KNKKKGKKAG
181    PPGPNGPPGP PGPPGQGGP GIPGIPGIPG TTVMGPPGPP GPPGQGGPPG
LQGPSGAADK
241    AGTRENQPAV VHLQGGSAI QVKNDLSGGV LNDWSRITMN PKVFKLHPRS
GELEVLVDGT
301    YFIYSQVEVY YINFTDFASY EVVVEKPFLL QCTRSIETGK TNYNTCYTAG
VLLKARQKI
361    AVKMHADIS INMSKHTTFF GAIRLGEAPA S
    
```

5 SEQ-ID-20
 SEQ NP_001005609_EDA-A2
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

```

1      MGYPEVERRE LLPAAAPRRER GSQGC GCGGA PARAGEGN SC LLFLGFFGLS
LALHLLTLCC
61     YLELRSELRR ERGAESRLGG SGTPGTSGTL SSLGGLDPDS PITSHLGQPS
PKQQPLEPGE
121    AALHSDSQDG HQMALLNFFF PDEKPYSEEE SRRVRRNKRS KSNEGADGPV
KNKKKGKKAG
181    PPGPNGPPGP PGPPGQGGP GIPGIPGIPG TTVMGPPGPP GPPGQGGPPG
LQGPSGAADK
241    AGTRENQPAV VHLQGGSAI QVKNDLSGGV LNDWSRITMN PKVFKLHPRS
GELEVLVDGT
301    YFIYSQVYVI NFTDFASYEV VVDEKPFLLQ TRSIETGKTN YNTCYTAGVC
LLKARQKIAV
10    361    KMHADISIN MSKHTTFFGA IRLGEAPAS
    
```

Son concebibles diversos fragmentos, por ejemplo, dominios de unión a receptor, de citoquinas de la superfamilia de TNF como se describe en este documento.

15 1.6 Ejemplos de proteínas de fusión

SEQ ID NO: 26 SP-hsTrailsyn-SPD-Konstrukt-1_PRO.PRO
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

```

20    1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFSLNLHL RNGELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSA RNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSGLPDVAS LRQQVEALQG QVQHLQAAFS QYKKVELFPN GQSVGEKIFK
TAGFVKPFTE
241    AQLLCTQAGG QLASPRSAE NAALQQLVVA KNEAAFLSMT DSKTEGKFTY
PTGESLVYSN
301    WAPGEPND DG GSEDCVEIFT NGKWDRACG EKRLVVCEF
    
```

25 **SEQ ID NO: 27** SP-hsTrailsyn-SPD-Konstrukt-2_PRO.PRO
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

ES 2 593 049 T3

```

1      METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVA AH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61     SSRSGHSFSL NLHLRNGELV IHEKGFYIY S QTYFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121    YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181    GAFLVGSGLP DVASLRQQVE ALQGQVQHLQ AAFSQYKKVE LFPNGQSVGE
KIFKTAGFVK
241    PFTEAQLLCT QAGGQLASPR SAAENAALQQ LVVAKNEAAF LSMTDSKTEG
KFTYPTGESL
301    VYSNWAPGEP NDDGGSEDCV EIFTNGKWND RACGEKRLV CEF

```

SEQ ID NO: 28
ORIGEN

5

```

1      METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVA AH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61     SSRSGHSFSL NLHLRNGELV IHEKGFYIY S QTYFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121    YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181    GAFLVGSGLP DVASLRQQVE ALQGQVQHLQ AAFSQYKKVE LFPNG

```

SEQ ID NO: 29 SP-hsTrailsyn-coll-III-Konstrukt-1.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

10

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVA AHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL R NGELVIHEK GFYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSQLRKAIG EMDNQVSQLT SELKFIKNAV AGVRETESKI YLLVKEEKRY
ADAQLSCQGR
241    GGTLSMPKDE AANGLMAAYL AQAGLARVFI GINDLEKEGA FVYSDHSPMR
TFNKWRS GEP
301    NNAYDEEDCV EMVASGGWND VACHTTMYFM CEFDKENM

```

15

SEQ ID NO: 30 SP-hsTrailsyn-coll-11-Konstrukt-2.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVA AH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61     SSRSGHSFSL NLHLRNGELV IHEKGFYIY S QTYFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121    YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181    GAFLVGSQLR KAIGEMDNQV SOLTSELKFI KNAVAGVRET ESKIYLLVKE
EKRYADAQLS
241    CQGRGGLTSM PKDEAANGLM AAYLAQAGLA RVFIGINDLE KEGAFVYSDH
SPMRTFNKWR
301    SGEPNNAYDE EDCVEMVASG GWNDVACHTT MYFMCEFDKE NM

```

20

SEQ ID NO: 31 SP-hsTrailsyn-coll-11-Konstrukt-3.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

25

```

1      METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVA AH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61     SSRSGHSFSL NLHLRNGELV IHEKGFYIY S QTYFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121    YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181    GAFLVGSQLR KAIGEMDNQV SOLTSELKFI KNAVAGVRET ES

```

Ejemplos

1.1 Construcción de proteínas TNF-SF estabilizadas por un dominio de trimerización derivado de colectina posicionado C-terminal

Los motivos de trimerización (Tablas 2, y 3) derivados de colectina-11 humana (Col11), el "superenrollamiento" de colectina-11 (CC11), proteína tensioactiva D pulmonar humana (SP-D), el "superenrollamiento" de SP-D (CCSPD) se fusionaron de forma C-terminal al dominio de unión a receptor (RBD) de CD95L humano ("CD95L-RBD"; Glu142-Leu281), RBD de TRAIL humano (Gln120-Gly281), RBD de LIGHT humano (Glu91-Val240) y RBD de APRIL humano (Lys113-Leu250), respectivamente.

Tabla 2: Lista de las regiones usadas de secuencias de tipo silvestre (wt) para la construcción de motivos de trimerización.

Motivo de trimerización	Aminoácidos de las secuencias wt no procesadas usadas para la construcción del motivo	Entrada Swiss-Prot
SPD	220 - 375	P35247
SPD_F335A	220 - 375; Phe355 -> Ala355	P35247
SPD_F335D	220 - 375; Phe355 -> Asp355	P35247
CCSPD	220 - 257	P35247
Col11	117 - 271	Q9BWP8
CC11	116 - 151	Q9BWP8

Tabla 3: Explicación de motivos de trimerización C-terminales usados para generar proteínas de fusión TNFSF estables.

Motivo de trimerización	Explicación
SPD	proteína tensioactiva D humana ("cuello" superenrollado + dominio de reconocimiento de carbohidrato, CRD)
SPD_F335A	Como en 1, pero con la mutación Phe -> Ala en la posición 335 (numeración referida a SP-D de tipo silvestre procesada)
SPD_F335D	como en 1, pero con la mutación Phe -> Asp en la posición 335 (numeración referida a SP-D de tipo silvestre procesada)
CCSPD	"cuello" superenrollado de SP-D humana
Col11	colectina-11 humana ("cuello" superenrollado + CRD de colectina-11 humana)
CC11	"cuello" superenrollado de colectina-11 humana
T4	proteína Whisker de bacteriófago T4 (documento WO2008025516)
69	proteína Whisker de bacteriófago 69 (documento WO2008025516)

Entre el RBD de TNFSF y el dominio de trimerización, se colocó un elemento enlazador flexible con longitudes variables (Tabla 4):

Tabla 4: Nombres de enlazador y secuencias de aminoácidos (G = glicina; S = serina)

Nombre del enlazador	Secuencia de aminoácidos
A	GSS GSS GSS GS
B	GSS GSS GS
C	GSS GS
D	GS

1.2 Generación de construcciones de expresión

La molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión como se describe en este documento puede clonarse en un vector adecuado para expresar la proteína de fusión. Las herramientas moleculares necesarias para generar dicho vector son conocidas para los expertos en la materia y comprenden enzimas de restricción, vectores y hospedadores adecuados para propagar los vectores.

Para estrategias de purificación y analíticas, se añadió una marca estrep. II (secuencia de aminoácidos WSHPQFEK) de forma C-terminal. Esta marca de afinidad se ligó al dominio de trimerización mediante un elemento enlazador flexible (secuencia de aminoácidos PSSSSSA). Para permitir la expresión basada en secreción, los péptidos señal derivados de Igk humana se fusionaron a los extremos N-terminales de dichas proteínas. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión se retraducen y se optimiza su uso de codones para expresión basada en células de mamífero. La síntesis génica se hace por ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). Los casetes de expresión final se subclonaron en la estructura pCDNA4-HisMax, usando sitios únicos Hind-III y Not-I del plásmido. Todos los casetes de expresión se verificaron de forma rutinaria por secuenciación de ADN.

Los datos se presentarán en este documento para las siguientes construcciones (Tabla 5a y 5b):

Enlazador: Motivo	TRAIL (tipo silvestre)				Muteína de TRAIL (R1-específica)				Muteína de TRAIL (R2-específica)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
SPD	●	●	●	●	●	n.s.	n.s.	●	●	n.s.	n.s.	●
SPD F335A	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SPD F335D	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CCSPD	●	●	●	●	●	n.s.	n.s.	●	●	n.s.	n.s.	●
Col11	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CC11	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T4	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
69	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

5 Tabla 5a: Visión global de proteínas de fusión de TRAIL con datos mostrados. Los círculos rellenos indican que se presentan los datos. N.s., no mostrado.

	LIGHT	APRIL	CD95L
Enlazador:	A	A	A
Motivo			
SPD	●	●	●
CCSPD	●	●	n.s.
Col11	●	●	n.s.
69	●	●	n.s.

Tabla 1

10 5b: Visión global de construcciones de LIGHT, APRIL, y CD95L con datos mostrados. Los círculos rellenos indican que se presentan los datos. N.s., no mostrado.

1.3 Expresión y purificación de ligandos modificados por ingeniería de la superfamilia de TNF

15 Se transfectaron de forma transitoria células Hek 293T cultivadas en DMEM + GlutaMAX (GibCo) suplementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina con plásmidos que codificaban una proteína de fusión como se describe en este documento. Se recogió el sobrenadante de cultivo celular que contenía proteínas recombinantes tres días después de la transfección y se aclaró por centrifugación a 300 xg seguido de filtración a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Para la purificación por afinidad, se compactaron 4 ml de Sepharose de estreptactina al 50% (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) en una columna de 2 ml y se equilibró con 30 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS; Invitrogen Cat. 10010) o tampón W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 8,0). El sobrenadante de cultivo celular se aplicó a la columna a 4°C con un caudal de 2 ml/min. Posteriormente, la columna se lavó con PBS o tampón W y las proteínas unidas específicamente se eluyeron por etapas mediante la adición de 5 x 2 ml de tampón E (PBS o tampón W con Destiobiotina 2,5 mM, pH 7,4). El contenido de proteínas de las fracciones de eluato se analizó por espectroscopía de absorción y por SDS-PAGE teñido de plata. Las fracciones positivas se concentraron posteriormente por ultrafiltración (Sartorius, Vivaspin, 10.000 Da de punto de corte) y se analizaron adicionalmente por cromatografía por exclusión de tamaño (SEC).

20 Se realizó SEC en una columna Superdex 200 usando un sistema de cromatografía Äkta (GE-Healthcare). La columna se equilibró con PBS (Invitrogen Cat. 10010) y las proteínas concentradas, purificadas por estreptactina se cargaron en la columna de SEC a un caudal de 0,5 ml/min. La elución se controló por absorbancia a 280 nm. El peso molecular aparente de las proteínas purificadas se determinó basándose en la calibración de la columna Superdex 200 con proteínas patrón de filtración en gel (Bio-Rad GmbH, München, Alemania).

1.4 Ensayos de muerte celular

35 Para analizar la activación de caspasa, se usó un ensayo celular con la línea de células T humanas permanente Jurkat A3 (n.º cat. CRL2570, ATCC). Las células Jurkat se cultivaron en matraces con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) suplementado con FBS al 10% (Biochrom), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GibCo). Antes del ensayo, se sembraron 100.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La adición de diferentes soluciones que contenían la proteína con o sin un anticuerpo de entrecruzamiento a los pocillos (volumen final: 200 µl) estuvo seguida de a 3 horas de incubación a 37°C. Las

células se lisaron añadiendo 20 µl de tampón de lisis (HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 al 5%, DTT 100 mM, AEBBSF 10 mM, pH 7,5) y las placas se incubaron en hielo durante 30 minutos hasta 2 horas. La apoptosis se equiparó por una actividad aumentada de caspasas. Por tanto, se usó la escisión del sustrato de caspasa específico Ac-DEVD-AFC (Biomol) para determinar el grado de apoptosis. Para el ensayo de actividad caspasa, se transfirieron 20 µl de lisado celular a una placa negra de microtitulación de 96 pocillos. Después de la adición de 80 µl de tampón que contenía HEPES 50 mM, sacarosa al 1%, CHAPS al 0,1%, Ac-DEVD-AFC 50 µM y DTT 25 mM, pH 7,5, la placa se transfirió a un lector de placa de microtitulación Tecan Infinite F500 y se controló el aumento en la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación 400 nm, longitud de onda de emisión 505 nm).

Para la determinación de la muerte celular en células de fibrosarcoma HT1080, carcinoma de cuello del útero HeLa y melanoma WM35, se sembraron 15.000 células en placas de 96 pocillos durante una noche en medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) suplementado con FBS al 10% (Biochrom). Para células Colo205, se sembraron 50.000 células en placa durante una noche. Las células se estimularon el siguiente día con el ligando indicado y se incubaron durante 18 horas adicionales. Para células HeLa y HT1080, se usó cicloheximida (Sigma) a una concentración final de 2,5 µg/ml durante la estimulación con ligandos. La muerte celular de HT1080, HeLa y WM35 se cuantificó por tinción con tampón KV (violeta cristal al 0,5%, metanol al 20%). Después de la tinción, los pocillos se lavaron con agua y se secaron al aire. El colorante se eluyó con metanol y se midió la densidad óptica a 595 nm con un lector ELISA. La viabilidad de las células Colo205 se cuantificó por ensayo MTS (Promega).

1.5 Ensayo de citotoxicidad hepatocelular

Para determinar el efecto de las proteínas de fusión de TRAIL, se prepararon hepatocitos humanos primarios a partir de donantes sanos y se cultivaron en medio Williams E usando 25.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. En el día dos, se cambió el medio a DMEM-F12 suplementado con FCS al 10%, insulina humana, pen./estrep., medio esencial mínimo (MEM), piruvato sódico y Hepes 10 mM y se cultivó durante otro día. Las células se estimularon en el día tres con concentraciones variables de las proteínas indicadas en presencia o ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento (StrepMabImmo, IBA GmbH). Para evaluar el efecto hepatotóxico potencial de un cotratamiento de ligandos con agentes quimioterapéuticos, se coincubó TRAIL-ASPD_F335D a concentraciones variables junto con doxorubicina 5 mM o gemcitabina 5 mM. Las células se incubaron durante 5 o 24 horas a 37°C y CO₂ al 5% y después se lisaron para la determinación de la actividad caspasa como se describe en la sección de "ensayos de muerte celular".

1.6 ELISA de estreptactina

Para determinar la unión de receptores a ligandos construidos, se usaron microplacas de 96 pocillos recubiertos con estreptactina. Por lo tanto, se inmovilizaron sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria, suero de ratón o proteínas purificadas en placas de estreptactina (IBA GmbH) durante 1-3 horas en PBS. Las muestras se diluyeron en tampón de unión/bloqueo de ELISA (PBS, Tween-20 al 0,1%, SuperBlock T20-PBS al 20% (Pierce)). Las placas se lavaron con PBS + Tween-20 al 0,1% y se incubaron con anticuerpo de ratón anti-TRAIL (Pharmingen, clon RIK-2), receptor 1 de TRAIL-Fc (R&D Systems), receptor 2 de TRAIL-Fc (R&D Systems), TACI-Fc (R&D Systems) o HVEM-Fc (R&D Systems) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se detectaron las proteínas Fc con anticuerpos específicos anti-Fc humano o anti-Fc de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma). La reacción de color se hizo mediante la adición de 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics) y se determinó la absorbancia a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H₂SO₄ al 25% como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

1.7 Ensayo de unión a manano

Se incubaron placas ELISA (Nunc Maxisorp) durante una noche a 4°C con 10 µg/pocillo de manano de levadura (Sigma) en tampón de recubrimiento estéril (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,025%, pH 9,6). Las placas se incubaron primero durante una hora a temperatura ambiente con tampón BB (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5 mM, BSA al 0,1% y SuperBlock T20-PBS al 20% (Pierce)) y en segundo lugar durante 90 minutos adicionales con concentraciones variables de los ligandos indicados en tampón BB. Las placas se lavaron con tampón WB (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween-20 al 0,05%) y la detección se hizo usando estreptactina-HRP (IBA GmbH) en tampón BB. Las placas se lavaron y se revelaron con sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics). Se determinó la absorción a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H₂SO₄ al 25% como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

1.8 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD

A ratones CD1 macho (Charles River) se les inyectó por vía intravenosa 10 µg de proteína disuelta en 300 µl de PBS (Invitrogen). Se recogió sangre después de 0 min (predosis), 5 min, 30 min, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Para cada punto temporal, se recogieron dos muestras. Las muestras de sangre se procesaron para obtener suero y se almacenaron a -15°C. La concentración de proteínas de fusión de TRAIL se determinó usando un ELISA como se

describe a continuación (capítulo 1,9) y se calcularon las semividas (GraphPad Prism v4.0).

1.9 ELISA para la cuantificación de construcciones de TRAIL en sueros de ratón

5 Para cuantificar la concentración de proteínas TRAIL en sueros de ratón (originarios de los estudios de farmacocinética), se usó un método ELISA empleando microplacas de 96 pocillos.

Se recubrieron placas ELISA durante 1 h a 37°C con 2 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-TRAIL (clon RIK-2; Pharmingen). Después de lavar con PBS + Tween-20 al 0,1% y bloquear la placa durante 30 min a 37°C con StartingBlock™ (Pierce), se añadieron muestras de suero a una concentración del 0,2% y el 5%, muestras de calibración y muestras de control y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se prepararon muestras de calibración y de control a partir del lote respectivo de TRAIL (TRAIL-ASPD o TRAIL-ASPD-F335A o TRAIL-ASPD-F335D) y se suplementaron con suero de ratón CD1 combinado no tratado al 0,2% o al 5% para justificar los efectos potenciales de la matriz. Se añadieron muestras de control (concentración alta, media y baja de la construcción de TRAIL) como controles de calidad para asegurar la precisión y exactitud de la cuantificación de TRAIL en la ventana de ensayo dada. Las placas se lavaron de nuevo y se detectaron las construcciones de TRAIL que contenían la marca estrep. con estreptactina-POD diluido 1:1000 (IBA). Todas las muestras y proteínas se diluyeron con tampón ELISA (PBS, Tween-20 al 0,1%, StartingBlock al 5% (Pierce)). La reacción de color empezó después de la adición de 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics). Se determinó la absorbancia a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H2SO4 al 25% como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

2. Resultados

2.1 Caracterización de la proteína de fusión de CD95L (CD95L-ASPD)

De la CD95L-ASPD purificada por afinidad por estreptactina se cargaron 0,5 ml (0,86 mg de proteína) con un caudal de 0,5 ml/min en una columna Superdex200 usando PBS como tampón de ejecución. Se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican A1 a A11). El volumen de retención del pico principal a 11,92 ml correspondía a 170 kDa, determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que la proteína es un trímero compuesto de monómeros glucosilados. El peso molecular calculado del polipéptido monomérico es de 38 kDa. Se usó una alícuota de las fracciones A1 a A11 para SDS-PAGE y la actividad caspasa. Solamente el pico trimérico definido (fracciones A7 a A10) se usó para los análisis finales. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

35 Se usó una alícuota de la cromatografía por exclusión de tamaño de CD95L-ASPD purificada por afinidad para SDS-PAGE reductora seguida de tinción con plata. La banda detectada a aproximadamente 40-45 kDa (indicado por una flecha) correspondía a CD95L-ASPD. La especie trimérica estaba presente en las fracciones A7 a A10. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

40 Se incubaron células Jurkat con alícuotas a una dilución final de factor 8 de las fracciones A1 a A15 de SEC con CD95L-ASPD purificada por afinidad. Las células se lisaron después de 3 h de incubación y se determinó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico. Las fracciones correspondientes al pico trimérico (fracciones A7-A10) inducían actividad caspasa clara pero débil en Jurkat ya que se sabe que estas células requieren ligando extensivamente entrecruzado. La especie agregada e indefinida en las fracciones A1-A6 es, por lo tanto, un potente inductor de activación de caspasa (no usado adicionalmente). De forma importante, se recogió solamente la especie trimérica definida (A7 a A10) y se usó para los análisis finales. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

50 Las líneas celulares de cáncer humano HT1080 (A), HeLa (B) o WM35 (C) se incubaron con las concentraciones indicadas de CD95L-ASPD trimérica purificada en presencia o ausencia de anticuerpo de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti-marca estrep. II). Las células se incubaron durante 18 h y se analizó la citotoxicidad por tinción con violeta cristal. Como resultado, CD95L-ASPD inducía muerte celular en células de carcinoma de cuello del útero HeLa y de fibrosarcoma HT1080, pero no en células de melanoma WM35. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

55 La secuencia de aminoácidos de CD95L-ASPD se muestra a continuación.

SEQ ID 40 Sp-CD95L-ASPD

60 Cantidad total de aminoácidos: 346, PM=37682 ORIGEN

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG ELRKVAHLTG KNSRSMPLE WEDTYGIVLL
 SGVKYKKGGL
 61 VINETGLYFV YSKVYFRGQS CNNLPLSHKV YMRNSKYPQD LVMMEGKMMSS
 YCTTGQMWAR
 121 SSVVGVAVFNL TSADHLYVNV SELSLVNFEE SQTFFGLYKL GSSGSSGSSG
 SGLPDVASLR
 181 QQVEALQGQV QHLQAAFSQY KKVELFPNGQ SVGEKIFKTA GFVKPFTEAQ
 LLCTQAGGQL
 241 ASPRSAAENA ALQQLVVAKN EAAFLSMTDS KTEGKFTYPT GESLVYSNWA
 PGEPNDDGGS
 301 EDCVEIFTNG KWNDRACGEK RLVVCEFGGS PSSSSSSAWS HPQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
 21 - 160: Dominio de unión a receptor de CD95L
 5 161 - 171: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
 172 - 209: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
 210 - 327: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana
 328 - 338: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)
 339 - 346: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

10 **2.2 Caracterización de proteínas de fusión de LIGHT (LIGHT-ASPD)**

15 De la LIGHT-ASPD purificada por afinidad se cargaron 0,5 ml (1,56 mg) en una columna Superdex 200 y se resolvieron a 0,5 ml/min usando PBS como tampón de ejecución. El pico principal detectado a 11,96 ml correspondía a un tamaño de 170-180 kDa que indica que LIGHT-ASPD es un trímero compuesto de tres monómero glucosilados. El pico trimérico (fracciones A7 a A10) se recogió y se usó para análisis finales. El recuadro muestra la SDS-PAGE teñida con placa de dos lotes independientes purificados y triméricos de LIGHT-ASPD (denominados 0917 y 0918). Los resultados se muestran en Fig. 5.

20 Se usaron concentraciones variables (0 - 10 microgramos/ml) de LIGHT-ASPD trimérica purificada por afinidad y SEC, para inmovilizarse mediante la marca estrep. II en microplacas recubiertas con estreptactina. LIGHT-ASPD se detectó entonces en una configuración ELISA usando 100 ng/ml de proteínas de fusión con Fc de los receptores HVEM y receptor 1 de TRAIL, respectivamente. Mientras la señal ELISA aumentaba para HVEM-Fc con cantidades crecientes de ligando inmovilizado, no se detectaba señal para receptor 1 de TRAIL-Fc sobre el intervalo completo
 25 analizado. Esto indicó que LIGHT-ASPD es una molécula funcional que podría unirse a su receptor HVEM. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión LIGHT-ASPD se muestra a continuación:

30 **SEQ ID 41 Sp-LIGHT-ASPD**

Cantidad total de aminoácidos: 356, PM=37931 ORIGEN

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG EVNPA AHLTG ANSSLTGSGG PLLWETQLGL
 AFLRGLSYHD
 61 GALVVTKAGY YIISKVQLG GVCPLGLAS TITHGLYKRT PRYPEELELL
 VSQQSPCGRA
 121 TSSSRVWWS SFLGGVVHLE AGEVVVRVL DERLVRIRDG TRSYFGAFMV
 GSSGSSGSSG
 181 SGLPDVASLR QQVEALQGQV QHLQAAFSQY KKVELFPNGQ SVGEKIFKTA
 GFVKPFTEAQ
 241 LLCTQAGGQL ASPRSAAENA ALQQLVVAKN EAAFLSMTDS KTEGKFTYPT
 GESLVYSNWA
 301 PGEPNDDGGS EDCVEIFTNG KWNDRACGEK RLVVCEFGGS PSSSSSSAWS
 HPQFEK

35 1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
 21 - 170: Dominio de unión a receptor de LIGHT
 171 - 181: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
 182 - 219: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
 40 220 - 337: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana
 338 - 348: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)
 349 - 356: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

45 **2.3 Caracterización de proteínas de fusión de TRAIL**

Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con 24 vectores de expresión diferentes que codificaban proteínas de fusión de TRAIL (Tabla 6).

Tabla 6: Visión global de las proteínas de fusión producidas por transfección transitoria de vectores de expresión. El ligando TRAIL se transfectó como proteínas de fusión que comprenden uno de seis motivos de trimerización de estabilización y el elemento enlazador (enlazador A, B, C y D).

N.º	Ligando	Enlazador	Motivo de trimerización
1	TRAIL	A/B/C/D	69
2	TRAIL	A/B/C/D	T4
3	TRAIL	A/B/C/D	SPD
4	TRAIL	A/B/C/D	CCSPD
5	TRAIL	A/B/C/D	Col11
6	TRAIL	A/B/C/D	CC11

5 Se usaron los sobrenadantes para SDS-PAGE y las construcciones de TRAIL se detectaron por análisis de transferencia de Western empleando un anticuerpo específico para la marca estrep. II.

10 Las bandas específicas detectadas se indican por una flecha. La fuerza de expresión dependía del tipo del motivo de trimerización empleado para la construcción, (SPD> 69/T4/Colectina11/CCSPD/CC11) así como de la longitud del elemento enlazador (A>B>C>D). Los resultados se muestran en la Fig. 7.

15 Se incubaron células Jurkat durante tres horas en presencia (barras rellenas, anti-marca estrep. II) o ausencia (barras claras) de un anticuerpo de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti-marca estrep. II) con sobrenadantes de células HEK transfectadas de forma transitoria. Los sobrenadantes contenían proteínas de fusión de TRAIL con diferentes motivos de trimerización (T4, 69, SPD, CCSPD, Col11, CC11) fusionados a través de elementos enlazadores variados (enlazador A, B, C y D). Como control negativo, se usó el sobrenadante celular de células no transfectadas. Las células Jurkat se lisaron y analizaron para la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico.

20 Como resultado, la actividad caspasa disminuyó con el tipo de elemento enlazador empleado (A>B>C>D) y sobre el plegamiento empleado. Las construcciones de TRAIL que contienen colectina-11 o el superenrollamiento de colectina-11 (CCCol11) se expresan (mostrado por análisis de transferencia de Western), sin embargo, eran no funcionales, mientras que los motivos de plegamiento derivados de SPD producían ligandos TRAIL funcionales. Los resultados se muestran en la Fig. 8.

25 TRAIL-ASPD purificada por afinidad se sometió a SEC cargando 0,5 ml (0,4 mg de proteína) a una columna Superdex200 a 0,5 ml/min con PBS como tampón de ejecución. La elución de la proteína se controló por absorción a 280 nm y se recogieron fracciones de 0,5 ml. El volumen de retención de 12,28 ml corresponde a 135-140 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAIL-ASPD es un homotrímero, ya que el peso molecular calculado del polipéptido monomérico es de 40 kDa. D forma importante, para todas las proteínas de fusión analizadas por SEC que consisten en la secuencia de RBD de TRAIL de tipo silvestre, se observaba un pico adicional a aproximadamente 8 ml correspondiente a proteína de fusión de TRAIL agregada y no activa. De las fracciones recogidas A1-A14 solamente el pico trimérico (A8-A10) se usó para análisis adicionales. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

35 Las líneas celulares de cáncer humano HeLa, HT1080, Colo205 o WM35 se incubaron durante 18 horas con las concentraciones indicadas de TRAIL-ASPD trimérica purificada en presencia o ausencia de anticuerpo de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti-marca estrep. II). La muerte celular se cuantificó por tinción con violeta cristal (HeLa, WM35 y HT1080) o por ensayo MTS (Colo205). La elevación en la viabilidad de las células Colo205 a alta concentración de ligando se debe probablemente a la limitación del anticuerpo de entrecruzamiento. Los resultados se muestran en la Fig. 10.

40 Se usó una concentración variable (A) o a constante (B) de TRAIL-ASPD trimérica purificada por afinidad y SEC para su inmovilización en placas de 96 pocillos recubiertas con estreptactina. Las placas entonces se incubaron durante 5 h con 100.000 células Jurkat por pocillo a 37°C, CO2 al 5% y se determinó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico. Para analizar la especificidad, la placa (B) se incubó durante 30 minutos con las concentraciones variables indicadas de un anticuerpo antagonista anti-TRAIL (clon RIK-2, Pharmingen) antes de la adición de las células. Los resultados se muestran en la Fig. 11.

45 Se incubaron células HT1080 en la misma placa de 96 pocillos con TRAIL-ASPD o TRAIL-DSPD trimérica y purificada a las concentraciones indicadas. La muerte celular se cuantificó el siguiente día por tinción con violeta cristal. El uso del enlazador D redujo la bioactividad aproximadamente 4,5 veces, como se indica por los valores de CE50 de 27 ng/ml y 6 ng/ml para TRAIL-DSPD y TRAIL-ASPD, respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

55 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de polipéptidos de fusión de TRAIL se muestran a continuación.

SEQ ID 42: Casete de expresión de Sp-TRAIL-ASPD

Los sitios de restricción de endonucleasa están subrayados (HindIII, AAGCTT; BamHI, GGATCC; NotI, GCGGCCGC). El codón de inicio de la traducción está en negra.

5 ORIGEN

```

1      AAGCTTGCCG CCACCAATGGA GACCGATACA CTGCTCTTGT GGGTGCTCTT
GCTGTGGGTT
61     CCTGCAGGTA ATGGTCAAAG AGTCGCAGCT CACATCACTG GGACTAGAGG
CAGGAGTAAC
121    ACCCTGAGTT CTCCAATTC CAAGAACGAG AAAGCCCTGG GTAGGAAGAT
CAACTCCTGG
181    GAAAGCTCCA GAAGCGGCCA TAGCTTTCTT AGCAACCTCC ACTTGAGGAA
TGGCGAACTT
241    GTGATCCATG AGAAGGGCTT CTACTACATC TACAGCCAGA CGTACTTCAG
GTTCCAGGAG
301    GAAATCAAGG AGAACACCAA GAACGACAAG CAGATGGTGC AATACATCTA
CAAGTACACG
361    TCATACCCTG ATCCTATACT GCTGATGAAG TCCGCCAGAA ACAGTTGCTG
GAGCAAAGAC
421    GCTGAATACG GCCTGTATTC CATCTATCAG GGCGGTATCT TTGAACTCAA
GGAGAACGAC
481    AGGATCTTCG TGTCTGTGAC AAACGAGCAT CTGATCGACA TGGACCATGA
AGCGTCTTTC
541    TTCGGTGCCT TCTTGGTGGG ATCCTTGGT TCGAGTGGTT CGAGTGGTTC

TGGATTGCCA
601    GACGTTGCTT CTTTGAGACA ACAGGTTGAG GCTTTGCAGG GTCAAGTCCA
GCACTTGCAG
661    GCTGCTTTCT CTCAATACAA GAAGGTTGAG TTGTTCCCAA ACGGTCAATC
TGTTGGCGAA
721    AAGATTTTCA AGACTGCTGG TTTGTCAAA CCATTCACGG AGGCACAATT
ATTGTGTACT
781    CAGGCTGGTG GACAGTTGGC CTCTCCACGT TCTGCCGCTG AGAACGCCGC
CTTGCAACAG
841    TTGGTCGTAG CTAAGAACGA GGCTGCTTTC TTGAGCATGA CTGATTCCAA
GACAGAGGGC
901    AAGTTCACCT ACCCAACAGG AGAATCCTTG GTCTATTCTA ATTGGGCACC
TGGAGAGCCC
961    AACGATGATG GCGGCTCAGA GGACTGTGTG GAAATCTCA CCAATGGCAA
GTGGAATGAC
1021   AGAGCTTGTG GAGAGAAGCG TTTGGTGGTC TGTGAGTTCG GAGGCAGTCC
TTCATCTTCA
1081   TCTAGCTCTG CCTGGTCGCA TCCACAATTC GAGAAATAAT AGCGGCCGC

```

10

SEQ ID 43 Sp-TRAIL-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40404 ORIGEN

```

1      METDLLLLVW LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGQ VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDCVEIFTN GKWDRACGE KRLVVECFGG
SPSSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

15

- 1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
- 21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL
- 182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
- 193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
- 231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana
- 349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)
- 360 - 367: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

20

SEQ ID 44 Sp-TRAIL-ACCSPD

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27534
ORIGEN

5
1 METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61 GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121 ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181 *VGSSGSSGSS* *G*SGLPDVASL RQQVEALQGQ VQHLQAASFQ YKKVELFPNG
PSSSSSSAWS
241 HPQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL
10 182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
231 - 238: Elemento enlazador (PSSSSSSA)
239 - 246: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

15 **SEQ ID 45 Sp-TRAIL-ACol11**

Cantidad total de aminoácidos: 365, PM=40806
ORIGEN

1 METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61 GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121 ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181 *VGSSGSSGSS* *G*SQLRKAIGE MDNQVSQLTS ELKFIKNAVA GVRETESKIY
LLVKEEKRYA
241 DAQLSCQGRG GTLSMPKDEA ANGLMAAYLA QAGLARVFIG INDLEKEGAF
VYSDHSPMRT
301 FNKWRSGEPN NAYDEEDCVE MVASGGWNDV ACHTTMYFMC EFDKENMGSP
SSSSSSAWSH
20 361 PQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL
182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
25 193 - 224: Región superenrollada de "cuello" de colectina-11 humana
225 - 347: Dominio de lectina tipo C de colectina-11 humana
348 - 357: Elemento enlazador (GSPSSSSSA)
358 - 365: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

30 **SEQ ID 46 Sp-TRAIL-ACC11**

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27431
ORIGEN

1 METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61 GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121 ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181 *VGSSGSSGSS* *G*SGSQLRKAI GEMDNQVSQL TSELKFIKNA VAGVRETESG
PSSSSSSAWS
35 241 HPQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (subrayado)
21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL
182 - 193: Elemento enlazador flexible (enlazador A; *GSS GSS GSS GSG* cursiva)
40 194 - 229: Región superenrollada de "cuello" de colectina-11 humana

230 - 238: Elemento enlazador (GPSSSSSSA)
 239 - 246: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

2.4 Caracterización de proteínas de fusión de TRAIL selectivas de receptor ('muteína')

5 Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con plásmidos de expresión que codificaban diferentes construcciones de SPD selectivas del receptor de TRAIL:

N.º	Vector de expresión transfectado
1	TRAILR1mut-A-SPD
2	TRAILR1mut-A-CCSPD
3	TRAILR1mut-D-SPD
4	TRAILR1mut-D-CCSPD
5	TRAILR2mut-A-SPD
6	TRAILR2mut-A-CCSPD
7	TRAILR2mut-D-SPD
8	TRAILR2mut-D-CCSPD
9	TRAIL-A-SPD
10	TRAIL-A-CCSPD
11	TRAIL-D-SPD
12	TRAIL-D-CCSPD

10 Se recogieron los sobrenadantes tres días posteriores a la transfección y se usó una alícuota para SDS-PAGE y transferencia de Western empleando un anticuerpo específico para la marca estrep. II. Se detectaron bandas específicas a aproximadamente 38 kDa (proteínas de fusión de SPD) y 28 kDa (proteínas de fusión de superenrollamiento de SPD). La cantidad de proteína expresada dependía del propio ligando (TRAILR1muteína>TRAILR2muteína>TRAIL), en segundo lugar, de la longitud del enlazador usado (A>D) y en
 15 tercer lugar del motivo de trimerización usado (SPD>CCSPD). Los pesos moleculares aparentes fueron los esperados de los tamaños calculados (40 kDa y 27 kDa para proteínas de fusión de SPD y CCSPD, respectivamente). Los resultados se muestran en la Fig. 13.

20 La selectividad del receptor 1 de TRAIL o receptor 2 de TRAIL hacia proteínas de fusión de SPD/ccSPD y TRAIL, TRAILR1mut y TRAILR2mut se demostró por ELISA con estreptactina. Por lo tanto, se inmovilizaron proteínas de fusión TRAIL-SPD en sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria sobre microplacas recubiertas con estreptactina. El sobrenadante celular de células no transfectadas sirvió como control negativo. Los resultados se muestran en la Fig. 14. Se detectaron proteínas unidas específicamente con concentraciones constantes (A, B) o variables (C, D) de receptor 1 de TRAIL-Fc o receptor 2 de TRAIL-Fc. Como se muestra en (A),
 25 el ligando TRAILR1mut fusionado a variantes de SPD se detecta por el receptor 1 de TRAIL, mientras que el ligando TRAILR2mut no. Como se muestra en (B), el ligando TRAILR2mut se detecta preferentemente por el receptor 2 de TRAIL, mientras que las construcciones de TRAILR1mut y de TRAIL de tipo silvestre se detectan igual de bien. Como se muestra en C, el receptor 1 de TRAIL-Fc se unía a TRAIL-R1mut-ASPD y TRAIL-ASPD igual de bien sobre el intervalo complejo de titulación del receptor, mientras que TRAIL-R2mut-ASPD no se detecta. Como se muestra
 30 en D, el receptor 2 de TRAIL-Fc se unía a TRAIL-R2mut-ASPD y TRAIL-ASPD igual de bien sobre el intervalo completo de titulación del receptor analizado, mientras que la señal para TRAIL-R1mut-ASPD disminuía rápidamente con concentraciones decrecientes del receptor.

35 Se usó un microgramo/ml de TRAIL-ASPD, TRAILR1mut-ASPD o TRAILR2mut-ASPD trimérica purificada por afinidad en 100 microlitros de PBS para inmovilización mediante la marca estrep. II sobre microplacas recubiertas con estreptactina. Los ligandos unidos se detectaron en una configuración ELISA usando proteínas de fusión con Fc de receptor 1 de TRAIL (A) o receptor 2 de TRAIL (B). Como se muestra en (A), el receptor 1 de TRAIL se unía preferentemente a TRAILR1mut-ASPD selectiva de receptor en comparación con TRAILR2mut-ASPD. Como se muestra en (B), el receptor 2 de TRAIL se unía preferentemente a TRAILR2mut-ASPD en comparación con
 40 TRAILR1mut-ASPD. En conclusión, las variantes de TRAIL construidas fusionadas a SPD son selectivas de receptor. Los resultados se muestran en la Fig. 15.

45 TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad se sometió a SEC cargando 0,5 ml (0,95 mg de proteína) en una columna Superdex200. Los resultados se muestran en la Fig. 16. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican las fracciones A1 a A14). El volumen de retención de 12,46 ml correspondía a 140-145 kDa determinado por el patrón de exclusión por tamaño. Un pico minoritario a 10,83 ml indicó algunas especies agregadas, de forma importante, sin embargo, no se detectó ningún pico en el frente de la ejecución (8 ml) lo que indica que esta molécula es mucho más soluble en comparación con proteínas que contienen partes de la secuencia de aminoácidos de TRAIL de tipo silvestre.
 50

Se usó una alícuota de la cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad para SDS-PAGE no reductora (A) o reductora (B) seguido de tinción con plata como se muestra en la Fig. 17. En condiciones no reductoras, se detectaron dos bandas a 35 y 70 kDa, mientras que se detectó una única banda de 40

kDa (indicada por una flecha) en condiciones reductoras. Esto indicaba la formación de moléculas unidas por puentes disulfuro. Las especies triméricas estaban presentes en las fracciones A8 a A11 y se usaron para análisis posteriores.

5 Se incubaron células Jurkat en ausencia (barras abiertas) o presencia (barras rellenas) de 2,5 microgramos/ml de anticuerpo de entrecruzamiento con alícuotas a una dilución final de factor 80 de las fracciones A1 a A14 de SEC de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad. Los resultados se muestran en la Fig. 18. Como control negativo, se incubaron células Jurkat con medio solamente. Se lisaron las células Jurkat después de 3 h de incubación y se determinó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico. Como las células Jurkat han demostrado expresar principalmente el receptor 2 de TRAIL, ninguna fracción indujo actividad caspasa significativa, incluso cuando TRAILR1mut-ASPD se entrecruzaba por el anticuerpo específico de marca estrep. II. Esto indicó que TRAILR1mut-ASPD no se une al receptor 2 de TRAIL,

15 TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño cargando 0,5 ml (0,5 mg de proteína) a una columna Superdex 200 como se muestra en la Fig. 19. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican las fracciones A1 a A14). El volumen de retención de 12,60 ml corresponde to 130-135 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAILR2mut-ASPD es un homotrímero según lo calculado a partir del peso monomérico esperado de 40 kDa. De forma importante, más del 95% estaba presente en la fracción de pico trimérico y no se detectaron agregados. El pico trimérico se usó para análisis posteriores.

25 Se usó una alícuota de la cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad para SDS-PAGE no reductora (A) o reductora (B) seguido de tinción con plata como se muestra en la Fig. 20. En condiciones no reductoras, se detectaron dos bandas a 35 y 70 kDa, mientras que se detectó una única banda de aproximadamente 40 kDa (indicada por una flecha) en condiciones reductoras. Esto indicó la formación de moléculas unidas por puentes disulfuro. La especie trimérica estaba presente en las fracciones A9 a A11 y se usó para análisis posteriores.

30 Los resultados de un ensayo de eliminación de células Jurkat con TRAILR2-mut-ASPD se muestran en la Fig. 21. Se incubaron células Jurkat en ausencia (barras claras) o presencia (barras rellenas) de anticuerpos de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti-marca estrep. II) con alícuotas de las fracciones A1 a A14 de SEC de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad. Las muestras se usaron a una dilución final de factor 640. Las células se lisaron después de 3 h de incubación y se determinó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico. Como las células Jurkat han demostrado expresar principalmente el receptor 2 de TRAIL que requiere formas multimerizadas de ligando para una señalización eficaz, TRAILR2mut-ASPD inducía actividad caspasa cuando se entrecruzaba. Esto indicó que TRAILR2mut-ASPD es una molécula funcional.

40 La actividad citotóxica de TRAIL-ASPD, TRAILR1mut-ASPD y TRAILR2mut-ASPD sobre diferentes células cancerosas humanas se muestra en la Fig. 22. Las líneas celulares indicadas HT1080 (A y B), Hela (C y D) o Colo205 (E y F) se trataron con concentraciones variables de TRAIL-ASPD, TRAILR1mut-ASPD o TRAILR2mut-ASPD purificada y trimérica en ausencia (A, C y E) o presencia (B, D y F) de anticuerpo de entrecruzamiento (anti-marca estrep. II). Las células se incubaron durante 18 horas con las concentraciones indicadas de ligandos y se cuantificó la muerte celular mediante tinción con violeta cristal (HT1080 y HeLa) o ensayo MTS (Colo205). Como resultado, el ligando TRAIL-ASPD indujo muerte celular sobre las tres líneas celulares ensayadas y TRAILR2mut-ASPD mostró superior actividad de eliminación celular. En contraste, TRAILR1mut-ASPD selectiva del receptor 1 de TRAIL no fue activa sobre ninguna línea celular ensayada.

50 TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad se concentró 20 veces en PBS por centrifugación a través de una membrana de 10 kDa para dar una solución de 2,5 mg/ml. Del concentrado, 0,1 ml se sometieron a cromatografía por exclusión de tamaño. Como resultado, solamente se detectó el pico trimérico y ningún agregado, lo que indica que esta composición tiene capacidades mejoradas de producción (Fig. 23). Se consiguieron resultados similares para TRAILR1mut-ASPD, donde una solución concentrada de incluso 5,4 mg/ml no mostró signos de agregación (no mostrado). En contraste, todas las proteínas de fusión ensayadas que contenían el dominio de unión a receptor compuestos de la secuencia de TRAIL de tipo silvestre mostraron agregación con un 40% de agregados a concentraciones tan bajas como de 0,4 mg/ml.

Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de fusión de muteína de TRAIL selectiva de receptor se muestran a continuación.

60 SEQ ID 47 Sp-TRAILR1mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40335
ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFSLNLHL  RNgELVIHEK  GFYYIYSQTA  FRFSEEIKEV  TRNDKQMVQY
IYKWTDPDP
121    ILLMKSARNS   CWSKDAEYGL  YSIYQGGIFE  LKENDRIFVS  VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS   GSGLPDVASL  RQQVEALQGQ  VQHLQAAFSQ  YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA   QLLCTQAGGQ  LASPRSAEEN  AALQQLVVAK  NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW   APGEPNDGG   SEDCVEIFTN  GKWDRACGE   KRLVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAILR1mut
5 182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana
349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)
10 360 - 367: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

SEQ ID 48 Sp-TRAILR2mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40401
ORIGEN

```

15 1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFSLNLHL  RNgELVIHEK  GFYYIYSQTQ  FKFREEIKEN  TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS   CWSKDAEYGL  YSIYQGGIFE  LKENDRIFVS  VTNERLLQMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS   GSGLPDVASL  RQQVEALQGQ  VQHLQAAFSQ  YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA   QLLCTQAGGQ  LASPRSAEEN  AALQQLVVAK  NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW   APGEPNDGG   SEDCVEIFTN  GKWDRACGE   KRLVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)
21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAILR2mut
20 182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)
193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana
231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana
349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)
25 360 - 367: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

2.5 Caracterización de variantes de carbohidrato de SPD

TRAIL-ASPD_F335A purificada por afinidad se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño cargando 0,5 ml de solución de PBS (0,4 mg de proteína) a una columna Superdex 200 como se muestra en la Fig. 24. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican A1 a A13). El volumen de retención de 12,27 ml corresponde a 135-145 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAIL-ASPD_F335A es un homotrímico según lo calculado a partir del peso monomérico esperado de 40 kDa. Dos picos adicionales a 8,32 y 10,68 ml indicaron la formación de agregados de TRAIL-ASPD_F335A. Solamente el pico trimérico se usó para análisis posteriores.

De la cromatografía por exclusión de tamaño se resolvió una alícuota de las fracciones recogidas A1 a A13 por SDS-PAGE reductora y el gel se tiñó con plata (Fig. 25). La banda detectada a aproximadamente 40 kDa correspondía al peso molecular calculado de 40 kDa para TRAIL-ASPD_F335A. Las fracciones positivas correspondientes a la molécula trimérica (A8, A9, A10) de la ejecución SEC se combinaron y usaron para análisis adicionales.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión de TRAIL- variante de carbohidrato de SPD se muestran a continuación.

SEQ ID 49: Sp-TRAIL-ASPD_F335A

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40328

ORIGEN

1 METDTLLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
 KINSWESSRS
 61 GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
 IYKYTSYPDP
 121 ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
 HEASFFGAFL
 181 VGSSGSSGSS *GS*GLPDVASL RQQVEALQGQ VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
 QSVGEKIFKT
 241 AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
 SKTEGKFTYP
 301 TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDC**VEI**ATN GKWDRACGE KRLVCEFGG
 SPSSSSSSAW
 5 361 SHPQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)

21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL

182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)

10 193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana

231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana (mutación Phe en negrita)

349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

360 - 367: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

15 **SEQ ID 50: Sp-TRAIL-ASPD_F335D**

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40372

ORIGEN

1 METDTLLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
 KINSWESSRS
 61 GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
 IYKYTSYPDP
 121 ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
 HEASFFGAFL
 181 VGSSGSSGSS *GS*GLPDVASL RQQVEALQGQ VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
 QSVGEKIFKT
 241 AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
 SKTEGKFTYP
 301 TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDC**VEI**DTN GKWDRACGE KRLVCEFGG
 SPSSSSSSAW
 20 361 SHPQFEK

1 - 20: Péptido señal de secreción (Sp; subrayado)

21 - 181: Dominio de unión a receptor de TRAIL

182 - 192: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)

25 193 - 230: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana

231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana (mutación Asp en negrita)

349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

360 - 367: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

30 El efecto citotóxico de TRAIL-ASPD_F335A sobre células cancerosas humanas se muestra en la Fig. 26. Las líneas celulares de cáncer humano indicadas se incubaron durante una noche con concentraciones variables de TRAIL-ASPD_F335A trimérica purificada por afinidad y SEC en presencia o ausencia de anticuerpo de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti-marca estrep. II). La viabilidad celular se cuantificó por tinción con violeta cristal (HT1080, HeLa y WM35) o MTS (Colo205). La elevación de la viabilidad celular de Colo205 a altas concentraciones de ligando se debe probablemente a la limitación del anticuerpo de entrecruzamiento.

40 TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño cargando 0,5 ml (0,2 mg de proteína) a una columna Superdex 200 como se muestra en la Fig. 27. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican A1 a A13). El volumen de retención de 12,29 ml corresponde a 135-145 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAIL-ASPD_F335D es un homotrímero según lo calculado a partir del peso monomérico esperado de 40 kDa. El pico a 8,35 correspondía a agregados inactivos de TRAIL-ASPD_F335D típicamente encontrados para todas las proteínas de fusión que contienen partes de la secuencia de aminoácidos de TRAIL de tipo silvestre.

De la cromatografía por exclusión de tamaño se resolvieron alícuotas de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad de las fracciones recogidas A1 a A13 por SDS-PAGE reductora y el gel se tiñó con plata (Fig. 28). Las bandas detectadas a aproximadamente 40 kDa (indicadas por una flecha) correspondían al peso molecular calculado de 40 kDa para TRAIL-ASPD_F335D. Las fracciones que contenían proteína trimérica (fracciones A8 a A10) se combinaron y usaron para análisis adicionales.

Las líneas celulares de cáncer humano HT1080 (A), HeLa (B), WM35 (C) o Colo205 (D) se incubaron durante una noche con concentraciones variables de TRAIL-ASPD_F335D trimérica purificada por afinidad en presencia o ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento (anti-marca estrep. II). La viabilidad celular se cuantificó por tinción con violeta cristal (HT1080, HeLa y WM35) o MTS (Colo205). Los datos muestran que TRAIL-ASPD_F335D es capaz de inducir muerte celular en las líneas celulares de cáncer ejemplificadas (Fig. 29). La elevación de la viabilidad de las células Colo205 a altas concentraciones de ligando se debe probablemente a la limitación del anticuerpo de entrecruzamiento.

2.6 Análisis de características de unión a carbohidrato de las variantes del motivo de trimerización de SPD

Se ha demostrado que la proteína SP-D de tipo silvestre, de longitud completa y oligomérica de varias especies, y también el cuello+CRD trimérico de SP-D humana se une a varios carbohidratos diferentes. Además, el cuello+CRD de SP-D humana también ha demostrado ejercer efectos inmunomoduladores sirviendo como factor quimiotáctico para células del sistema inmunitario tales como neutrófilos (Cai et al., 1999, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 276:131-136). Otras células también pueden reclutarse por SP-D. El efecto quimiotáctico del cuello+CRD de SP-D humana ha demostrado depender de la función de glicounión, ya que la adición de maltosa inhibía la función quimiotáctica. Por tanto, un ligando del TNFSF con una función quimiotáctica mediada por SP-D puede ser de actividad superior en comparación con ligandos o construcciones de los mismos con secuencias naturales de aminoácidos. Por ejemplo, en un escenario donde son deseables efectos celulares tal como en el tratamiento del cáncer dicho ligando descrito puede ser deseable.

Además, un ligando donde SP-D no tiene función de carbohidrato puede ser deseable en otros entornos. Para SP-D humana se ha descrito un mutante en que el aminoácido fenilalanina 335 (correspondiente al aminoácido 355 de la SEQ ID NO: 21) se ha mutado en alanina (SPD_F335A, Crouch et al., JBC 281: 18008-18014). Este mutante mostró unión muy débil a carbohidrato. Sin embargo, la introducción de un aminoácido cargado (por ejemplo, un aminoácido ácido) puede ser incluso mejor en comparación con F335A si no se desea unión a carbohidrato. Por lo tanto, el mutante SPD_F335D puede ser superior hacia el mutante F335A.

Para analizar la unión de proteínas de fusión de TRAIL a carbohidratos, se inmovilizó manano de levadura en microplacas y se detectó la unión de TRAIL-SPD, TRAIL-SPD_F335A o TRAIL-SPD_F335D por ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 30. Como se esperaba, la señal ELISA aumentó con concentraciones crecientes de TRAIL-ASPD. En contraste, la forma mutante de carbohidrato TRAIL-ASPD_F335A mostró una señal ELISA muy baja. Además, la nueva variante TRAIL-ASPD_F335D construida presentaba la señal ELISA más baja (véase el recuadro y la flecha). Esto indicó que el mutante F335D tiene una menor afinidad de unión a manano en comparación con la mutante de SP-D descrita previamente F335A.

2.7 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD

Para determinar las semividas de proteínas de fusión TRAIL-SPD, se inyectaron diez microgramos de TRAIL-ASPD (A) o TRAIL-ASPD_F335D (B) por vía intravenosa en ratones CD1 macho y se recogieron muestras de suero después de varios puntos temporales (predosis, 5 min, 30 min, 2 h, 6 h y 24 h). Las proteínas TRAIL en los sueros de los ratones se cuantificaron por un ELISA y los datos se usaron para calcular las semividas. Los resultados se muestran en la Fig. 31. Para las dos proteínas analizadas, se calculó una semivida de 7 a 14 horas para TRAIL-ASPD (A) y TRAIL-ASPD_F335D (B). Ningún animal murió o mostró signos de intolerancia durante el periodo observado. Los datos indican una mejora de al menos 80 veces en la semivida en suero en comparación con TRAIL de tipo silvestre, que se informó que tenía una semivida en el intervalo de tres a cinco minutos en roedores (Kelley et. al 2001).

2.8 Citotoxicidad de proteínas de fusión TRAIL-ASPD

Para analizar los efectos hepatotóxicos potenciales de TRAIL-ASPD, TRAIL-ASPD_F335A o TRAIL-ASPD_F335D, se incubaron hepatocitos humanos primarios (PHH) con concentraciones variables de las proteínas de fusión TRAIL-SPD indicadas, con o sin anticuerpos de entrecruzamiento (anti-marca estrep. II). Como control, se usó una variante estabilizada de CD95L, CD95L-T4 (descrita en el documento WO2008/025516). Los resultados se muestran en la Fig. 32.

Además, se analizó el efecto de una incubación simultánea de PHH con 5 mM de fármacos quimioterapéuticos para TRAIL-ASPD_F335D. Después de 5 h (A, B y E) o 24 h (C, D y F) de incubación, se lisaron las células y se evaluó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico.

Como resultado, ninguna de las proteínas de fusión TRAIL-SPD analizadas indujo efectos hepatotóxicos, incluso si los ligandos se entrecruzaban de forma secundaria por anticuerpos. En contraste, CD95L-T4 es hepatotóxica, como se indica por un aumento de la caspasa activa (A a D). Cinco horas de coincubación de hepatocitos humanos primarios con TRAIL-ASPD_F335D trimérica junto con fármacos quimioterapéuticos no indujeron actividad caspasa (E). Sin embargo, después de 24 h de coincubación con doxorubicina, TRAIL-ASPD_F335D soluble indujo una fuerte señal de actividad caspasa (F).

Esto indica que las proteínas de fusión de TRAIL de la presente invención pueden no mostrar hepatotoxicidad indeseada en uso médico. Por tanto, las proteínas de fusión de TRAIL se administran preferiblemente en combinación con fármacos, que son sensibilizantes de la apoptosis y/o inductores de la apoptosis, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico tal como oxaliplatino, cisplatino, 5-fluorouracilo, etopósido, gemcitabina, irinotecán y otros, o moléculas de unión a Bcl2, por ejemplo, moléculas pequeñas o compuestos peptídicos, que se unen a polipéptidos de la familia de Bcl2, particularmente Bcl2 o Bclxl.

2.9 Caracterización de proteínas de fusión de APRIL

Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con vectores de expresión que codificaban APRIL-A69 (documento WO2008025516), APRIL-ASPD, APRIL-ACCSPD o APRIL-ACol11. Después de tres días, se analizaron los sobrenadantes para las proteínas secretadas por transferencia de Western. Los resultados se muestran en la Fig. 33. Para la detección de proteínas de fusión de APRIL se usó un anticuerpo específico para marca estrep. II. Las flechas indican bandas específicas que se detectaron a aproximadamente 40 kDa (APRIL-ASPD y APRIL-ACol11, respectivamente), así como a aproximadamente 25 kDa (APRIL-A69 y APRIL-ACCSPD, respectivamente). Por tanto, los casetes de expresión de APRIL son funcionales y la secreción de la proteína indicaba que las proteínas están plegadas apropiadamente. Como para otras proteínas TNFSF analizadas, los mayores niveles de proteína secretada se encontraron para APRIL fusionada al motivo de trimerización compuesto por el "cuello" superenrollado + CRD de SP-D humana (APRIL-ASPD, carril n.º 2). Se usó APRIL-ASPD para analizar la unión al receptor TACI.

Para demostrar que la proteína de fusión APRIL-ASPD construida es funcional, se evaluó la unión a un receptor conocido de APRIL, concretamente TACI (Fig. 34). Por lo tanto, se inmovilizó APRIL-ASPD en el sobrenadante de células HEK293 transfectadas de forma transitoria en microplacas recubiertas de estreptactina. El sobrenadante celular de las células HEK293 no transfectadas sirvió como control negativo. Las proteínas unidas específicamente se detectaron con concentraciones variables de TACI-Fc seguido de incubación con un anticuerpo específico anti-Fc humano conjugado con peroxidasa. Como resultado, la señal ELISA aumentó con concentraciones crecientes de TACI-Fc, lo que indica que APRIL-ASPD es una molécula funcional.

La secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de APRIL se muestra a continuación.

SEQ ID 51: Sp-APRIL-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 344, PM=37120
ORIGEN

```

1      METDTLLLLWV LLLWVPAGNG KQHSVLHLVP INATSKDDSD VTEVMWQPAL
RRGRGLQAQG
61     YGVRIQDAGV YLLYSQVLFQ DVTFTMGQVV SREGQGRQET LFR CIRSMPS
HPDRAYNSCY
121    SAGVFHLHQG DILSVIIPRA RAKLNLSPHG TFLGFVKLGS SGSSGSSGSG
LPDVASLRQQ
181    VEALQGQVQH LQAAFSQYKK VELFPNGQSV GEKIFKTAGF VKPFTEAQLL
CTQAGGQLAS
241    PRSAAENAAL QQLVVAKNEA AFLSMTDSKT EGKFTYPTGE SLVYSNWAPG
EPNDDGGSED
45    301     CVEIFTNGKW NDRACGEKRL VVCEFGGSPS SSSSSAWSHP QFEK

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (subrayado)

21 - 158: RBD de APRIL

159 - 169: Elemento enlazador flexible (enlazador A; GSS GSS GSS GS cursiva)

170 - 207: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana

208 - 325: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana

326 - 336: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

337 - 344: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

Ejemplo 3 Generación de una proteína de fusión con un anticuerpo de cadena sencilla como polipéptido efector

Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos para proteínas de fusión de Fv de cadena sencilla (sc)-SPD se muestran a continuación (SEQ ID 52, 53)

SEQ ID 52 Sp-sc006-ASPD

5

Cantidad total de aminoácidos: 449

```

1      METDTLLLLWV LLLWVPAGNG EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFN
TNAMNWRQA
61     PGKGLEWVAR IRSKSNYYAT YYADSVKDRF TLRDDSKNT LYLQMNSLKT
EDTAVYYCTR
121    DRGWGAMYDYG GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGTGDIQMT QSPSSLSASV
GDRVITITCSA
181    SQDINNYLNW YQQKPGKAPK LLIYYTSSLH SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI
SSLQPEDFAT
241    YYCQQFSNLP WTFGGGTKLE IKRTGSSGSS GSSGSGLPDV ASLRQQVEAL
QGQVQHLQAA
301    FSQYKKVELF PNGQSVGEKI FKTAGFVKPF TEAQLLCTQA GGQLASPRSA
AENAALQQLV
361    VAKNEAAFLS MTDKSTEGKF TYPTGESLVY SNWAPGEPND DGGSEDCVEI
FTNGKWNDR
421    CGEKRLVVCE FGGSPSSSSS SAWSHPQFEK
    
```

- 10 1- 20: Péptido señal de secreción (subrayado)
- 21-140: Dominio variable de cadena pesada
- 141-155: Elemento enlazador
- 156-264: Dominio variable de cadena ligera
- 265-276: Enlazador A
- 15 277-431: Motivo SPD (cuello + CRD)
- 432-441: Elemento enlazador
- 442-450: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

SEQ ID 53 Sp-sc006-ASPD_F335D

20

Cantidad total de aminoácidos: 449

```

1      METDTLLLLWV LLLWVPAGNG EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFN
TNAMNWRQA
61     PGKGLEWVAR IRSKSNYYAT YYADSVKDRF TLRDDSKNT LYLQMNSLKT
EDTAVYYCTR
121    DRGWGAMYDYG GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGTGDIQMT QSPSSLSASV
GDRVITITCSA
181    SQDINNYLNW YQQKPGKAPK LLIYYTSSLH SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI
SSLQPEDFAT
241    YYCQQFSNLP WTFGGGTKLE IKRTGSSGSS GSSGSGLPDV ASLRQQVEAL
QGQVQHLQAA
301    FSQYKKVELF PNGQSVGEKI FKTAGFVKPF TEAQLLCTQA GGQLASPRSA
AENAALQQLV
361    VAKNEAAFLS MTDKSTEGKF TYPTGESLVY SNWAPGEPND DGGSEDCVEI
DTNGKWNDR
421    CGEKRLVVCE FGGSPSSSSS SAWSHPQFEK
    
```

- 25 1-20: Péptido señal de secreción (subrayado)
- 21-140: Dominio variable de cadena pesada
- 141-155: Elemento enlazador
- 156-264: Dominio variable de cadena ligera
- 265-276: Enlazador A
- 30 277-431: Motivo SPD (cuello + CRD)
- 432-441: Elemento enlazador
- 442-450: Marca estrep. II (WSHPQFEK)

La proteína se expresó y se sometió a cromatografía de afinidad como se describe en la sección 1.3. Se resolvió una alícuota del eluato por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras. Puede detectarse una única banda a 40-50 kDa indicada por una flecha (véase la Figura 39) correspondiente a sc006-ASPD-St con un peso molecular esperado de 45,8 kDa.

35

La proteína se expresó, se purificó por afinidad y se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño como se describe en la sección 1.3. Se cargaron cincuenta microgramos de la proteína purificada por afinidad en una columna Superdex200 y se muestra el cromatograma (véase la Figura 40). El pico principal a 12,63 ml corresponde

40

a un peso molecular de 160 ± 15 kDa que se parece a la especie esperada de tres moléculas scFv organizadas en trímeros mediante SPD. Las moléculas podían ensayarse para la funcionalidad en una configuración ELISA inmovilizando el antígeno y detectando sc006-SPD-St.

- 5 La proteína de fusión generada en este experimento comprende un anticuerpo de cadena sencilla dirigido contra IL4R-alfa.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende
- 5 (i) un dominio de trimerización de la familia de colectina que comprende
- (a) un dominio de reconocimiento de carbohidrato de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D; y
- (b) una región de cuello de la familia de colectina de la proteína tensioactiva D;
- 10 (ii) un elemento enlazador;
- (iii) el polipéptido efector TRAIL o el dominio de unión a receptor del mismo respectivo, en la que el polipéptido efector está localizado de forma N-terminal de la región de cuello de la familia de colectina, y
- (iv) un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento de un anticuerpo o anticuerpo de cadena sencilla fusionado al extremo C-terminal del dominio de reconocimiento de carbohidrato.
- 15 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el dominio de reconocimiento de carbohidrato comprende una o más mutaciones o sustituciones de aminoácido.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 2, en la que el dominio de reconocimiento de carbohidrato es el dominio de reconocimiento de carbohidrato de la proteína tensioactiva D y en la que la sustitución es una sustitución de fenilalanina 355 en la Seq ID 21 en un aminoácido polar seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina.
- 20 4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el elemento enlazador tiene una longitud de 25 o menos aminoácidos.
- 25 5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el elemento enlazador está compuesto de aminoácidos seleccionados de alanina, treonina, glicina y serina.
- 30 6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el polipéptido efector es un mutante de TRAIL.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 6, en la que la región de tronco N-terminal de TRAIL no está incluida en la proteína de fusión.
- 35 8. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el receptor se selecciona entre TRAIL-R1 o TRAIL-R2.
9. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso como medicamento.
- 40 10. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para el tratamiento de trastornos proliferativos asociados con disfunción de citoquinas TNF que comprenden tumores, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, enfermedades degenerativas y rechazos de trasplante.
- 45

Figura 1

SEC de CD95L-ASPD purificada por afinidad

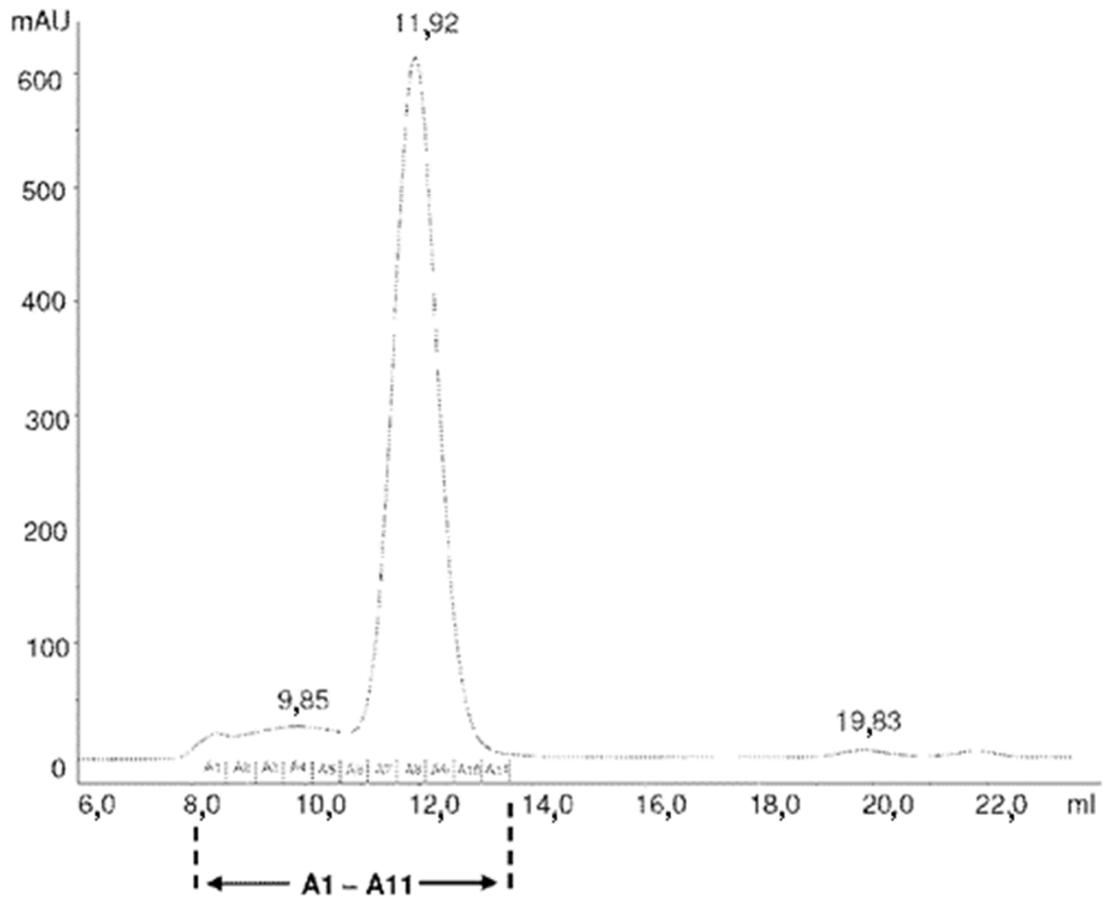


Figura 2

Gel de plata de las fracciones de SEC A1-A11 de CD95L-ASPD purificada por afinidad

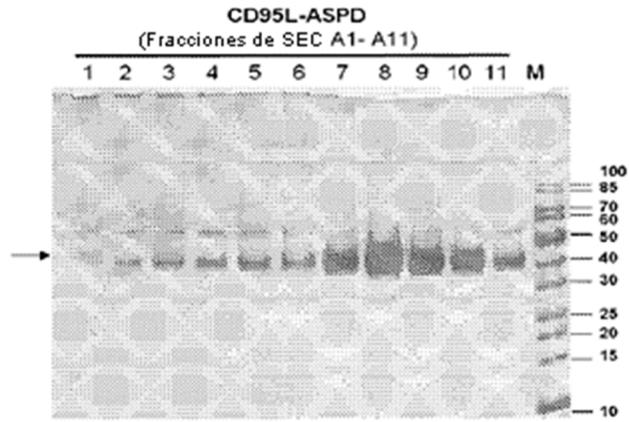


Figura 3

Actividad caspasa sobre células Jurkat inducida por las fracciones de SEC A1-A15 de CD95L-ASPD purificada por afinidad

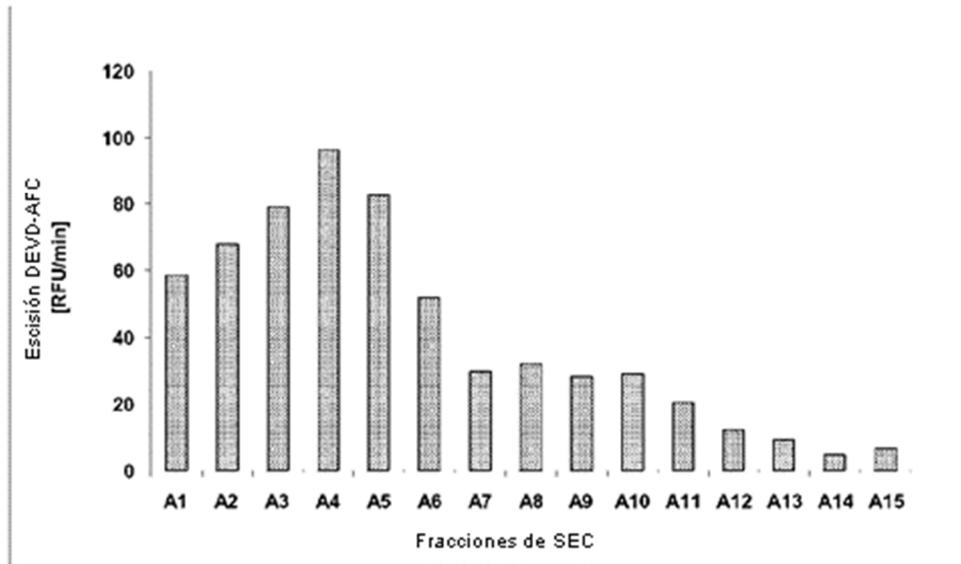


Figura 4

Citotoxicidad de CD95L-ASPD sobre células WM35, HT1080 y HeLa

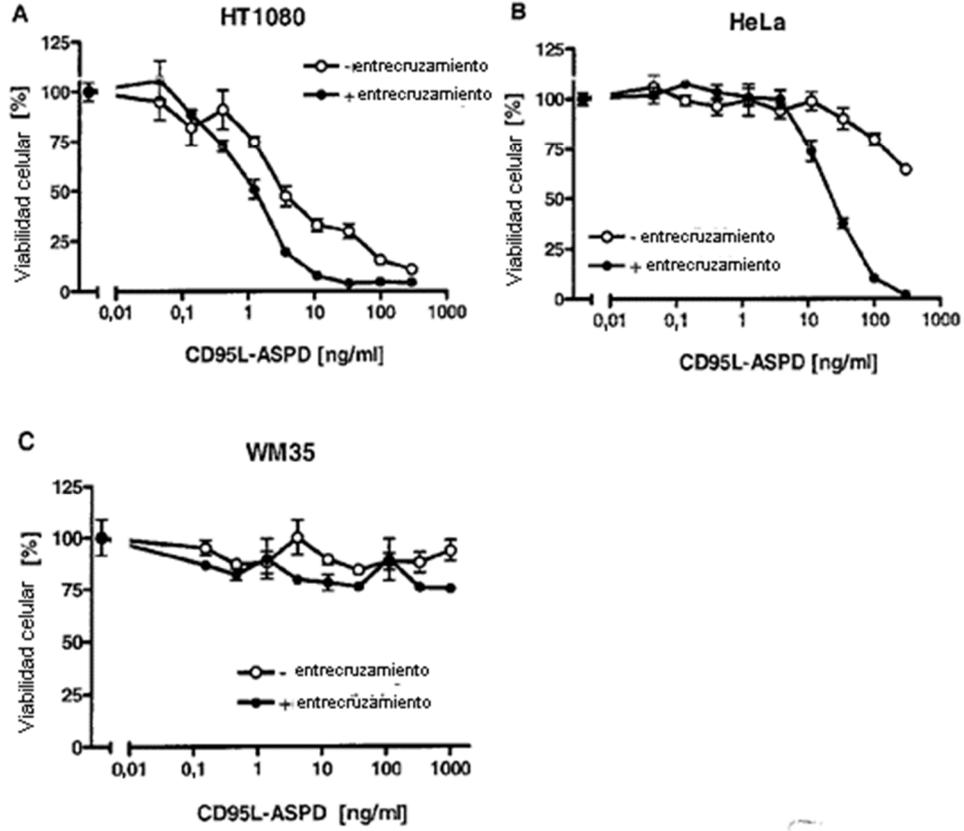


Figura 5

SEC de LIGHT-ASPD purificada por afinidad

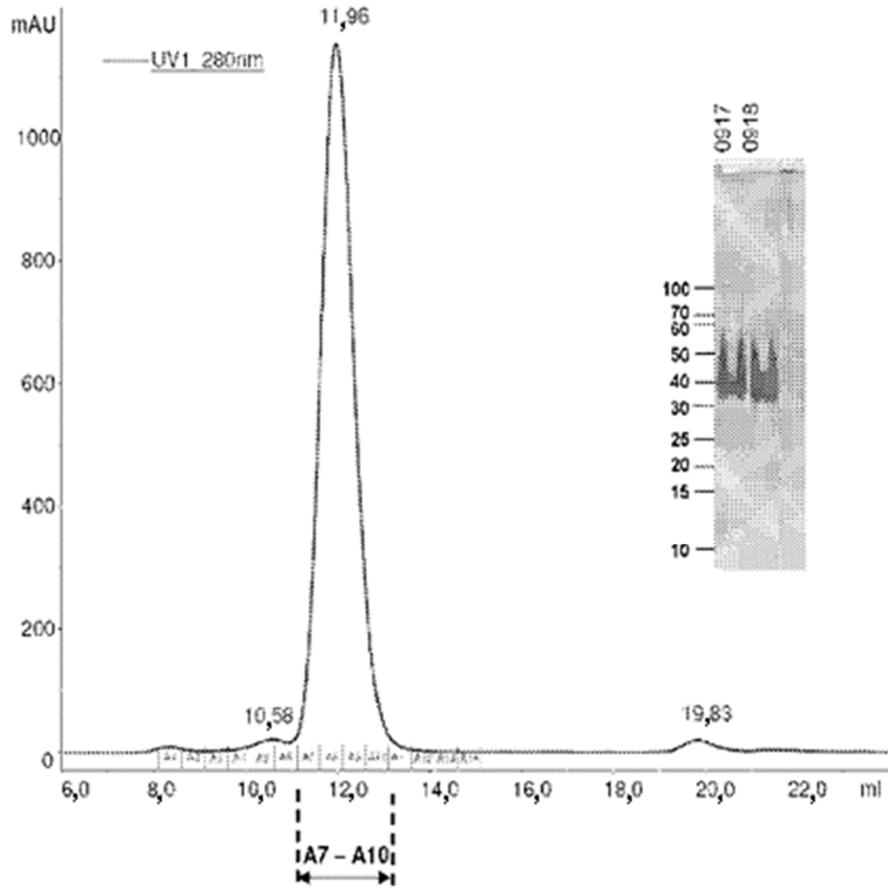


Figura 6

Unión de HVEM-Fc a LIGHT-ASPD inmobilizada

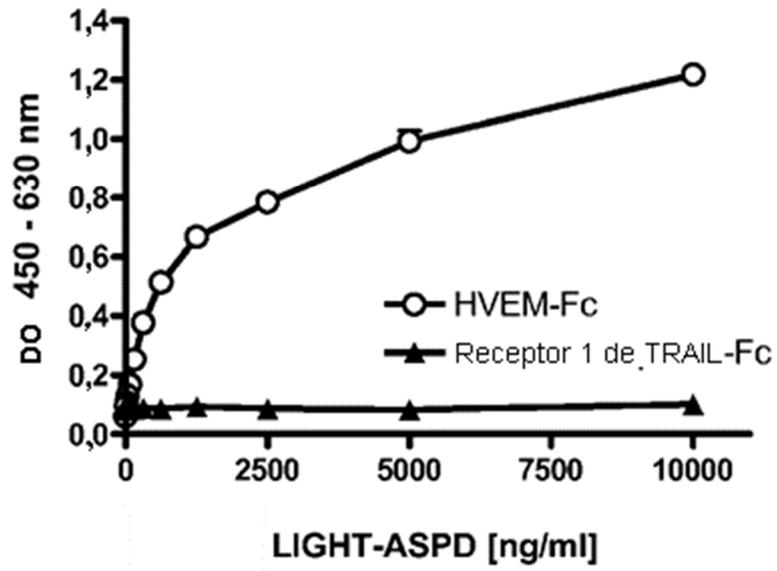


Figura 7

Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones de TRAIL

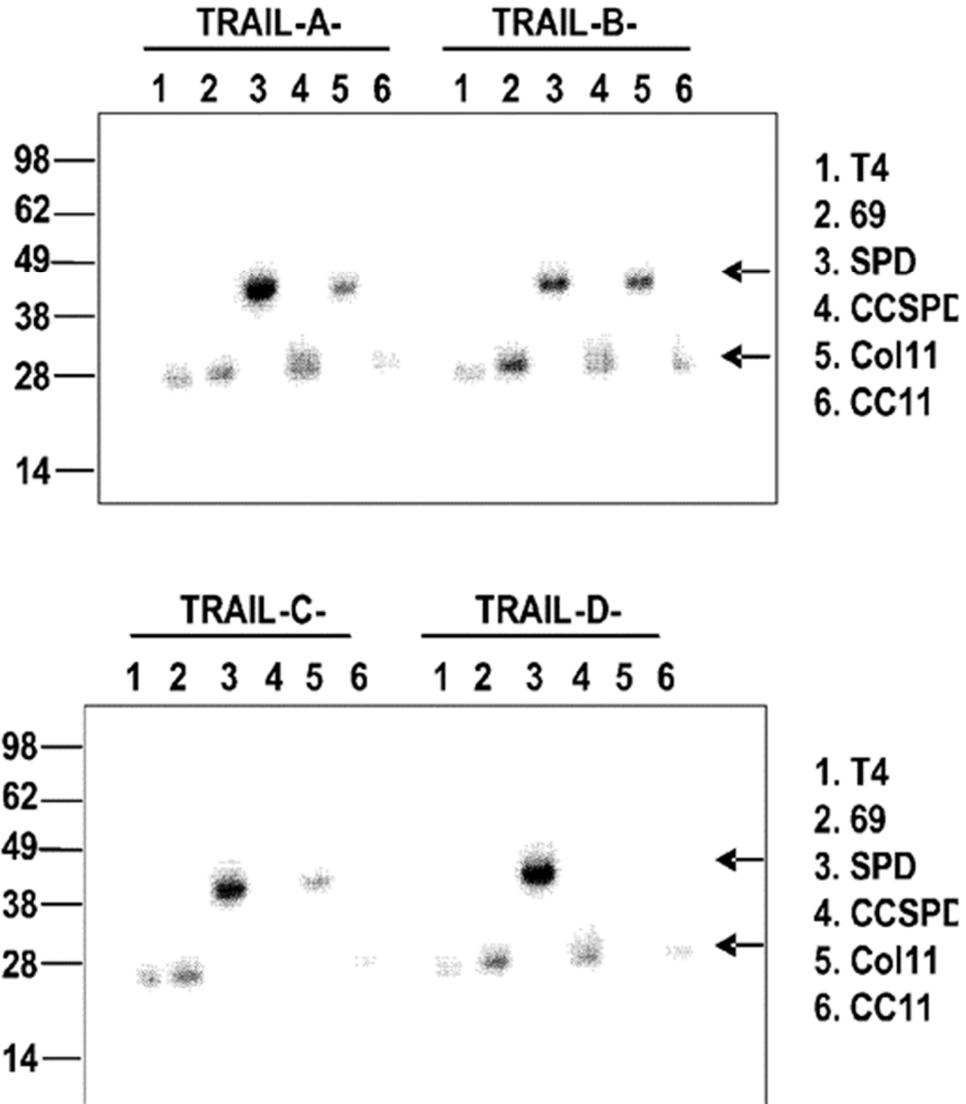


Figura 8

Actividad caspasa en células T Jurkat

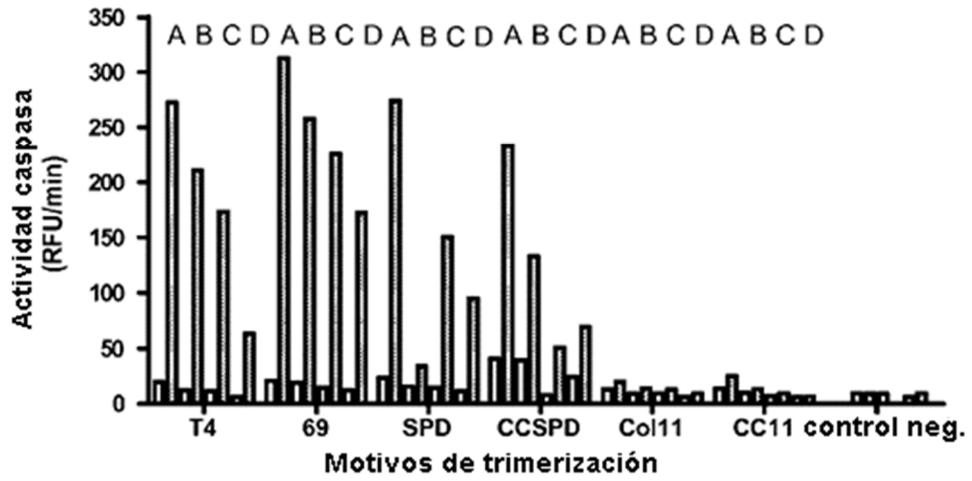


Figura 9

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAIL-ASP

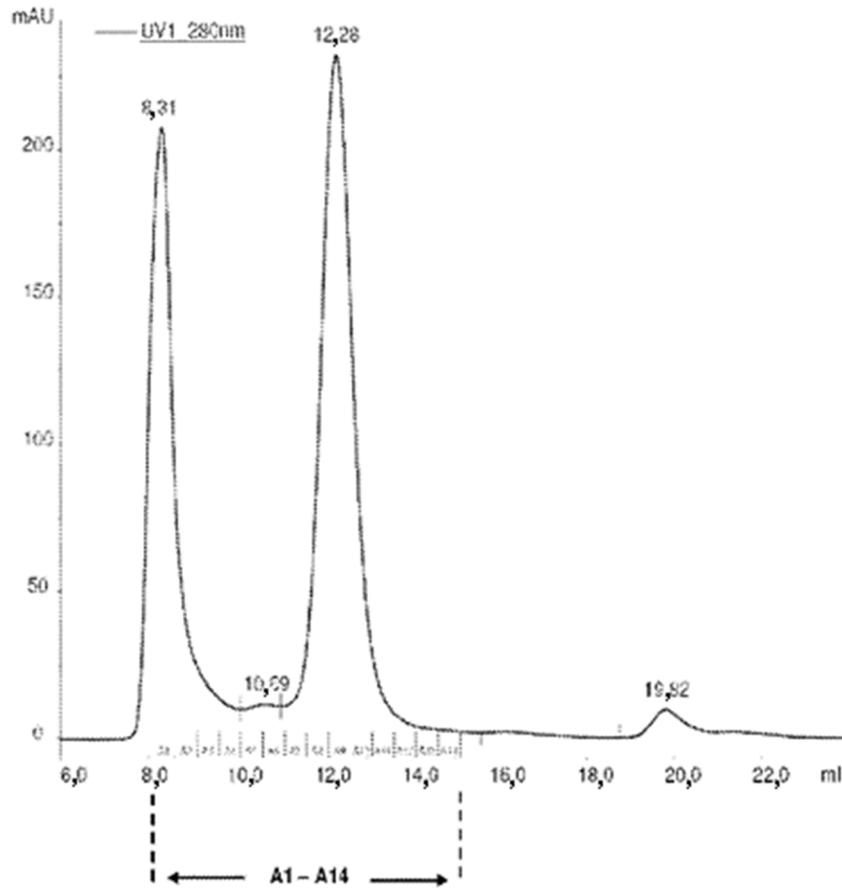


Figura 10

Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD contra células cancerosas humanas

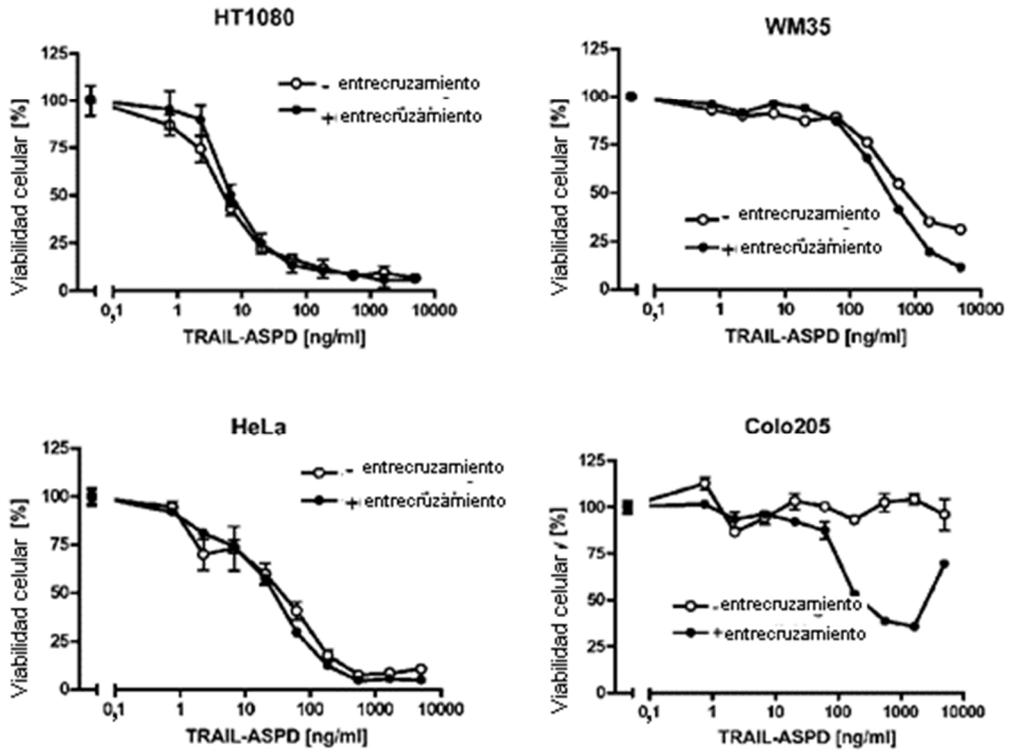
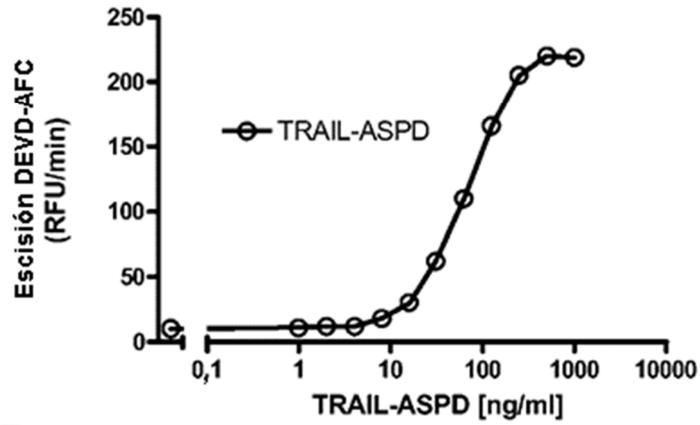


Figura 11

Actividad caspasa inducida por TRAIL-ASPД en Jurkat

A



B

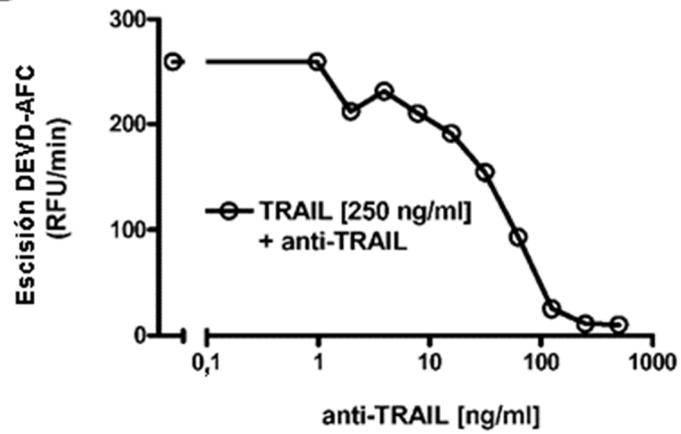


Figura 12

Ensayo de citotoxicidad con TRAIL-ASP o TRAIL-DSPD sobre células HT1080

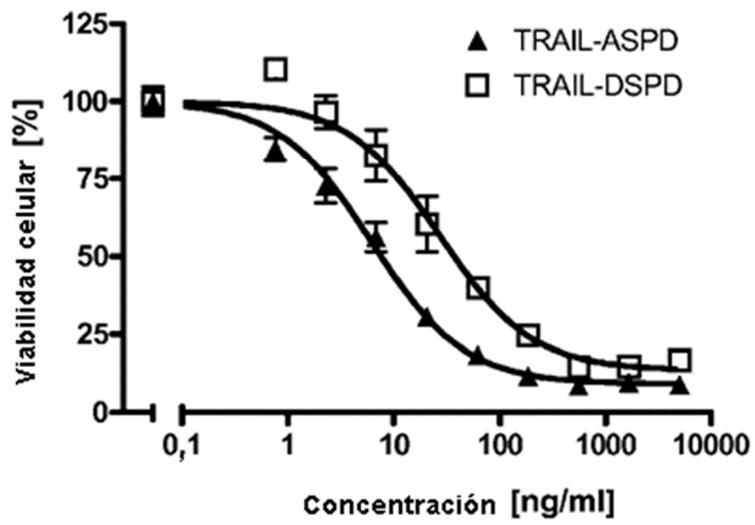


Figura 13

Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones de TRAIL-SPD o construcciones de TRAIL-SPD seletiva de receptor

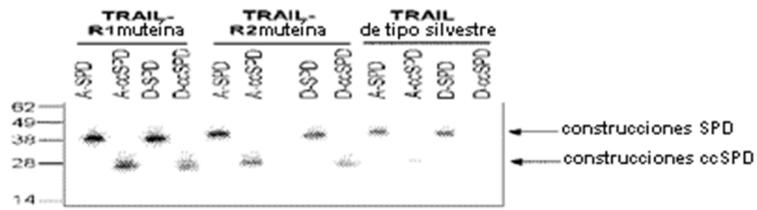


Figura 14

Ligandos selectivos de receptor de TRAIL (TRAILR1mut y TRAILR2mut) inmovilizados en placas de estreptactina, se detectan de forma diferencial por receptor 1 de TRAIL-Fc o receptor 2 de TRAIL-Fc

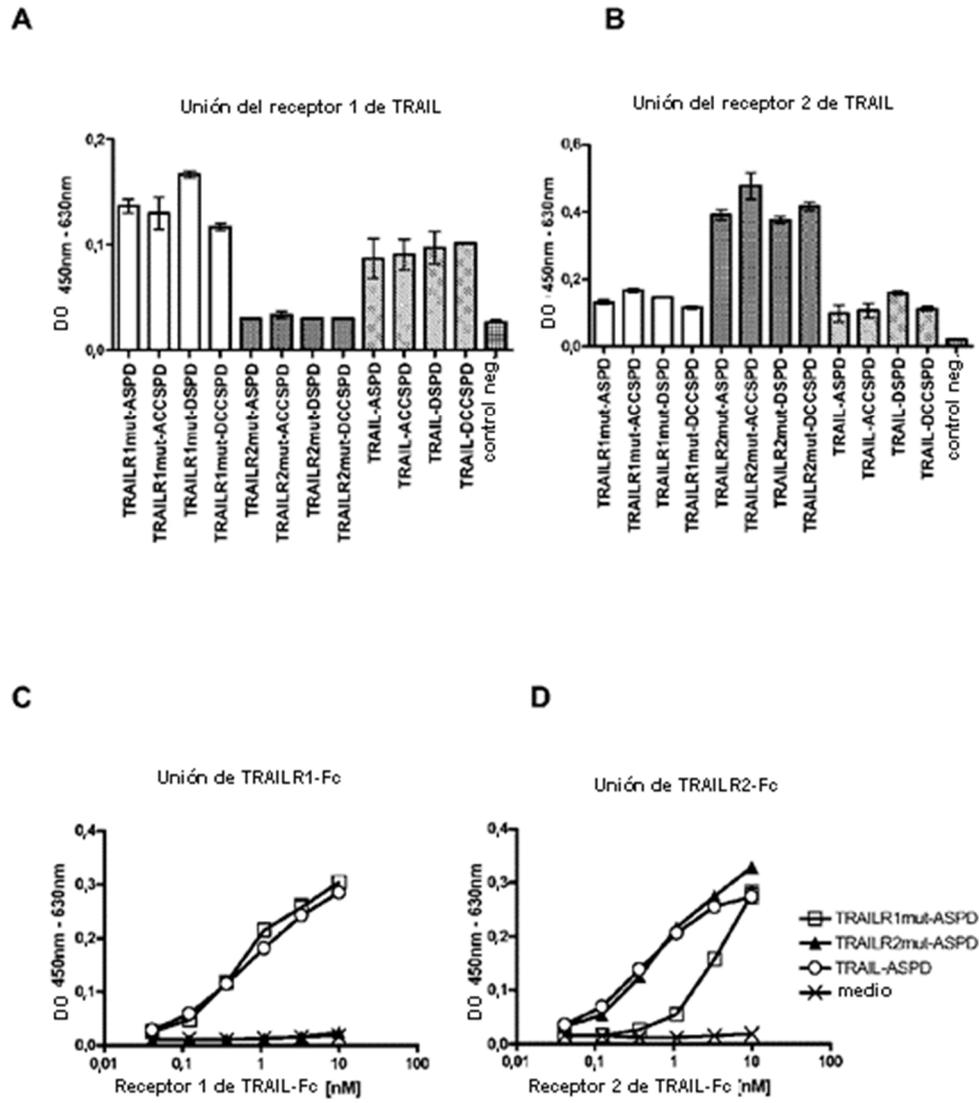


Figura 15

Unión de receptores de TRAIL a ligandos “muteína” selectivos de receptor

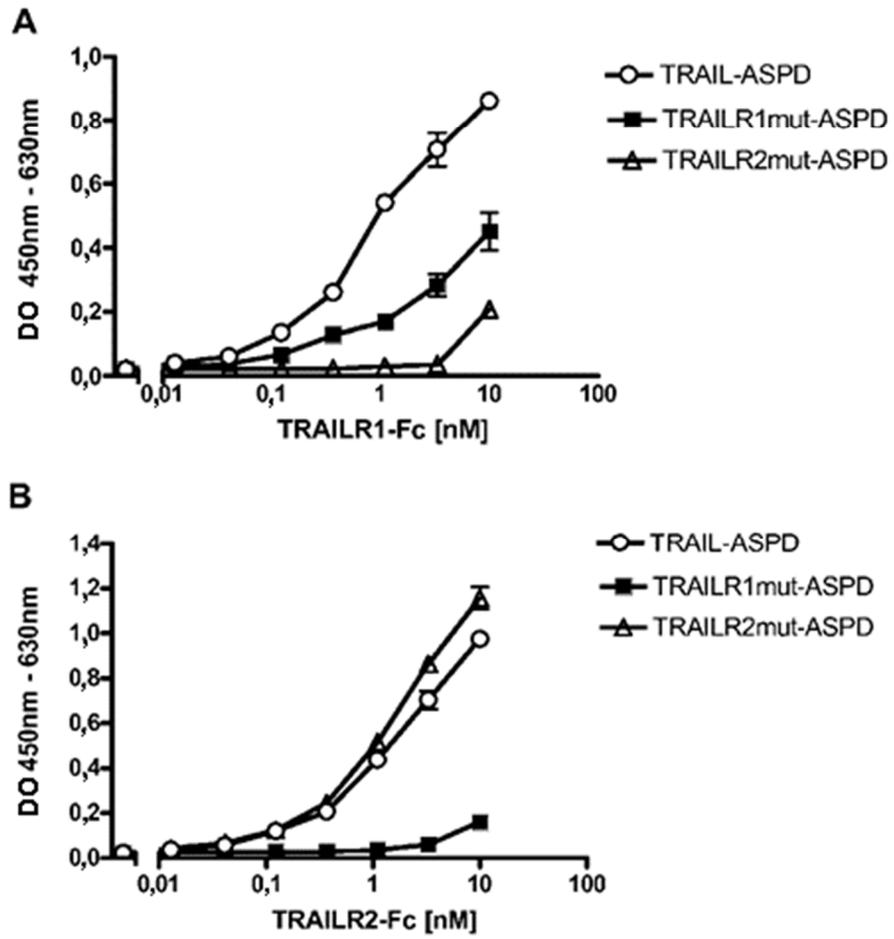


Figura 16

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1 mut-ASPD purificada por afinidad

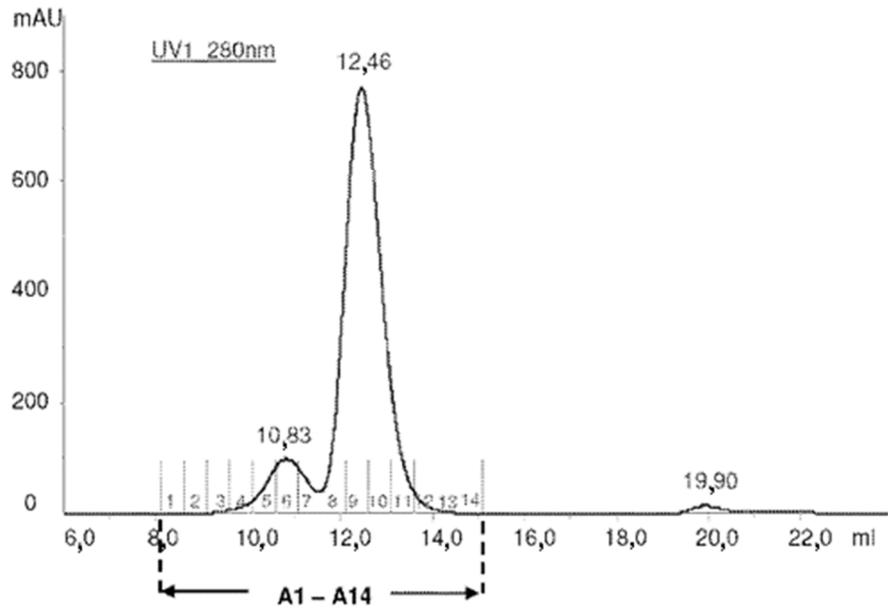


Figura 17

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones de SEC A1-A14 de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad

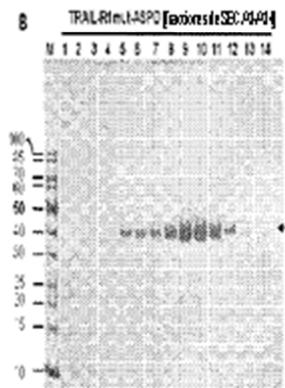
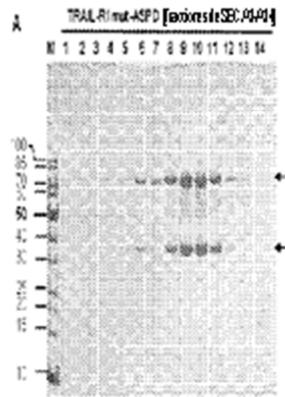


Figura 18

Actividad caspasa de fracciones de SEC A1-A14 de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad sobre células Jurkat

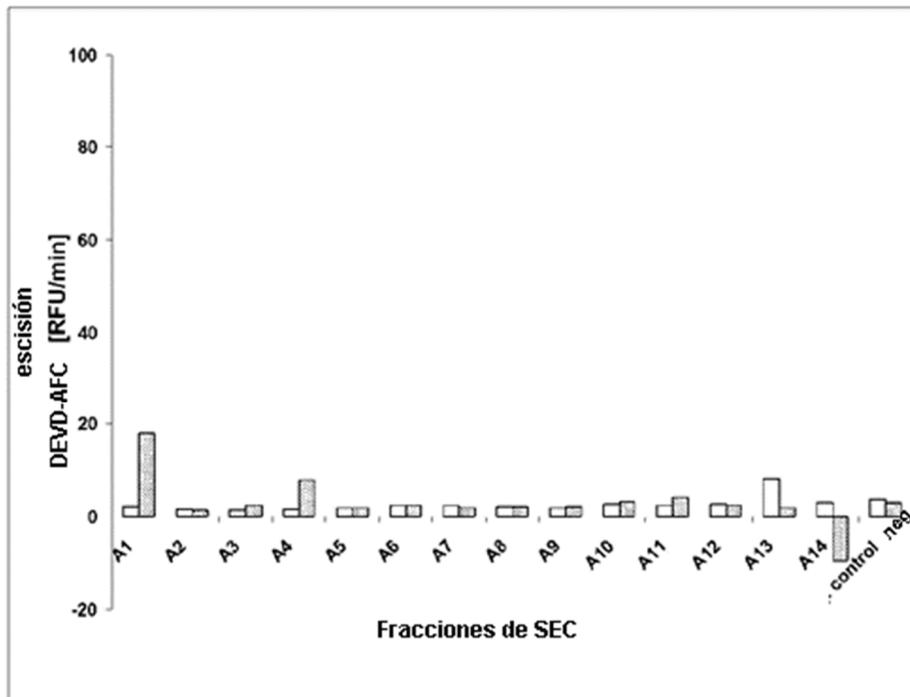


Figura 19

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad

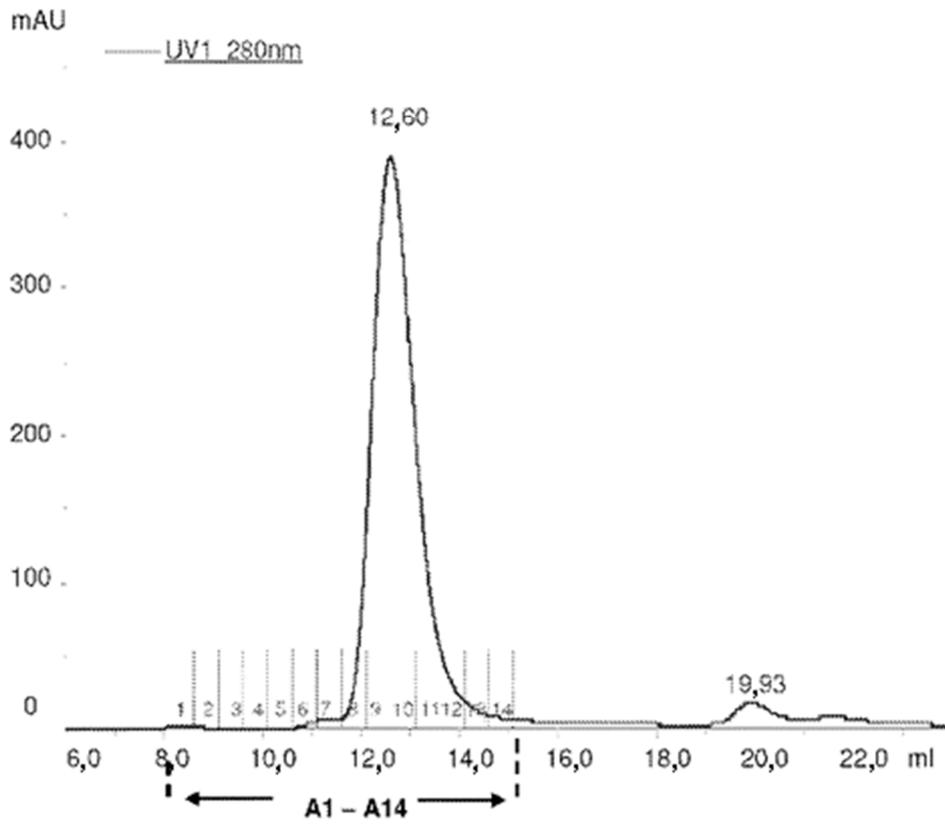


Figura 20

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones de SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad

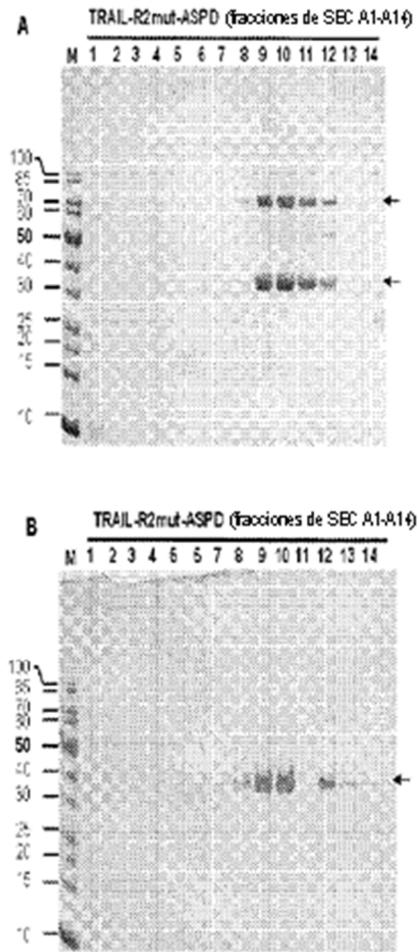


Figura 21

Ensayo de eliminación de Jurkat de fracciones de SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad

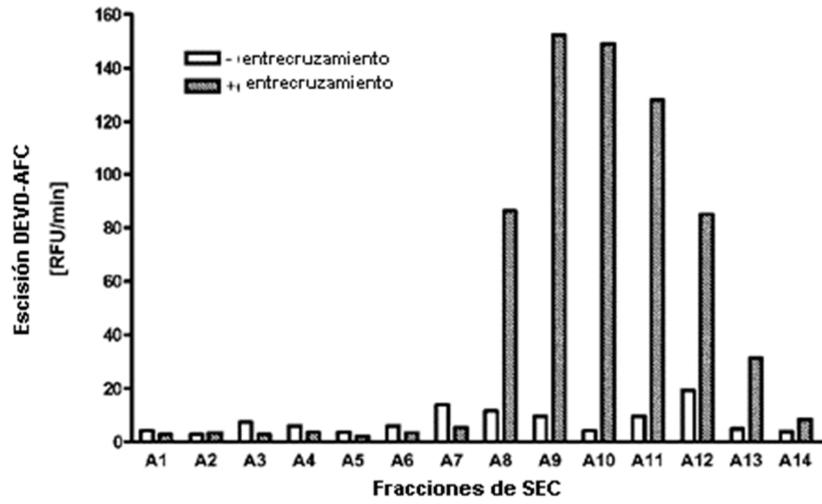


Figura 22

Actividad citotóxica de TRAIL-ASP, TRAILR1 mut-ASP y TRAILR2 mut-ASP sobre células cancerosas humanas

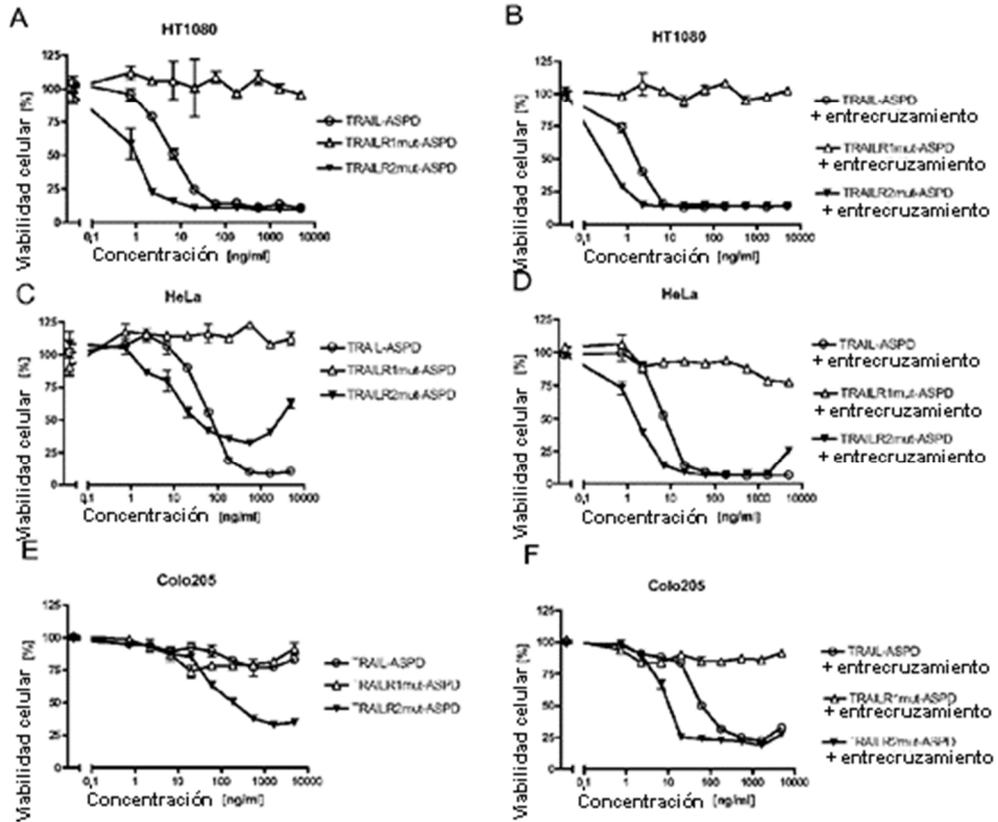


Figura 23

Proteínas TRAIL-SPD selectivas de receptor son muy solubles

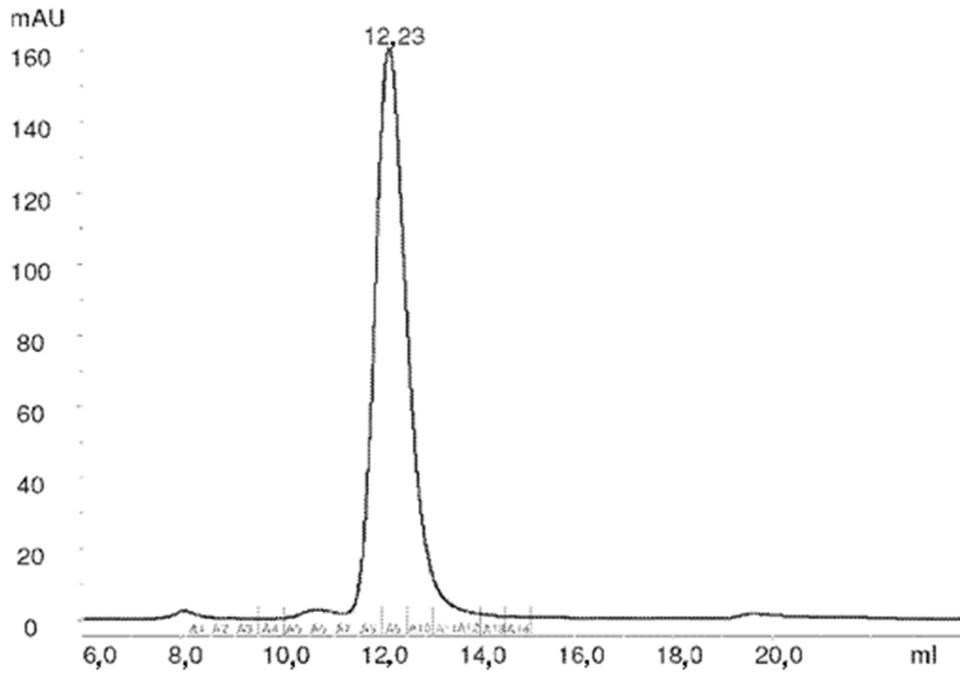


Figura 24

SEC de TRAIL-ASPD_F335A purificada por afinidad

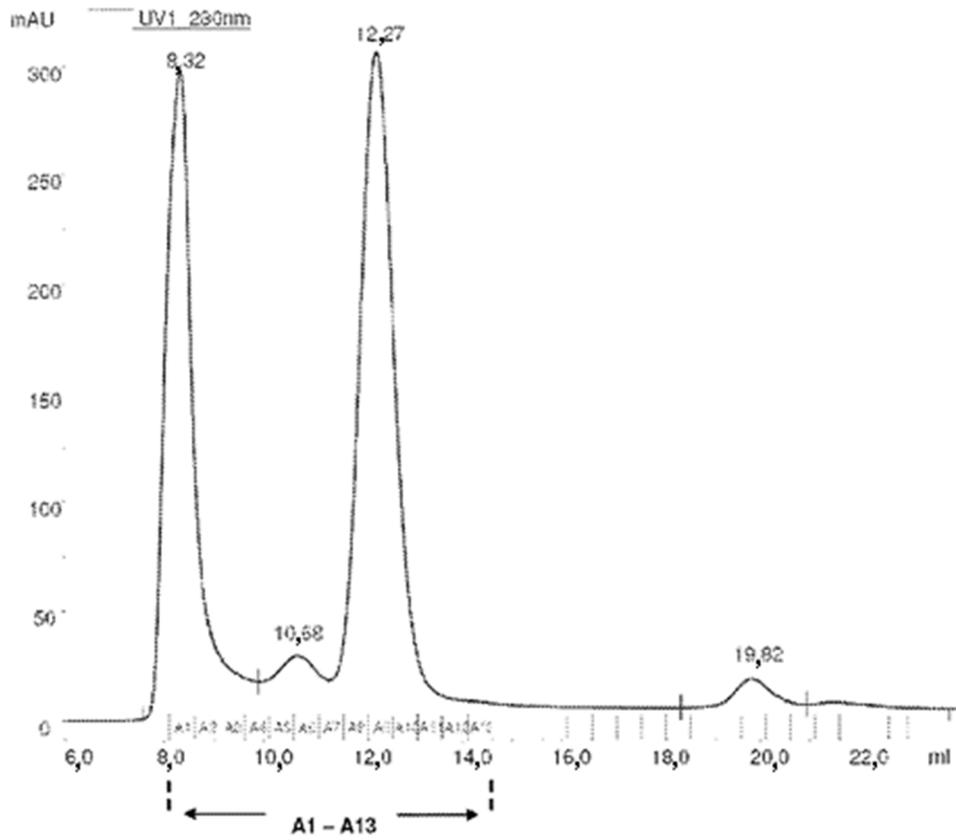


Figura 25

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones de SEC A1-A13

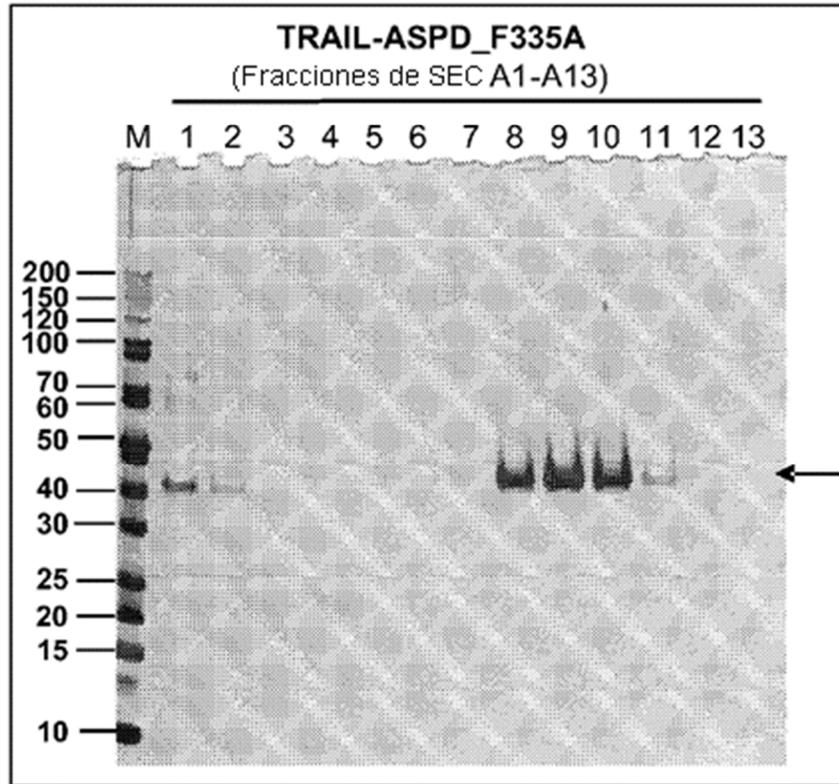


Figura 26

Efecto citotóxico de TRAIL-ASPD_F335A sobre células cancerosas humanas

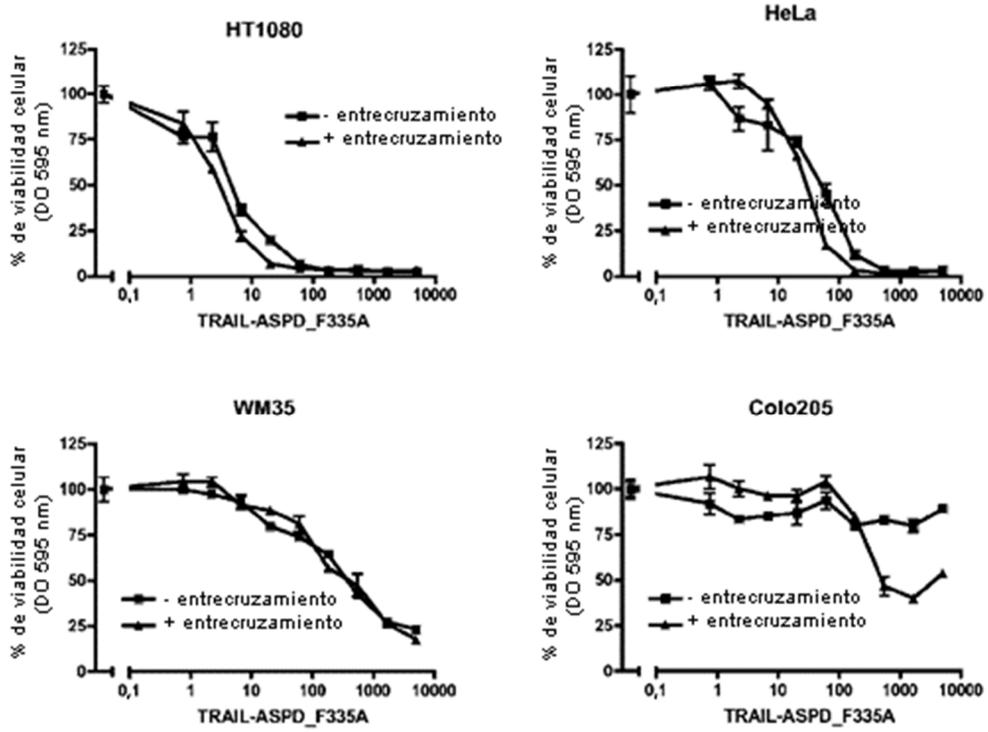


Figura 27

SEC de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad

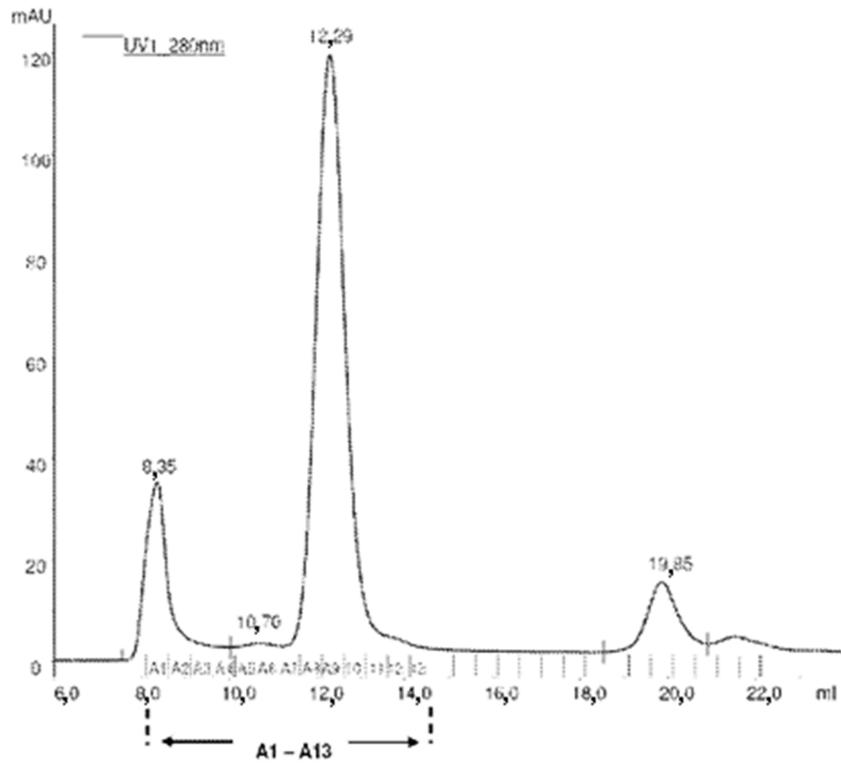


Figura 28

SDS-PAGE teñida con plata de SEC de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad

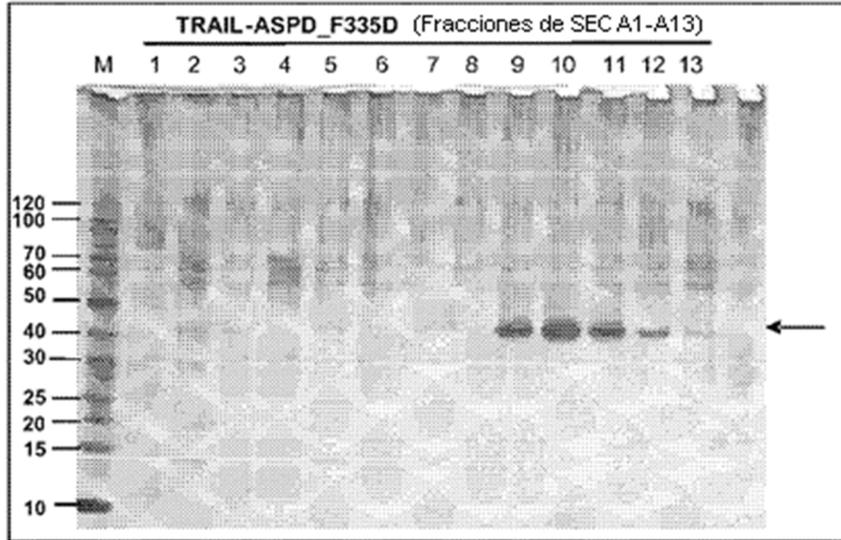


Figura 29

Efecto citotóxico de TRAIL-SPD_F335D sobre células cancerosas humanas

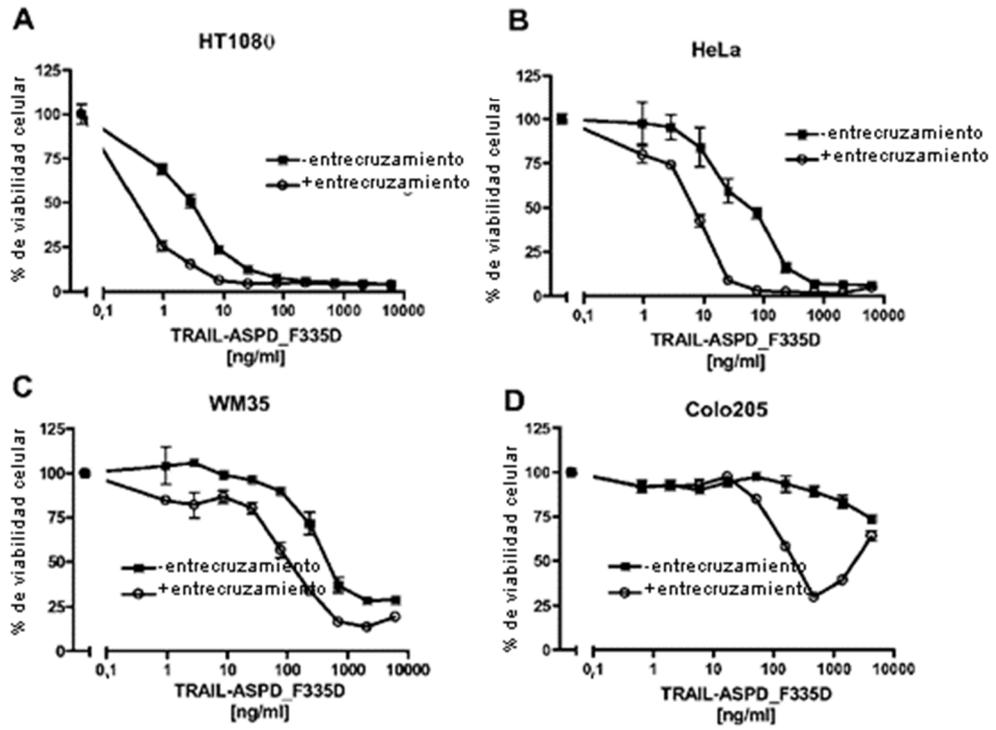


Figura 30

Unión de proteína de fusión TRAIL-ASPД a carbohidratos

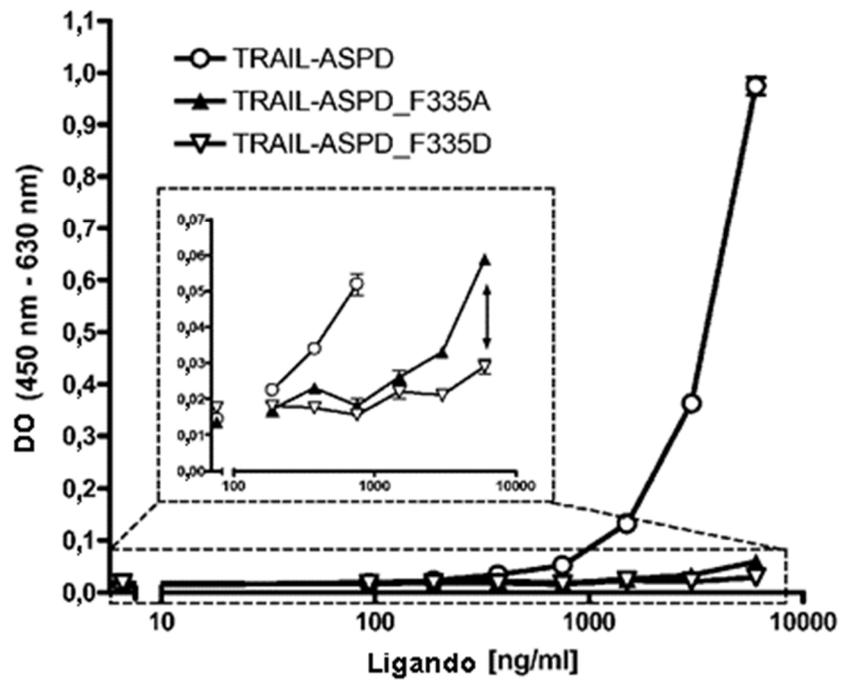


Figura 31

Farmacocinética de las proteínas de fusión TRAIL-ASPD (A) o TRAIL-ASPD_F335D (F)

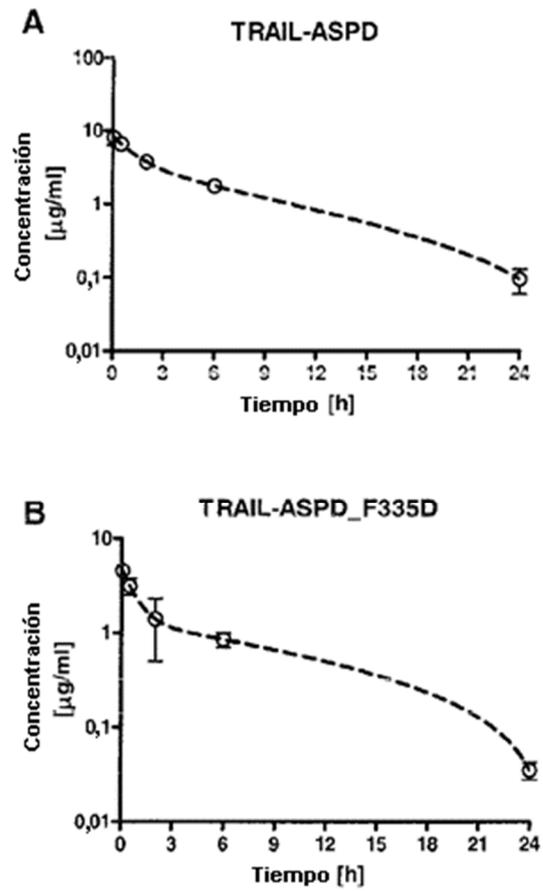


Figura 32

Actividad caspasa en hepatocitos humanos primarios

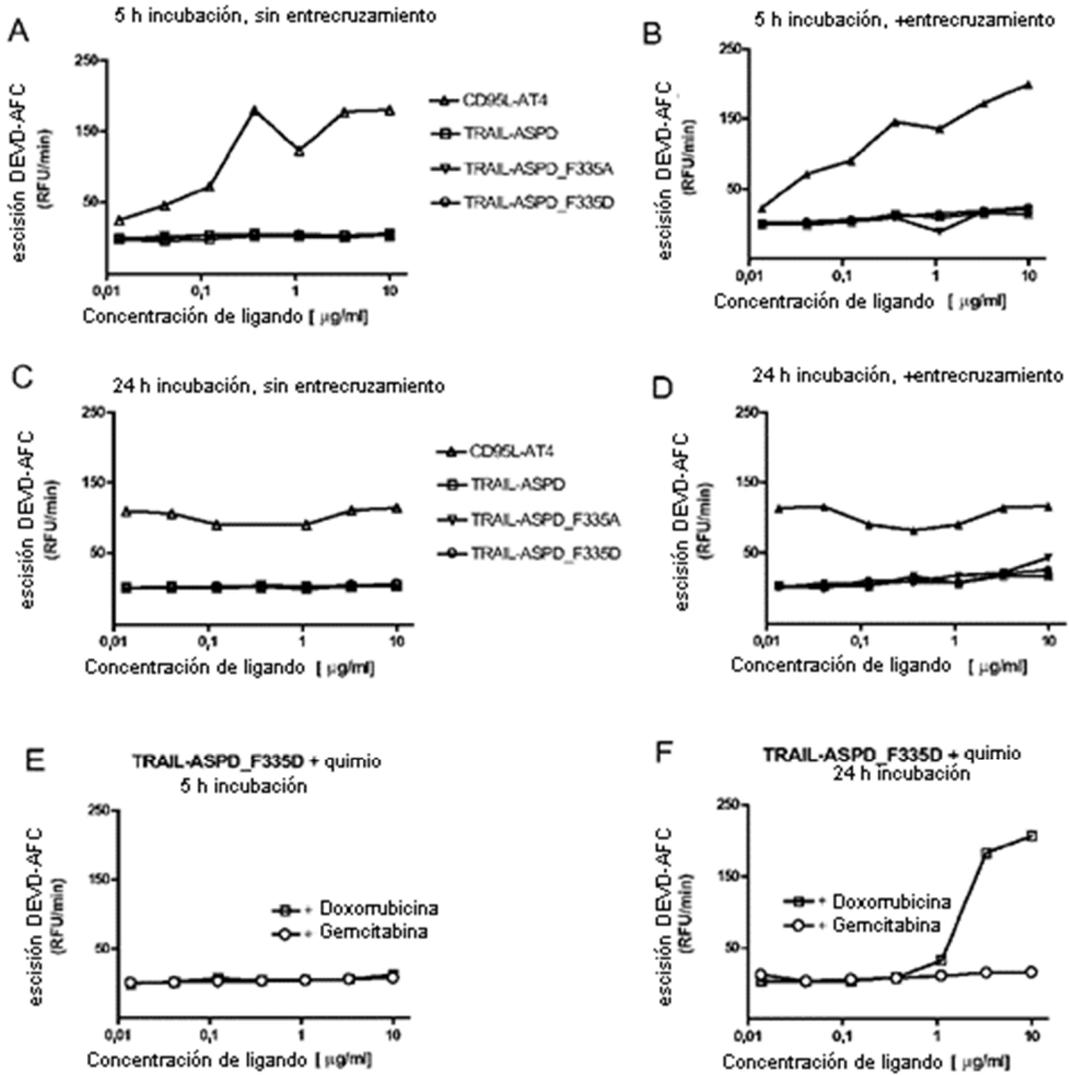


Figura 33

Transferencia de Western de sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con construcciones trimerizadas de APRIL

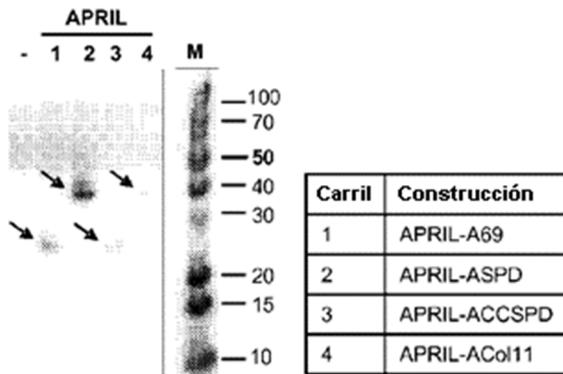


Figura 34

TACI-Fc se une a APRIL-ASPD

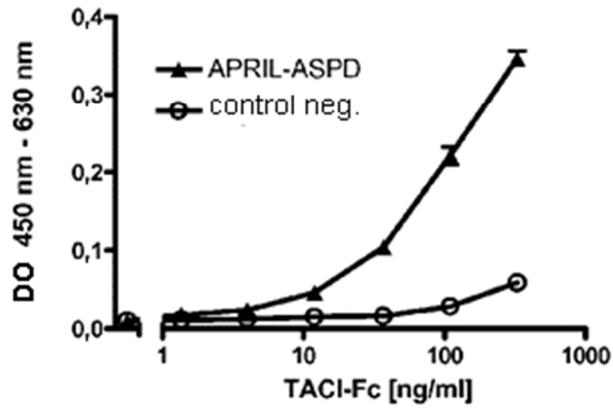


Figura 35

Dibujo esquemático de la organización de dominios de la colectina SP-D. Las regiones de colágeno y cuello trimerizan las colectinas y el extremo N-terminal oligomeriza los trímeros en tetrámeros o hexámeros de trímeros. El CRD media la unión a carbohidratos y también está implicado en la trimerización

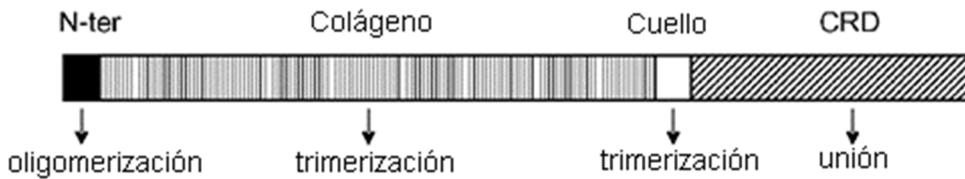


Figura 36

Imagen esquemática que representa la estructura general de proteínas TNF-SF. "■ ■ ■" indica la membrana celular, el extremo N-terminal localizado dentro de la célula, 1. plegamiento β del dominio de unión a receptor (RBD), 2. superficie de contacto de RBD y membrana celular, 3. sitio de escisión por proteasa.

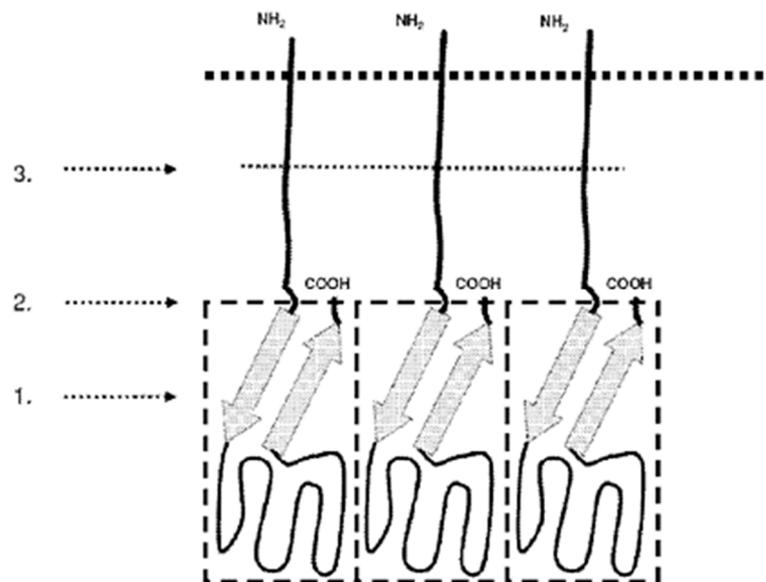


Figura 37

Imagen esquemática que representa la estructura del trímero TNF-SF nativo. Las estructuras cilíndricas (1) representan RBD, formando los extremos N-terminales (2) el tronco y conectando el RBD con la membrana celular

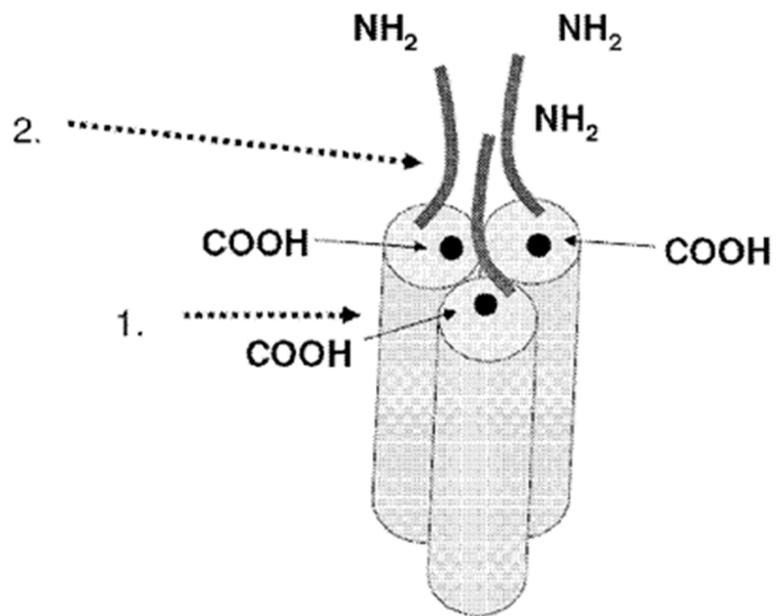


Figura 38

Imagen esquemática que representa la modificación introducida para minimizar TNF-SF-RBD. El tronco N-terminal está deletado.

1. plegamiento β anti-paralelo del dominio de unión a receptor (RBD),
2. superficie de contacto del RBD y la membrana celular

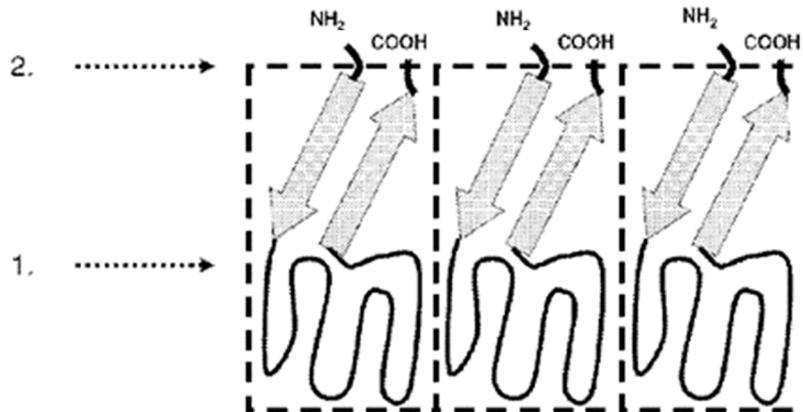


Figura 39

Gel de plata de Sp-sc006-ASPD-St purificada por afinidad.

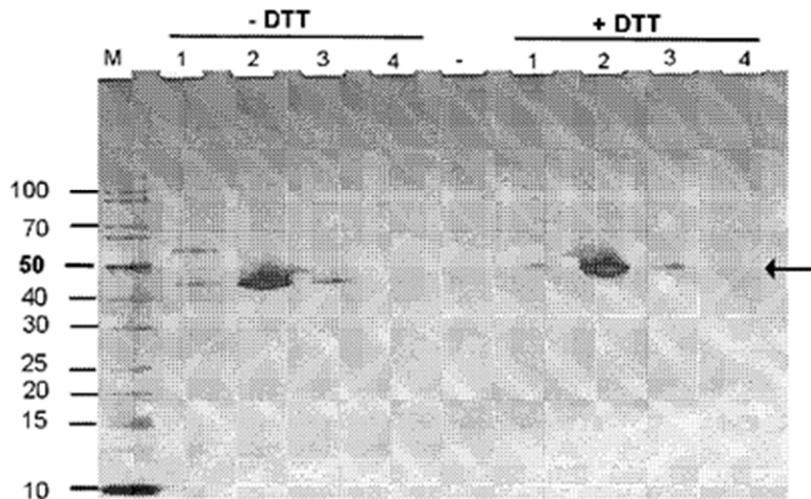


Figura 40

Cromatografía por exclusión de tamaño de Sp-sc006-ASPD-St purificada por afinidad.

