

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 418**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/KR2011/009914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12087017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11851725 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2657252**

54 Título: **Polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento del mismo y procedimiento de preparación del mismo**

30 Prioridad:

23.12.2010 KR 20100132955

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

25.07.2017

73 Titular/es:

**HANALL BIOPHARMA CO., LTD. (100.0%)
400-1 Sangseo-dong Daedeok-gu
Daejeon 306-120, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUNG WUK;
JUN, SUNG SOO;
PARK, SEUNG KOOK;
KIM, SONG YOUNG;
KIM, EUN SUN;
JEONG, JAE KAP;
KIM, HA NA y
SONG, YEON JUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 626 418 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

Polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento del mismo y procedimiento de preparación del mismo

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un polipéptido modificado del receptor-I de factor de necrosis tumoral humano o a un fragmento del mismo que es capaz de unirse a un factor de necrosis tumoral in vivo o ex vivo y a un procedimiento de producción del mismo.

Técnica antecedente

10 La inflamación es la respuesta de defensa del cuerpo que es inducida por la estimulación antigénica. Una respuesta inflamatoria puede empeorar patológicamente cuando la inflamación tiene lugar incluso después de la eliminación de sustancias antigénicas lesivas o una respuesta inflamatoria es inducida por un estímulo inapropiado tal como un autoantígeno. Dicha respuesta inflamatoria implica una variedad de citoquinas. En particular, como una citoquina que sirve para controlar la inflamación, se identificó un factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo, denominado como "TNF").

15 El TNF se descubrió originalmente como una proteína que elimina las células tumorales (Carswell et al., PNAS 72:3666-3670, 1975). TNF es una clase de citoquinas producidas por numerosos tipos de células, incluyendo monocitos y macrófagos, y está directamente involucrado en respuestas inflamatorias. Se han descrito previamente al menos dos TNF (TNF- α y TNF- β), y cada uno de ellos está activo como una molécula trimérica y se cree que inicia la señalización intracelular mediante reticulación de receptores (Engelmann et al., J. Biol. Chem., 265:14497-20 14504). Los TNF inducen respuestas inflamatorias in vivo para regular las respuestas inmunitarias mediadas por células y los mecanismos de defensa y tienen importantes efectos fisiológicos sobre un número de células diana diferentes (Selby et al., Lancet 1:483, 1988). Sin embargo, se demostró que un exceso de TNF da como resultado un estado patológico tal como artritis reumatoide, artritis degenerativa, psoriasis o enfermedad de Crohn y la supresión de TNF presenta efectos terapéuticos sobre las enfermedades (Feldmann et al., Nat. Med. 9:1245-1250, 25 2003).

El receptor del factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo, denominado como "TNFR") es un receptor de citoquina que se une al TNF.

30 Dos tipos de TNFR, conocidos como p55-TNFR I y p75-TNFR II, se han descubierto actualmente. La expresión de TNFR I se puede demostrar en casi cada célula de mamífero mientras que la expresión de TNFR II se limita en gran medida a las células del sistema inmunológico y las células endoteliales.

Los dos receptores de TNF muestran una similitud de secuencia de aminoácidos del 28% entre ellos. Ambos receptores tienen un dominio extracelular y tienen cuatro dominios ricos en cisteína.

35 La porción citoplásmica de TNFR I contiene un "dominio de muerte" que inicia la señalización apoptótica. TNFR II no tiene un dominio de muerte y su función aún no se ha definido claramente. Además, TNFR I y TNFR II presentan una diferencia en términos de afinidad para TNF- α que es un ligando. Se sabe que TNFR I presenta una afinidad 30 veces o mayor que la de TNFR II (Tartaglia et al., J. Biol. Chem. 268:18542-18548, 1993). Debido a esta diferencia de afinidad, se han hecho una variedad de intentos para el desarrollo de productos farmacéuticos con respecto al TNFR I.

40 El TNFR que se adhiere a la superficie de la célula se escinde mediante proteasa para producir TNFR soluble. El TNFR soluble neutraliza un exceso de TNF para controlar el nivel de TNF. En casos tales como la enfermedad autoinmune y la inflamación crónica, niveles excesivamente altos de TNF abruma la capacidad de autoregulación.

45 Con el fin de controlar artificialmente la señalización de TNF, se han intentado diversas estrategias de bloqueo de TNF que incluyen inhibición de la síntesis de TNF, inhibición de la secreción o desprendimiento de TNF e inhibición de la señalización de TNF. Entre los procedimientos de bloqueo de TNF, se ha aplicado un procedimiento de bloqueo de la señalización de TNF mediante la prevención de la unión de TNFR a TNF para el desarrollo de productos farmacéuticos. Por ejemplo, el etanercept, que se prepara fusionando una región extracelular de TNFR II a la región Fc de un anticuerpo, y los anticuerpos capaces de unirse a TNF, adalimumab e infliximab, se han utilizado globalmente como agente terapéutico para tratar artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, o similares.

50 Lenercept, que es una proteína de fusión de un anticuerpo Fc a un dominio extracelular de TNFR I producido aplicando la misma técnica que en el fármaco etanercept de la artritis antireumatoide, ha completado un ensayo clínico de fase II en Europa y EE.UU (Furst et al., J. Rheumatol. 30:2123-2126, 2003). Además, se han realizado investigaciones para un dímero de TNFR I y una molécula de TNFR I soluble pegilada (Carl et al., Ann. Rheum. Dis. 58:173-181, 1999).

- Además, como un enfoque para reducir la inmunogenicidad de TNFRI y aumentar la capacidad de TNFRI para unirse con TNF, se ha estudiado la modificación de las secuencias de aminoácidos. En particular, se conocen un mutante del TNFRI, contra el cual se ha disminuido la aparición de un anticuerpo mediante la sustitución parcial de la secuencia de aminoácidos del TNFRI, y un mutante del TNFRI, que tiene una capacidad aumentada de TNFRI para unirse con TNF (Patente americana US No. 7,144,987).
- Se ha hecho una investigación activa para encontrar un sitio activo responsable de la unión de TNFR con TNF, y se sabe que el cuarto dominio de TNFR no es esencial para la unión con TNF, y cuando la delección del segundo y tercer dominios resulta en pérdida de la actividad de unión al TNF (Corcoran et al., Eur. J. Biochem. 233:831-840, 1994). Además, se puede hacer que una cierta región del tercer dominio para la unión de TNFRI con TNF sea deficiente, y se sabe que la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 59 a 143 de un polipéptido de TNFRI humano (SEQ ID NO: 1) es una región que muestra una actividad biológica de TNFRI (Patente americana US No. 6,989,147).
- Por lo tanto, dado que la unión de TNFRI con TNF se hace en esta región, otras regiones pueden incluir grupos añadidos considerables, grupos eliminados o grupos sustituidos. Mientras tanto, con el fin de aumentar la biodisponibilidad, TNFRI se utiliza en forma de un fragmento del polipéptido de TNFRI en lugar de TNFRI de longitud completa. Con el fin de producir una inyección eficaz y una formulación oral capaces de minimizar la escisión de la proteasa y mejorar la permeabilidad celular, el TNFRI necesita prepararse lo más pequeño posible.
- Dado que los agentes terapéuticos proteicos se eliminan mediante procesos generales tales como el metabolismo durante la circulación in vivo, la filtración glomerular y la acción de proteasas en los tractos gastrointestinales, tejidos y sangre, existe dificultad en el suministro de una proteína terapéutica a un sitio diana, mientras se conserva una actividad intrínseca de la proteína in vivo. En particular, el aclaramiento de un fármaco por proteasa tiene efectos significativos sobre la semivida de una proteína terapéutica tras su administración mediante administración oral, inyección vascular, inyección intramuscular o similares.
- Se ha desarrollado un inhibidor del factor de necrosis tumoral humano, que es uno de los fármacos terapéuticos de proteínas y controla el TNF in vivo, en forma de una inyección, pero la administración de una inyección tiene problemas asociados con el dolor y el riesgo de infección. Por lo tanto, se requiere otro enfoque, tal como reducción de la frecuencia de inyección o administración oral. El aumento de la estabilidad de un inhibidor del factor de necrosis tumoral humano es esencial para este propósito, pero la degradación inducida por proteasa constituye un gran obstáculo para ello.
- Mientras tanto, mientras que el TNFRI de tipo silvestre regula las acciones intracelulares del TNF- α a través de la unión con TNF- α , la capacidad de unión del TNFRI no es tan alta como la de los anticuerpos. Por lo tanto, TNFRI de tipo silvestre es más pobre en la inhibición de TNF- α que los anticuerpos. El desarrollo de la proteína terapéutica utilizando TNFRI requiere la selección de un TNFRI capaz de fuerte acoplamiento con TNF- α .
- Por lo tanto, uno de los objetivos principales en el desarrollo de agentes terapéuticos de proteínas es mejorar la actividad biológica y la resistencia a las proteasas.
- El documento US 7,144,987 describe una proteína aislada del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con los aminoácidos 15-138 de SEQ ID NO:1, en el que dicha sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en las posiciones: 65, 66, 67, 69, 72, 75, 77, 78, 79, 80, 105, 107, 108, 111 y 113.
- El documento US 2004/0170975 describe una secuencia de ácido nucleico aislada, de una variante de empalme alternativa del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) la secuencia de ácido nucleico representada en una cualquiera de SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:8;
 - (ii) secuencias de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de (i); y
 - (iii) fragmentos de (i) o (ii) de al menos 20 b.p., siempre que dicho fragmento contenga una secuencia que no está presente, como un tramo continuo de nucleótidos, en la secuencia original de ácido nucleico del TNFR a partir de la cual las secuencias de (i) han sido variadas por empalme alternativo.
- El documento EP 2 221 314 describe un mutante soluble del receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFRII) que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 92Glu en comparación con el TNFRII de tipo silvestre. El mutante mejora la capacidad de citotoxicidad de neutralizar TNF α y linfotoxina.
- El documento WO 2012/036410 describe un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano para unirse a un factor de necrosis tumoral in vivo o ex vivo o a un fragmento del mismo. Dicho polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o del fragmento del mismo presenta una fuerza de unión mejorada al factor de necrosis tumoral.

El documento WO 01/64889 describe nuevas proteínas con actividad antagonista de TNF- α y ácidos nucleicos que codifican estas proteínas.

5 El documento WO 2011/049350 describe un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano para acoplarse a un factor de necrosis tumoral in vivo o ex vivo o a un fragmento del mismo. Dicho polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o del fragmento del mismo presenta una resistencia mejorada contra la actividad de proteasa in vivo y, de este modo, presentan una biodisponibilidad mejorada y una velocidad de absorción mejorada.

10 El documento EP 2 492 281 describe un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano para acoplarse a un factor de necrosis tumoral in vivo o ex vivo o a un fragmento del mismo. Dicho polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o del fragmento del mismo presenta una resistencia mejorada contra la actividad de proteasa in vivo y, de este modo, presenta biodisponibilidad mejorada y una velocidad de absorción mejorada.

15 Palladino M. et al., Nature Reviews. Drug Discovery, vol. 2, no. 9, 1 de octubre de 2003, páginas 736-746, describe la biología mediada por TNF- α y las terapias inyectables actuales en uso clínico y se centra en algunos de los nuevos enfoques terapéuticos con inhibidores orales de moléculas pequeñas.

Divulgación

Problema técnico

20 El objeto de la presente invención es proporcionar un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano (TNFRI) o un fragmento del mismo, que tiene una capacidad aumentada de unión a TNF in vivo o ex vivo, así como una resistencia mejorada a proteasas presentes en el tracto gastrointestinal, el citoplasma y la sangre.

Solución técnica

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas tienen los significados definidos a continuación.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término "receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano" o "polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano" (en lo sucesivo, denominado como "TNFRI" o "polipéptido del TNFRI") se refiere a un polipéptido que consiste en 455 aminoácidos derivados de un ser humano y capaces de unirse al TNF.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano" o "fragmento del polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano" (en lo sucesivo, denominado como "fragmento del TNFRI" o "fragmento del polipéptido del TNFRI") se refiere a un fragmento del TNFRI que tiene una secuencia de aminoácidos 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos correspondiente del TNFRI de longitud completa y que muestra una delección de al menos un residuo de aminoácido del TNFRI. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) suprimido(s) puede(n) estar localizado(s) en cualquier posición del polipéptido, tal como el extremo N, el extremo C o entre estos. El fragmento comparte al menos una propiedad biológica con TNFRI de longitud completa. Representativo es un fragmento que consiste en una secuencia de 105 o 126 o 171 aminoácidos que se extiende desde el residuo de aminoácido 41 del extremo N del TNFRI, cada uno de los cuales se designa en la presente memoria como TNFRI105, TNFRI126 y TNFRI 171, respectivamente.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término "variante del TNFRI" o "mutante del TNFRI" o "fragmento de la variante del TNFRI", "fragmento del mutante del TNFRI" o "polipéptido modificado del TNFRI", o "fragmento del polipéptido modificado de TNFRI" se refiere a un polipéptido del TNFRI o un fragmento del mismo que comparte una identidad de la secuencia de menos de 100% con el polipéptido del TNFRI o fragmento del TNFRI aislado de las células nativas o recombinantes como se define a continuación. Por lo general, el mutante del TNFRI tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 70% o más con un TNFRI de tipo silvestre o nativo o fragmento del TNFRI. La identidad de la secuencia es preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95%.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "mutante cuádruple" se refiere a un mutante con mutaciones en cuatro posiciones en la secuencia de aminoácidos de un receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "mutante quintuple" se refiere a un mutante con mutaciones en cinco posiciones en la secuencia de aminoácidos de un receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "mutante séxtuple" se refiere a un mutante con mutaciones en seis posiciones en la secuencia de aminoácidos de un receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término "mutante séptuple" se refiere a un mutante con mutaciones en siete posiciones en la secuencia de aminoácidos de un receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o fragmento receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "TNFRIm" se refiere a un fragmento del TNFRI que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en un número m de aminoácidos que se extienden desde el residuo de aminoácido 41 del extremo N de la secuencia de aminoácidos del TNFRI. Por ejemplo, el fragmento del TNFRI105 se refiere a un fragmento del TNFRI que tiene una secuencia de 105 aminoácidos que se extiende desde el residuo de aminoácido 41 del extremo N del TNFRI. Otro ejemplo es TNFRI126 que tiene una secuencia de 126 aminoácidos que se extiende desde el residuo de aminoácido 41 del extremo N del TNFRI.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término "Met-TNFRIm" se refiere a un fragmento del TNFRI que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en un número m de aminoácidos que se extienden desde el residuo de aminoácido 41 del extremo N de TNFRI en el cual la metionina originalmente ausente en secuencia de aminoácidos del TNFRI se ha añadido al extremo N con el fin de la expresión de TNFRI en E. coli.

20 Los aminoácidos que se producen en las diversas secuencias de aminoácidos proporcionados en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus conocidas abreviaturas de tres o una letra. Los nucleótidos que se producen en los diversos fragmentos de ácido nucleico están designados por las designaciones estándar de una sola letra utilizadas habitualmente en la técnica.

El símbolo "xAz", como se usa en la presente memoria, se refiere a la sustitución del aminoácido x en la posición A por el aminoácido z en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, K48Q se refiere a un residuo de glutamina (Gln) sustituido por un residuo de lisina (Lys) en la posición 48.

25 La presente invención se refiere a un polipéptido modificado del TNFRI o a un fragmento del mismo que tiene una capacidad aumentada para unirse con TNF- α in vivo y/o ex vivo, así como una resistencia a la proteasa mejorada, un procedimiento de producción del mismo y su uso.

30 Llevando a la presente invención, la investigación intensiva y exhaustiva de mutantes de TNFR1 con afinidad mejorada para TNF y en la estabilidad in vivo y/o in vitro conducida por los presentes inventores, dio como resultado el hallazgo de que la sustitución en cuatro o más residuos de aminoácidos dentro del sitio TNFRI al que se espera que se una el TNF, provoca una mejora en la afinidad por TNF. Sin embargo, debido a que los mutantes resultantes que tenían mayor afinidad por el TNF eran susceptibles a la degradación enzimática, se adicionaron modificaciones adicionales para aumentar la resistencia a la proteasa a los mutantes para seleccionar mutante(s) con resistencia a la proteasa similar o superior al TNFRI nativo.

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo que tiene una capacidad mejorada para unirse con TNF, así como resistencia a la proteasa, sustituyendo los aminoácidos en cinco o más posiciones en sitios específicos de la secuencia de aminoácidos de TNFRI nativo.

40 Establemente unidos a TNF, los polipéptidos modificados del TNFRI o fragmentos de los mismos de acuerdo con la presente invención pueden inhibir eficazmente las acciones del TNF. Además, se pueden preparar en células microbianas, así como células animales porque su actividad es independiente de la modificación con una cadena de azúcar.

A continuación, se dará una descripción más detallada de la presente invención.

La presente invención proporciona un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNFRI) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

45 una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI171) que consiste en los aminoácidos 41-211 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de tipo silvestre representado por SEQ ID NO: 1;

50 una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI126) que consiste en los aminoácidos 41-166 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de tipo silvestre representado por SEQ ID NO: 1; y

- una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI105) que consiste en los aminoácidos 41-145 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de tipo silvestre representado por SEQ ID NO: 1.
- 5 La presente invención también proporciona un receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNFRI) modificado como se definió anteriormente, en el que la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI171 comprende además una sustitución de E por P en la posición 93; o
- 10 la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI126 comprende además una sustitución de E por P en la posición 93.
- Además, la presente invención proporciona un receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNFRI) modificado como se definió anteriormente, en el que la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI171 comprende además una modificación de un residuo de aminoácido en la posición 161 o 207; o
- 15 la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI126 comprende además una modificación de un residuo de aminoácido en la posición 161.
- La modificación está destinada a producir una mejora en la capacidad para unirse al TNF, así como para garantizar la misma o mayor resistencia a proteasas en comparación con el polipéptido de TNFRI de tipo silvestre o del fragmento del mismo. Representativa es la sustitución de aminoácidos. Sin embargo, siempre que proporcione la capacidad de unión aumentada y la resistencia equivalente o mejorada a la degradación enzimática, se puede utilizar cualquier modificación en la presente invención, incluyendo modificaciones químicas en los residuos de aminoácidos en las mismas posiciones, tales como modificaciones postraduccionales, entre las cuales están la glicosilación con una unidad estructural carbohidrato, acilación (por ejemplo, acetilación o succinilación), metilación, fosforilación, hasilación, carbamilación, sulfatación, prenilación, oxidación, guanidinación, amidinación, carbamilación (por ejemplo, carbamoilación), trinitrodenilación, nitración, y PEGilación.
- 20 En el caso de la modificación de una sustitución de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre del factor-1 de necrosis tumoral humano (TNFRI) representado por SEQ
- 25 ID NO:1, L en la posición 68 está sustituida con V; S en la posición 92 con I, L, F, M, W, Q, T, Y, K, H, E, A, V, P, N o R; E en la posición 93 con P; H en la posición 95 con F; R en la posición 97 con P, L o I; H en la posición 98 con A o G; K en la posición 161 con Q o N; E en la posición 200 con Q; y D en la posición 207 con N. Preferiblemente, S en la posición 92 está sustituida con I, M o H; R en la posición 97 con P.
- 30 Más preferiblemente, la presente invención proporciona un receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano modificado o un fragmento del mismo, que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G, L68V/S92M/H95F/R97P/H98G, L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q,
- 35 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N,
L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/D207N,
L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q,
L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N,
L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N,
- 40 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q,
L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N,
L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/D207N,
L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, y
- 45 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del TNFRI humano de tipo silvestre, representado por SEQ ID NO: 1.
- El término "fragmento funcionalmente activo" del polipéptido del TNFRI humano de tipo silvestre establecido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, significa una parte del polipéptido del TNFR1 humano de tipo silvestre que realiza sustancialmente las mismas funciones que las del polipéptido intacto. En particular, la presente invención emplea una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 41-211 (SEQ ID NO: 2; TNFRI171) de la secuencia de aminoácidos del TNFRI humano nativo como se establece en SEQ ID NO: 1; una
- 50

5 secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 41-166 (SEQ ID NO: 3; TNFRI126) de la secuencia de aminoácidos de TNFRI humano nativo como se establece en SEQ ID NO: 1; y una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos 41-145 (SEQ ID NO: 4; TNFRI105) de la secuencia de aminoácidos de TNFRI humano nativo como se establece en SEQ ID NO: 1. Para referencia, es bien conocido que un fragmento que se extiende desde la posición 59 a la posición 143 en la secuencia de aminoácidos de polipéptido del TNFRI humano (SEQ ID NO: 1) presenta la actividad biológica del TNFRI (Patente americana US No. 6,989,147).

10 El término "fragmento" del polipéptido modificado del TNFRI se refiere a una parte del polipéptido modificado del TNFRI que tiene sustancialmente el mismo efecto que el polipéptido modificado del TNFRI y que puede ser preparado fácilmente por los expertos en el arte.

Dentro del alcance del polipéptido del TNFR1 modificado y del fragmento del mismo que se mejora en afinidad por TNF y tiene la misma o mejorada resistencia a proteasas, se incluyen los descritos a continuación.

15 También, la presente invención proporciona un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano como se definió anteriormente, que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 41-211 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido humano de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral, representado por SEQ ID NO: 1, con una sustitución del aminoácido de K en la posición 161 con Q o N, o D en la posición 207 con N, además de las sustituciones mencionadas anteriormente. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de la presente invención contiene una modificación seleccionada entre

- 20 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N,
 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/D207N,
 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N,
 25 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N,
 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N,
 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/D207N,
 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, y
 30 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N.

35 También, la presente invención proporciona un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano como se definió anteriormente, que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 41-166 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido humano de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral, representado por SEQ ID NO: 1, con una sustitución del aminoácido de K en la posición 161 con Q o N además de las sustituciones mencionadas anteriormente. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de la presente invención contiene una modificación seleccionada entre

- L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N,
 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 40 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N,
 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q,
 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N,
 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, y
 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N.

45 Se describe además un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano o un fragmento del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología de secuencia de al menos 90%,

al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% con el del TNFRI humano de tipo silvestre, representado por SEQ ID NO: 1, con modificaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 68, 92, 95, 97 y 98 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización, la modificación es la sustitución de aminoácidos de L por V; S por I, L, F, M, W, Q, T, Y, K, H, E, A, V, P, N o R; H por F; R por P, L o I; y H por A o G en las posiciones respectivas correspondientes a las posiciones 68, 92, 95, 97 y 98 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El polipéptido modificado del factor de necrosis tumoral humano-1 o el fragmento del mismo puede comprender además una sustitución del aminoácido de K por Q o N; o D por N en las posiciones respectivas correspondientes a las posiciones 161 y 207 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Se describe además un polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la de SEQ ID NO: 1, con las modificaciones de aminoácido correspondientes o mencionadas anteriormente impuestas sobre el mismo. Como se utiliza en la presente memoria, el término "un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la de SEQ ID NO: 1" significa un polipéptido del TNFRI que tiene una modificación de aminoácidos, tal como sustitución, delección, adición de aminoácidos, en dicho número y tipo que no quita su actividad de TNFRI inherente. Se describe además un polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología de secuencia de al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos

97%, al menos 98% o al menos 99% con la de SEQ ID NO: 1, con una modificación correspondiente a la modificación de aminoácidos mencionada anteriormente.

La variante antes mencionada tiene una homología de secuencia de más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o más del 99% con un polipéptido que tiene la secuencia como se establece en SEQ ID NO: 1, excepto en las modificaciones de aminoácidos antes mencionadas de la presente invención, e incluye isoformas variantes alélicas de polipéptido de TNFRI humano, isoformas específicas de tejido y variantes alélicas del mismo, variantes sintéticas con una o más mutaciones, sustituciones, delecciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, moléculas sintéticas preparadas por traducción de ácidos nucleicos, proteínas aisladas de tejidos y células humanos y no humanos, polipéptidos del TNFRI quiméricos y formas modificadas de los mismos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "modificación correspondiente" se refiere a una modificación de residuos comparada en medio de o entre polipéptidos que son otras isoformas. Es decir, la "modificación correspondiente" significa una modificación correspondiente a la modificación de aminoácidos de la presente invención para mejorar la capacidad de unión y mantener o mejorar la resistencia a la proteasa en la posición que tiene un residuo identificado para ser funcionalmente inmutable al alinear la secuencia con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del TNFRI humano nativo como se establece en SEQ ID NO: 1. Los expertos en el arte pueden identificar fácilmente modificaciones de residuos que se corresponden entre o en medios de dichos polipéptidos. Por ejemplo, al alinear las secuencias de polipéptidos de TNFRI, un experto en el arte puede identificar los residuos correspondientes, utilizando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un polipéptido del TNFRI que contiene la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de SEQ ID NOS: 39, 44, 49, 54, 55, 61-72, 75, 78, 81, 82 o 86-98.

El polipéptido modificado del TNFRI de acuerdo con la presente invención puede contener además otras modificaciones químicas tales como modificaciones postraduccionales de una proteína, por ejemplo, glicosilación por una unidad estructural carbohidrato, acilación (por ejemplo, acetilación o succinilación), metilación, fosforilación, hasilación, carbamilación, sulfatación, prenilación, oxidación, guanidinación, amidinación, carbamilación (por ejemplo, carbamoilación), trinitrodenilación, nitración, y PEGilación, con el fin de aumentar la resistencia a las proteasas, disminuir la inmunogenicidad o mantener o potenciar la actividad biológica, además de las modificaciones de aminoácidos antes mencionadas.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención proporciona un polipéptido multimérico (o "complejo polipeptídico") que comprende dos o más copias del polipéptido del TNFRI humano modificado.

Además, la presente invención proporciona un gen que codifica el polipéptido del TNFRI anterior.

El gen que codifica un polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención incluye un gen diseñado para la optimización de la expresión en *E. coli*. Debido a la diferencia en el codón del gen entre humanos y *E. coli*, cuando un gen humano se expresa en *E. coli*, un rendimiento de expresión del gen es bajo. Por esta razón, en la presente invención se puede utilizar un gen diseñado para ser apropiado para la expresión en *E. coli* basado en un gen del TNFRI humano, por ejemplo, el gen del TNFRI de SEQ ID NO: 5. Dicho gen presenta un nivel de expresión más alto que un gen del TNFRI humano, cuando se inserta en un vector de expresión de *E. coli* (por ejemplo, pET44a (No. de cat.: 71122-3, Novagen)) y luego se expresa en una célula de *E. coli* sin adición de codón (por ejemplo: BL21(DE3)). Por lo tanto, utilizando el gen anterior, un fragmento del TNFRI y un mutante del TNFRI se pueden producir eficazmente en *E. coli*.

Además, la presente invención proporciona un vector que contiene el mismo gen. El vector que se puede utilizar para la introducción de un gen en la presente invención puede ser un vector conocido en la técnica, preferiblemente un vector que tiene un mapa de escisión de la FIG. 1.

Además, la presente invención proporciona una célula (célula microbiana o animal) transformada con el vector. La célula microbiana o animal que se puede utilizar para la transformación de un vector en la presente invención puede ser una célula microbiana o animal conocida para la transformación usada en la técnica, preferiblemente una célula de *E. coli*, una célula CHO o una célula HEK293, y más preferiblemente una célula de *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* BL21(DE3)).

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de TNFRI utilizando *E. coli*.

El TNFRI se puede producir utilizando una célula animal (Bernie et al., *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301: 418-426, 2002; y Scallon et al., *Cytokine*. 7:759-770, 1995).

Dado que cuando se expresa en *E. coli*, TNFRI se expresa en forma de un cuerpo de inclusión que no es conformacionalmente activo, se requiere un proceso de repliegamiento en una proteína activa (Silvia et al., *Analytical Biochemistry* 230: 85-90, 1995; y Karin et al., *Cytokine*. 7:26-38, 1995). Por lo tanto, el polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención se puede producir expresando TNFRI en forma de un cuerpo de inclusión en *E. coli*, replegando el TNFRI expresado en TNFRI activo y purificando el TNFRI activo utilizando cromatografía de filtración en gel o similares. Alternativamente, el polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención se puede producir en forma de una proteína soluble en lugar de un cuerpo de inclusión en *E. coli*, utilizando un procedimiento de expresión que implica la unión de una proteína de fusión hidrófila, procedimiento de cultivo de baja temperatura, o similares. Como ejemplo, el TNFRI como proteína soluble se produce en *E. coli* mediante la unión de una proteína NusA hidrófila al extremo N de una proteína del TNFRI.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido del TNFRI, que incluye la introducción del gen en un vector apropiado, la transformación del vector en una célula huésped para dar un transformante y el cultivo del transformante en un medio para expresar el polipéptido del TNFRI o un fragmento del mismo.

Además, la presente invención proporciona el polipéptido modificado del TNFRI anteriormente para uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad mediada por TNF o síntoma interno (en lo sucesivo, denominada como "enfermedad mediada por TNF"). Ejemplos de la enfermedad mediada por TNF, las secuelas relacionadas y los síntomas asociados con ella incluyen: síndrome de dificultad respiratoria en adultos; anorexia; cáncer (por ejemplo, leucemia); síndrome de fatiga crónica; rechazo de injerto contra huésped; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad neuroinflamatoria; lesión por reperfusión/isquémica, que incluyen isquemia cerebral, lesión cerebral como resultado de un traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración; diabetes (por ejemplo, diabetes mellitus tipo 1 de inicio juvenil); esclerosis múltiple; enfermedades oculares; dolor; pancreatitis; fibrosis pulmonar; enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis sistémica, vasculitis, vasculitis cerebral, síndrome de Sjogren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes); shock séptico; efectos secundarios inducidos por la radioterapia; lupus eritematoso sistémico; enfermedad de la articulación temporomandibular; tiroiditis y trasplante de tejido. Las enfermedades mediadas por TNF son bien conocidas en la técnica.

Además, la presente invención proporciona una composición para uso en la prevención o tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad mediada por TNF, que contiene el polipéptido modificado del TNFRI.

Además, la presente invención proporciona una composición para uso en la prevención o tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad mediada por TNF, que contiene un gen que codifica el polipéptido modificado del TNFRI, un vector que contiene el gen o una célula microbiana o animal transformado con el vector.

Además, la presente invención proporciona el polipéptido modificado del TNFRI anteriormente para uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de artritis reumatoide o enfermedad mediada por TNF, que comprende administrar la composición para la prevención o tratamiento de la enfermedad mediada por TNF a un sujeto que lo necesite.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral, sublingual, rectal, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intraarterial. La composición farmacéutica se puede preparar para almacenamiento o administración mezclando un mutante del TNFRI que tenga la pureza deseada con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones reguladoras tales como fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos de longitud) que incluyen poliarginina y proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; y otros carbohidratos que incluyen monosacáridos, disacáridos, celulosa y derivados de los mismos, glucosa, manosa o

dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en forma de una composición estéril para inyección de acuerdo con un procedimiento convencional conocido en la técnica. La composición estéril para inyección puede contener una solución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal natural tal como aceite de sésamo, cacahuete o aceite de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo. La composición estéril para inyección se puede incorporar en una solución reguladora, un conservante, un antioxidante y similares de acuerdo con una práctica farmacéutica aceptada.

Un polipéptido modificado del TNFRI, o un gen que codifica el mismo, o un vector que contiene el mismo gen, o una célula microbiana o animal transformada con el vector de acuerdo con la presente invención se incorpora en una cantidad terapéuticamente eficaz para la enfermedad mediada por TNF en una composición farmacéutica.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad/dosis de un ingrediente activo o composición farmacéutica que es suficiente para provocar una respuesta eficaz (esto es, una respuesta biológica o médica de un animal o un ser humano buscado por un investigador, un veterinario, un médico u otro clínico) tras la administración a un sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz está destinada a abarcar una cantidad para producir alivio sintomático de la enfermedad o trastorno que se está tratando. Es evidente para los expertos en el arte que la cantidad terapéuticamente eficaz y la frecuencia de dosificación del ingrediente activo de la presente invención variarán dependiendo de los efectos deseados. Por lo tanto, una dosis óptima puede ser determinada fácilmente por los expertos en el arte y se puede ajustar de acuerdo con diversos factores tales como el tipo y la gravedad de la enfermedad, los contenidos de ingredientes activos y otros ingredientes en la composición, la forma de dosificación y la edad, peso, estado físico y sexo del sujeto, así como dieta, tiempo de administración y vía y velocidad de excreción de la composición, duración del tratamiento y medicación concurrente. Por ejemplo, para adultos, el mutante del TNFRI de la presente invención se administra preferiblemente a una dosis de 0.01 a 1.000 mg/kg una vez al día, y más preferiblemente de 0.1 a 100 mg/kg una vez al día.

El polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede administrar como una adición para otras terapias y se puede administrar con otras composiciones farmacéuticas apropiadas para la indicación que se está tratando. El polipéptido del TNFRI o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención y cualquiera de uno o más fármacos antiinflamatorios conocidos o nuevos se pueden administrar por separado o en combinación. La información con respecto a los compuestos correspondientes a tales fármacos se puede encontrar en "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy", Sixteenth Edition, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, N.J. (1992) e in "Pharmaprojects", PJB Publications Ltd.

Como un ejemplo del uso de combinación, el polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con fármacos de primera línea para el control de la inflamación, clasificados como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF, incluyendo inflamación aguda y crónica tales como enfermedades reumáticas (por ejemplo, enfermedad de Lyme, artritis juvenil (reumatoide), osteoartritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide y artritis inducida por estafilococos ("séptico")).

Como otro ejemplo del uso de combinación, el polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con cualquiera de uno o más fármacos antirreumáticos de acción lenta (SAARDs) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs), ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF y esclerosis múltiple como se definió anteriormente.

Como un ejemplo adicional del uso de combinación, el polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con cualquiera de uno o más inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF como se definió anteriormente.

Además, el polipéptido de TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con cualquiera de uno o más fármacos antibacterianos, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF como se definió anteriormente.

El polipéptido del TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF como se definió anteriormente, en combinación con cualquiera de uno o más compuestos que se dan a continuación: factor estimulante de colonias de granulocitos; talidomida; tenidap; tiapafant; nimesulida; panavir; rolipram; sulfasalazina; balsalazida; olsalazina; mesalazina; prednisolona; budesonida; metilprednisolona; hidrocortisona; metotrexato; ciclosporina; péptido T; clorhidrato de (1R,3S)-cis-1-[9-(2,6-diaminopurinil)]-3-hidroxi-4-ciclopenteno; (1R,3R)-trans-1-[9-(2,6-diamino)purina]-3-acetoxiciclopentano; clorhidrato de (1R,3R)-trans-1-[9-adenil]-3-azidociclopentano y (1R,3R)-trans-1-[6-hidroxi-purin-9-il]-3-azidociclopentano.

El polipéptido de TNFRI de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con uno o más inhibidores de TNF adicionales para el tratamiento de enfermedades mediadas por TNF como se definió anteriormente. Tales inhibidores de TNF incluyen compuestos y proteínas que bloquean la síntesis in vivo o la

liberación extracelular de TNF: por ejemplo, anticuerpos antiTNF incluyendo el anticuerpo MAK 195F Fab (Holler et al. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); anticuerpo monoclonal antiTNF CDP 571 (Rankin et al. (1995), British Journal of Rheumatology, 34:334-342); BAY X 1351, anticuerpo monoclonal del factor de necrosis tumoral murino ((Kieft et al. (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9); anticuerpo monoclonal antiTNF CenTNF cA2 (Elliott et al. (1994), Lancet, 344:1125-1127 y Elliott et al. (1994), Lancet, 344:1105-1110).

Además, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica que contiene el polipéptido del TNFRI. Preferiblemente, la preparación farmacéutica de la presente invención contiene además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La preparación farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de una formulación farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en una formulación oral, un inhalador, una inyección, una formulación transmucosa y una aplicación externa.

La preparación farmacéutica de la presente invención contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un diluyente, conservante, solubilizante, emulsionante, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable.

Además, la preparación farmacéutica de la presente invención contiene aditivos incluyendo solución reguladora (por ejemplo, solución reguladora Tris, solución reguladora acetato o solución reguladora fosfato), detergentes (por ejemplo, Tween 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol) que se han utilizado comúnmente en la técnica. Los aditivos se pueden incorporar en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico o en liposomas. La preparación farmacéutica de la presente invención puede contener ácido hialurónico con el fin de promover una duración sostenida en circulación. La preparación farmacéutica de la presente invención puede contener opcionalmente diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos farmacéuticamente aceptables que sirven como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos, incluyendo, pero sin estar limitados a, monolaurato de polioxietilensorbitán, almidones, sacarosa, dextrosa, goma de acacia, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao y aceite de teobroma.

La preparación farmacéutica de la presente invención también contiene aditivos inertes que proporcionan protección contra el medio estomacal y liberación del material biológicamente activo en el intestino.

La preparación farmacéutica de la presente invención se prepara utilizando técnicas conocidas, incluyendo procesos de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o formación de comprimidos.

La preparación farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de un líquido (por ejemplo, una suspensión, un elixir y/o una solución) o un sólido (por ejemplo, un polvo, un comprimido y/o una cápsula) o se puede formular en forma de depósito. La preparación de depósito es por lo general más larga que las preparaciones sin depósito. La preparación de depósito se prepara utilizando materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, una emulsión en un aceite apropiado) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Además, la preparación farmacéutica de la presente invención contiene un sistema de suministro tal como liposoma o emulsión. Ciertos sistemas de suministro son útiles para preparar ciertas preparaciones farmacéuticas incluyendo las que contienen compuestos hidrófobos. En ciertas realizaciones, se utilizan solventes orgánicos tales como sulfoxido de dimetilo. En otro aspecto de la presente invención, la preparación farmacéutica de la presente invención contiene una o más moléculas de suministro específicas de tejido diseñadas para suministrar agentes farmacéuticos a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la preparación farmacéutica contiene un liposoma revestido con un anticuerpo específico de tejido.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica de la presente invención se puede formular en una forma de dosificación sólida oral. Las formas de dosificación sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, pastillas o pellas.

También, se puede utilizar encapsulación liposomal o proteinoide para formular la composición de la presente invención. Los liposomas se pueden preparar a partir de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidietanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI) y esfingomiélna (SM); y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxietilacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol y poliaspartamida.

Si es necesario, el polipéptido del TNFRI contenido en la preparación farmacéutica de la presente invención puede modificarse químicamente de manera que la administración oral sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos una unidad estructural al polipéptido mutante del TNFRI, donde la unidad estructural puede ser una sustancia que confiere resistencia a la proteasa o ayuda a la captación en la corriente sanguínea desde el estómago o el intestino. Preferiblemente, la unidad estructural para la modificación química puede ser una unidad estructural para la modificación química para aumentar una estabilidad general de la preparación farmacéutica de la presente invención y por lo tanto aumentar su tiempo de circulación en el cuerpo.

Ejemplos de la unidad estructural incluyen polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Otros polímeros que se pueden usar son poli-1,3-dioxano y poli-1,3,6-trioxocano. La más preferida es una unidad estructural de polietilenglicol (PEGilación).

- 5 Como portador para potenciar la absorción de la preparación farmacéutica de la presente invención en la forma de dosificación oral, una sal de un aminoácido alifático modificado, tal como N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino) caprilato de sodio (SNAC), puede ser usado.

La preparación farmacéutica de la presente invención se puede formular como multiparticulados finos en forma de gránulos o pellas de un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. En este caso, el producto farmacéutico puede estar en forma de una cápsula. La preparación multiparticulada puede estar en forma de un comprimido o tapón en polvo, ligeramente comprimido. La preparación se puede preparar por compresión.

La preparación farmacéutica de la presente invención también se puede formular en forma de, por ejemplo, encapsulación de microesferas o liposomas con incorporación adicional de colorantes y agentes aromatizantes.

- 15 Además, con el fin de potenciar la captación del polipéptido del TNFRI que es un ingrediente activo en la preparación farmacéutica de la presente invención, se pueden usar aditivos incluyendo ácidos grasos tales como ácido oleico o ácido linoleico.

La preparación farmacéutica de la presente invención puede ser una formulación de liberación controlada. El polipéptido del TNFRI, que es un ingrediente activo en dicha formulación, se puede incorporar en un portador inerte que permite la liberación controlada por mecanismos de ya sea difusión o disolución. Además, la formulación de liberación controlada puede contener una matriz de desintegración lenta, por ejemplo, alginato o polisacárido. Otra forma de la formulación de liberación controlada se puede basar en un sistema de liberación oral de liberación osmótica (OROS, Alza Corp.). En la formulación de liberación controlada, el mutante del TNFRI que es el ingrediente activo de la presente invención está encerrado en una membrana semipermeable que permite que el agua entre y empuje el ingrediente activo a través de una única abertura pequeña debido a efectos osmóticos. La formulación de liberación controlada de la presente invención puede tener un recubrimiento entérico para presentar un efecto de liberación retardada del fármaco.

La preparación farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de un comprimido recubierto con película. Los materiales utilizados en el recubrimiento de película se dividen en dos grupos. El primer grupo es un material no entérico e incluye metil celulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboxi-metilcelulosa sódica, povidona y polietilenglicol. El segundo grupo consiste en materiales entéricos tales como ésteres de ácido ftálico. En detalle, se selecciona un polímero entérico como el material entérico se selecciona del grupo que consiste en un derivado entérico de celulosa, un copolímero acrílico entérico, un copolímero maleico entérico, un derivado de polivinilo entérico y una combinación de los mismos. El derivado de celulosa entérica es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en succinato de acetato de hipromelosa, ftalato de hipromelosa, ftalato de hidroximetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa, succinato de acetato de celulosa, maleato acetato de celulosa, ftalato de benzoato de celulosa, ftalato de propionato de celulosa, ftalato de metilcelulosa, carboximetilcelulosa y ftalato de etilhidroxietil celulosa. El copolímero acrílico entérico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un copolímero de estireno-ácido acrílico, un copolímero de ácido acrílico-metacrilato, un copolímero de ácido acrílico-metacrilato de metilo, un copolímero de acrilato de butilo-estireno-ácido acrílico, un copolímero de ácido metacrílico-metacrilato de metilo (por ejemplo, Eudragit L 100, Eudragit S, Degussa), un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo (por ejemplo, Eudragit L 100-55, Degussa) y copolímero de acrilato de metilo-ácido metacrílico-acrilato de octilo. El copolímero maleico entérico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un copolímero de acetato de vinilo-anhídrido maleico, un copolímero de estireno-anhídrido maleico, un copolímero de estireno- monoéster de ácido maleico, un copolímero de vinilmetiléter-anhídrido maleico, un copolímero de etileno-anhídrido maleico, un copolímero de vinilbutiléter-anhídrido maleico, un copolímero de acrilonitrilo-acrilato de metilo-anhídrido maleico, y un copolímero de acrilato de butilo-estireno-anhídrido maleico. El derivado de polivinilo entérico es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ftalato de alcohol polivinílico, ftalato de polivinilacetato, ftalato de butirato de polivinilo y ftalato de polivinilacetato.

- 50 Se puede usar una mezcla de los materiales de recubrimiento antes mencionados para proporcionar el recubrimiento óptimo de película. El recubrimiento de película se puede llevar a cabo en un sistema de recubrimiento en bombo o en un granulador de lecho fluidizado o mediante un recubrimiento por compresión.

La preparación farmacéutica de liberación controlada de la presente invención puede contener el polipéptido del TNFRI de la presente invención en una matriz semipermeable de un polímero hidrófobo sólido en forma de un artículo conformado, por ejemplo, una película o una microcápsula, con el fin de liberación sostenida del fármaco. Ejemplos de la matriz de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles [por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico) como se describe por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, 1981 y Langer, Chem. Tech., 12:98-105, 1982], poliláctidos (U.S. Pat. No. 3,773,919, EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers 22:547-556, 1983), etileno-acetato de vinilo no

degradable (Langer et al., Supra), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables (por ejemplo, Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (EP 133,988).

5 Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de estar expuestas a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Las estrategias racionales se pueden idear para la estabilización de la proteína dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación forma la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

15 Además, la presente invención proporciona un mutante del TNFRI de la presente invención, y el uso de una preparación farmacéutica que contiene el mismo. Dicha preparación farmacéutica se puede administrar por inyección, o por administración oral, nasal, transdérmica u otras formas de administración, incluyendo, por ejemplo, por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, intraocular, intrapulmonar o subcutánea; por vía sublingual, anal, vaginal o mediante implante quirúrgico. El tratamiento puede consistir en una dosis única o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

20 Además, la preparación farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante un procedimiento de administración pulmonar. La preparación farmacéutica de la presente invención se administra al pulmón de un mamífero mientras se inhala y atraviesa a través del revestimiento epitelial pulmonar hacia la corriente sanguínea.

Se puede usar una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar del fármaco para el suministro pulmonar de la preparación farmacéutica de la presente invención. Ejemplos de tales dispositivos incluyen nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales están comercialmente disponibles en la técnica.

25 La preparación farmacéutica de la presente invención se puede formular adecuadamente para un uso óptimo en los dispositivos anteriores. Por lo general, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un propelente apropiado, además de diluyentes, adyuvantes o portadores útiles en terapia.

30 La preparación farmacéutica de la presente invención para suministro pulmonar se proporciona preferiblemente como una forma en partículas con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 10 µm o menos, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a 5 µm para la administración eficaz al pulmón distal.

35 La preparación farmacéutica de la presente invención para administración pulmonar también puede contener un carbohidrato tal como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa o sorbitol, como un portador. La preparación farmacéutica puede contener además dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) y dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). La preparación farmacéutica también puede contener surfactantes naturales o sintéticos. La preparación farmacéutica puede contener además polietilenglicol, dextrano tal como ciclodextrano, ácido biliar y otros derivados relacionados, y aminoácidos usados en una formulación de solución reguladora.

También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de portadores para la administración pulmonar de la preparación farmacéutica de la presente invención.

40 La administración pulmonar de la preparación farmacéutica de la presente invención se puede llevar a cabo utilizando un nebulizador con medios de ya sea chorro o ultrasónicos. La preparación farmacéutica de la presente invención apropiada para el uso de un nebulizador contiene el mutante del TNFRI disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0.1 a 25 mg de proteína biológicamente activa por ml de solución. La formulación nebulizadora puede incluir también una solución reguladora y monosacáridos, que, por ejemplo, contribuyen a la estabilización de proteínas y la regulación de la presión osmótica. La formulación del nebulizador puede contener también un surfactante para reducir o prevenir la agregación superficial de la proteína causada por la atomización de la solución en la formación del aerosol.

50 La preparación farmacéutica de la presente invención para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida contendrá generalmente un polvo finamente dividido de la composición que contiene el mutante del TNFRI de la presente invención suspendido en un propelente con la ayuda de un surfactante. El propelente puede ser un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidrof luorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o una combinación de los mismos. Ejemplos de un surfactante apropiado que se puede utilizar en la presente memoria incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también se puede utilizar como un surfactante.

55 La preparación farmacéutica de la presente invención para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo está compuesta por un polvo seco finamente dividido de la composición que contiene el mutante del TNFRI de la

presente invención y puede contener también un agente de carga tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol. Estos pueden facilitar la dispersión del polvo desde el dispositivo.

5 También se contempla la administración nasal de la preparación farmacéutica de la presente invención. La administración nasal permite el paso de una proteína terapéutica a la corriente sanguínea directamente después de administrar la proteína terapéutica a la nariz, evitando de este modo la deposición pulmonar del producto terapéutico. La preparación farmacéutica de la presente invención para administración nasal contiene dextrano o ciclodextrano, etc. La entrega mediante transporte a través de otras membranas mucosas también se contempla para la preparación farmacéutica de la presente invención.

10 El régimen de dosificación de la preparación farmacéutica de la presente invención implicada en un procedimiento para tratar las enfermedades o condiciones descritas anteriormente será determinado por el médico asistente, a la luz de diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo, la edad, la condición, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos.

15 La preparación farmacéutica de la presente invención se puede administrar por dosificación única o dosificación continua, pero preferiblemente se administra mediante un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener los niveles terapéuticos del fármaco en circulación. Las técnicas típicas conocidas en la técnica optimizarán fácilmente dosis eficaces y regímenes de administración. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de la vía de administración. El régimen de dosificación, el régimen de administración y la frecuencia de dosificación se pueden optimizar también de acuerdo con el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación in vivo y velocidad de eliminación in vivo de los agentes administrados. Para cada vía de administración, se puede calcular una dosis apropiada de acuerdo con el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. Se pueden determinar dosificaciones apropiadas debido a los ensayos establecidos usados para determinar las dosificaciones de nivel de sangre junto con datos apropiados dosis-respuesta. El régimen de dosificación final será determinado por el médico tratante, a la luz de diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente y otros factores clínicos. A medida que se realizan los estudios, surgirá la información adicional con respecto a los niveles de dosis apropiados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y afecciones.

Efectos ventajosos

30 El polipéptido modificado del receptor-1 de factor de necrosis tumoral humano de acuerdo con la presente invención tiene una capacidad mejorada para unirse con TNF, así como una resistencia a la proteasa equivalente o superior, en comparación con el polipéptido del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de tipo silvestre o un fragmento del mismo. Teniendo estas ventajas sobre el polipéptido de tipo silvestre, el polipéptido modificado de la presente invención presenta una semivida in vivo aumentada y garantiza una biodisponibilidad y una velocidad de absorción mejoradas tras la administración oral o la inyección. Por lo tanto, el polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de acuerdo con la presente invención se puede utilizar ventajosamente como un ingrediente activo en una inyección de larga duración o formulación oral.

Descripción de los dibujos

40 La figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra la construcción de vectores de expresión Met-TNFRI105, Met-TNFRI126 o Met-TNFRI171 para *E. coli*, insertando un gen Met-TNFRI105, Met-TNFRI126 o Met-TNFRI171 en pET44a

La figura 2A es un cromatograma de filtración en gel que muestra la elución de las proteínas Met-TNFRI105, Met-TNFRI126 y Met-TNFRI171 (fracción A4) y la FIG. 2B es una fotografía que muestra Met-TNFRI105, Met-TNFRI126 y Met-TNFRI171 purificados separados por SDS-PAGE (tinción con plata).

45 La figura 3 es un gráfico que muestra la capacidad de unión de fragmentos de TNFRI (TNFRI126, TNFRI171) y fragmentos del mutante del TNFRI (TNFRI126-A30, TNFRI171-A30) para unir TNF- α según se analizó mediante ELISA.

50 La figura 4A es un gráfico que muestra la actividad biológica de fragmentos de TNFRI (TNFRI126, TNFRI171) y fragmentos del mutante del TNFRI (TNFRI126-A30, TNFRI171-A30) según se analizó mediante neutralización contra la citotoxicidad de TNF- α . La figura. 4B es un gráfico que muestra la actividad biológica de ENBREL™, un fragmento del TNFRI (TNFRI171) y fragmentos del mutante del TNFRI (TNFRI171-A2, TNFRI171-A9) según se analizó mediante neutralización contra la citotoxicidad de TNF- α , y la figura 4C es un gráfico que muestra la actividad biológica de ENBREL™, un fragmento del TNFRI (TNFRI171) y fragmentos del mutante del TNFRI (TNFRI171-A21, TNFRI171-A22) según se analizó mediante neutralización contra la citotoxicidad de TNF- α .

55 La figura 5 es un diagrama esquemático que ilustra la construcción de un vector de expresión del TNFRI108 para *E. coli*, insertando un gen del TNFRI108 en un vector pET44a que porta un gen NusA.

La figura 6 es una fotografía que muestra la expresión de una proteína del TNFRI108 fusionada con NusA en *E. coli* transformada con el vector de expresión pET44a-NusA-TNFRI108 seguido por purificación mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado y cromatografía de interacción hidrófoba.

5 La figura 7 es un gráfico que muestra la resistencia del fragmento del TNFRI108 y los mutantes únicos del TNFRI108, TNFRI108-R14, TNFRI108-R64 y TNFRI108-R68 de TNFRI108 a proteasas.

La figura 8 es un gráfico que muestra la resistencia del fragmento del Met-TNFRI171 y los mutantes únicos del Met-TNFRI171, Met-TNFRI171-R83, Met-TNFRI171-R84, y Met-TNFRI171-R92 a proteasas.

10 La figura 9A es un gráfico que muestra la resistencia del fragmento del TNFRI171 y el fragmento de mutantes del TNFRI171, TNFRI171-A2, TNFRI171-S31, y TNFRI171-S53 a proteasas, y la figura 9B es un gráfico que muestra la resistencia del fragmento de TNFRI171 y el fragmento de mutantes del TNFRI171, TNFRI171-A22, TNFRI171-S47 y TNFRI171-S63 a proteasas.

15 La figura 10A es un gráfico que muestra el efecto terapéutico in vivo de los fragmentos del mutante del TNFRI171 en el edema de pata inducido por carragenano en ratones y la figura 10B es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 en tejidos de pie inducidos por edema (vehículo, Enbrel, TNFRI171-S54, TNFRI171-S62, TNFRI171-A2, TNFRI171-A9, TNFRI171-S36, TNFRI171-S57, TNFRI171-S58, Y TNFRI171-S63 desde la izquierda).

La figura 11A es un gráfico que muestra el efecto terapéutico in vivo del fragmento del TNFRI171 y los fragmentos del mutante del TNFRI171 en edema de pata inducido por carragenano en ratones y la figura 11B es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 en tejidos del pie inducidos por edema (vehículo, Enbrel, WT 2,5 mg/kg, WT 5 mg/kg, TNFRI-S63 2,5 mg/kg, TNFRI-S63 5 mg/ml desde la izquierda).

20 **Modo de la invención**

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos descritos a continuación.

25 El polipéptido modificado del TNFRI o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención se preparó utilizando información de un genoma del TNFRI humano cuyo genoma ya se ha dado a conocer públicamente.

[Ejemplo de preparación 1] Construcción del fragmento del gen del TNFRI y vector de expresión

(1) Construcción del fragmento del gen del TNFRI171

30 Se ha informado que TNFRI humano tiene 4 dominios extracelulares, unión de TNFRI con TNF- α es posible incluso con sólo tres dominios del TNFRI (TNFRI126), y una mayor deficiencia de los dominios extracelulares no tiene efecto sobre la unión de TNFRI con TNF- α . Basándose en este hecho, TNFRI171 que tiene 171 residuos de aminoácidos que se extienden desde el residuo de aminoácido 41 del polipéptido del TNFRI humano como se establece en SEQ ID NO: 1, TNFRI126 que tiene 126 residuos aminoácidos que se extienden desde el residuo de aminoácido 41 de TNFRI humano y TNFRI105 que tiene 105 residuos de aminoácidos que se extienden desde el residuo de aminoácido 41 de TNFRI humano, se seleccionaron como péptidos candidatos para construir mutantes de la presente invención. Para producir tales mutantes, la secuencia de nucleótidos de TNFRI171 se modificó para que fuera conveniente para la expresión en *E. coli*, utilizando codones que estuvieran emparejados con *E. coli* (SEQ ID NO: 5). Esta secuencia se construyó mediante el procedimiento de síntesis de gen basada en PCR.

40 Con el fin de insertar las secuencias génicas sintetizadas en un vector pGEM-T (No. de cat: A1380, Promega), se adicionaron 3 μ l del gen sintético a 1 μ l del vector pGEM-T y se adicionaron a esta 1 μ l de ligasa (No. de cat.: M2200S, NEB) y una solución de unión (2x solución reguladora de unión), seguido de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se tomaron 2 μ l de la solución de reacción y se adicionaron a una célula competente azul XL1 (No. de cat.: RH119-J80, RBC) que se transformó después aplicando un choque térmico a 37°C, durante 2 minutos, seguido de cultivo estático en un medio sólido LB que contiene ampicilina para obtener una colonia. La colonia se cultivó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, se aisló el plásmido de la misma y se confirmó la secuencia génica mediante marcación fluorescente de ddNTP utilizando PCR (SolGent Inc., Corea del Sur). Este gen se designó como pGEM-TNFRI171. En lo sucesivo, los genes TNFRI126 y TNFRI105 se obtuvieron por PCR utilizando el gen pGEM-TNFRI171 obtenido anteriormente como plantilla.

(2) Construcción del vector de expresión de TNFRI: construcción de vectores de expresión de TNFRI105, TNFR126 y TNFRI171

50 Se utilizó un vector comercialmente disponible pET44a (Novagen, No. de cat.: 71122-3) para constituir un vector de expresión.

Específicamente, el gen Met-TNFRI105 (SEQ ID NO: 100) se obtuvo por PCR utilizando el plásmido pGEMTNFRI171 preparado anteriormente como plantilla. El gen fue diseñado para tener los sitios de enzima de restricción Nde I y Hind III en los extremos 5' y 3', respectivamente, que permiten clonar el gen en el vector pET44a.

Los cebadores utilizados para esta amplificación por PCR tuvieron las siguientes secuencias de bases:

5 Cebador hacia adelante: 5'-acatatggatagcgtgtgcccg-3'

Cebador reverso: 5'-taagcttattaataaaacactggaac-3'

La PCR se inició con desnaturalización a 95°C, durante 5 min y procedió con 25 ciclos de desnaturalización a 95°C, durante 1 min, hibridación a 60°C, durante 40 segundos y extensión a 72°C, durante 1 min, seguido de extensión final a 72°C, durante 10 min. El producto de PCR obtenido de este modo y el vector pET44a se digirieron por separado a 37°C, durante 3 horas con las enzimas de restricción (Nde I, Hind III). Después de la digestión enzimática, las digestiones se analizaron sobre gel de agarosa al 1% mediante electroforesis, y las bandas de ADN detectadas en los tamaños correspondientes se escindieron con una maquinilla de afeitar y se extrajeron utilizando un kit de extracción de ADN (GeneAll, No. de cat: 102-102). Se mezclaron una solución reguladora de unión (solución reguladora 2x) con 50 ng del vector pET44a linealizado, 200 ng del gen Met-TNFRI105, 1 µl de ligasa (NEB, No. de cat.: M2200S) y agua destilada estéril para formar un volumen total de 20 µl, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Se tomaron 2 µl de la solución de reacción y se adicionaron a una célula competente azul XL1, la cual se transformó después aplicando un choque térmico a 37°C, durante 2 minutos, seguido de cultivo estático en un medio sólido LB que contenía ampicilina para obtener una colonia. La colonia se cultivó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, se aisló el plásmido de la misma y se confirmó la secuencia génica. El plásmido recombinante resultante se denominó pET44a-Met-TNFRI105 (FIG. 1).

El gen Met-TNFRI126 (SEQ ID NO: 101) se obtuvo por PCR utilizando el plásmido pGEM-TNFRI171 como plantilla. El gen fue diseñado para tener los sitios de enzima de restricción Nde I y BamH I en los extremos 5' y 3', respectivamente, que permiten clonar el gen en el vector pET44a.

Los cebadores utilizados para esta amplificación por PCR tenían las siguientes secuencias de bases:

25 Cebador hacia adelante: 5'-acatatggatagcgtgtgcccg-3'

Cebador reverso: 5'-cggatcctaacaactgtattctgcttc-3'

La reacción de PCR se realizó de la misma manera que la del gen Met-TNFRI105. También, se repitió el mismo procedimiento que en la construcción del vector de expresión Met-TNFRI105 con la excepción de que se usaron las enzimas de restricción Nde I y BamH I. El plásmido recombinante resultante preparado a partir de un cultivo de las colonias cultivadas en una placa fue denominado pET44a-Met-TNFRI126. La clonación del gen de interés se confirmó por aislamiento de un plásmido de la colonia, y secuenciación de bases de la misma (FIG. 1).

El gen Met-TNFRI171 (SEQ ID NO: 102) se obtuvo por PCR utilizando el plásmido pGEM-TNFRI171 como plantilla. El gen fue diseñado para tener los sitios de enzima de restricción Nde I y BamH I en los extremos 5' y 3', respectivamente, que permiten clonar el gen en el vector pET44a.

35 Los cebadores utilizados para esta amplificación por PCR tenían las siguientes secuencias de bases:

Cebador hacia adelante: 5'-acatatggatagcgtgtgcccg-3'

Cebador reverso: 5'-cggatccttatgtgtgctgagctctc-3'

La reacción de PCR y la construcción del vector de expresión de E. coli se realizaron de la misma manera que las del gen Met-TNFRI126. El plásmido recombinante resultante preparado a partir de un cultivo de una colonia se denominó pET44a- Met-TNFRI171. La clonación del gen de interés se confirmó mediante el aislamiento de un plásmido de la colonia y la secuenciación de bases sobre el plásmido (FIG. 1).

[Ejemplo de preparación 2] Construcción del mutante del fragmento del TNFRI con capacidad mejorada para unirse a TNF-α

(1) Diseño del mutante del TNFRI

45 Las modificaciones de aminoácidos que se aplicaron a TNFRI105, TNFRI126 y TNFRI171 se enumeran en la Tabla 1, a continuación. En la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 para el TNFRI humano de tipo silvestre, se analizaron los residuos de aminoácidos que se esperaba que estuvieran implicados en la unión al TNF-α. Los residuos de aminoácidos determinados se sustituyeron por otros aminoácidos que se esperaba que mejoraran la afinidad de TNFRI por TNF-α.

50

Tabla 1 Lista de modificación de aminoácidos del TNFRI diseñado

No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido	No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido
#1	H95F,R97P,H98A	#16	S92K,H95F,R97P,H98A
#2	S92I,H95F,R97P,H98A	#17	S92R,H95F,R97P,H98A
#3	S92G,H95F,R97P,H98A	#18	S92H,H95F,R97P,H98A
#4	S92A,H95F,R97P,H98A	#19	S92D,H95F,R97P,H98A
#5	S92V,H95F,R97P,H98A	#20	S92E,H95F,R97P,H98A
#6	S92L,H95F,R97P,H98A	#21	S92I,H95F,R97P,H98G
#7	S92P,H95F,R97P,H98A	#22	S92M,H95F,R97P,H98G
#8	S92F,H95F,R97P,H98A	#23	S92I,E93P,H95F,R97L,H98A
#9	S92M,H95F,R97P,H98A	#24	S92I,E93P,H95F,R97I,H98A
#10	S92W,H95F,R97P,H98A	#25	S92I,E93P,H95F,R97F,H98A
#11	S92C,H95F,R97P,H98A	#26	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G
#12	S92N,H95F,R97P,H98A	#27	S92I,E93P,H95F,R97L,H98G
#13	S92Q,H95F,R97P,H98A	#28	S92I,E93P,H95F,R97I,H98G
#14	S92T,H95F,R97P,H98A	#29	S92I,E93P,H95F,R97F,H98G
#15	S92Y,H95F,R97P,H98A	#30	S92I,E93P,H95F,R97P,H98A

5 Los mutantes resultantes de la introducción de las modificaciones de aminoácidos sugeridas como Nos. 1 a 30 en la Tabla 1 en TNFRI105, TNFRI126 y TNFRI171 se denominaron TNFRI105-A1 a TNFRI105-A30, TNFRI126-A1 a TNFRI126-A30, y TNFRI171-A1 a TNFRI171-A30, respectivamente (el símbolo "A" representa un candidato mutante de mayor afinidad. Por ejemplo, TNFRI105-A1 significa un candidato mutante del TNFRI105 No. 1 que se espera que tenga una mayor afinidad por TNF- α).

(2) Construcción de ADN que codifica los mutantes del TNFRI

10 Los mutantes de TNFRI específicos de sitio se construyeron utilizando mutagénesis dirigida al sitio. Los cebadores que se emplearon para la construcción de mutantes del TNFRI que comprenden las mutaciones de 30 aminoácidos enumerados en la Tabla 1 se resumen en la Tabla 2, a continuación.

15 Específicamente, cada uno de los pares de cebadores se disolvió a una concentración de 20 pM en agua destilada y se usó para construir mutantes dirigidos al sitio mediante PCR en presencia de Pfu polimerasa, con el plásmido del TNFRI (pET44a-Met- TNFRI105, pET44a -Met-TNFRI126 o pET44a-Met-TNFRI171, construido previamente) que sirve como plantilla.

20 Se amplificaron los genes TNFRI105-A1, TNFRI-126-A1, TNFRI-171-A1, TNFRI105-A30, TNFRI-126-A30 y TNFRI-171-A30 utilizando los cebadores correspondientes a A30 y A1 de la Tabla 2, con el plásmido pET44a-Met-TNFRI105, pET44a-Met-TNFRI126 o pET44a-Met-TNFRI171 preparado anteriormente, que sirve como plantilla y se inserta en plásmidos para construir plásmidos recombinantes (denominados pET-TNFRI105_A1, pET-TNFRI-126_A1, pET-TNFRI-171_A1, pETT NFRI105_A30, pET-TNFRI126_A30, y pET-TNFRI171_A30, respectivamente). Como se describe en la Tabla 2, a continuación, los plásmidos se usaron como plantillas para construir pET-TNFRI_A2 a pET-TNFRI_A29.

25 Las composiciones utilizadas para la amplificación son las siguientes: un total de 50,0 μ l de solución de reacción que contiene 1,0 μ l de cada ADN del plásmido plantilla, 1,0 μ l de cebadores N de 20 pmol, 1,0 μ l de cebadores C de 20 pmol, 25,0 μ l de 2X solución reguladora de PCR PrimeSTAR, 4,0 μ l de dNTP 200 μ M, 0,5 μ l de ADN polimerasa PrimeSTAR HS (Takara, No. de cat.: R044A) y 17,5 μ l de agua destilada.

La PCR inició con desnaturalización a 98°C, durante 5 min y se procedió con 17 ciclos de desnaturalización a 98°C, durante 30 segundos, hibridación a 55°C, durante 30 segundos y extensión a 72°C, durante 9 min, seguido por la extensión final a 72°C, durante 10 min.

5 La mezcla de reacción se trató con enzima Dpn I a 37°C, durante 2 horas para degradar ADN derivado de E. coli mientras el producto de PCR permanecía intacto. Se tomaron 2 µl de solución de reacción de ADN y se adicionaron a una célula competente azul XL1, que se transformó después aplicando un choque térmico a 42°C, durante 1 minuto, seguido de cultivo estático en un medio sólido LB que contenía ampicilina para obtener una colonia. La colonia se cultivó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, se aisló el plásmido de la misma y se confirmó la construcción de mutantes de TNFRI específicos de sitio mediante secuenciación de bases.

Tabla 2 Cebadores para la mutagénesis dirigida al sitio

No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
A30	pET44a-Met-TNFRI105, pET44a-Met-TNFRI126, o pET44a-Met-TNFRI171	5' - GAGTGGGTCATTTACAGCGATTCCGAATTTTCTG CCGGCGTGCCTGAGCTGTTCTAAG-3' 5' - cttagaacagctcaggcacgcccgcagaaaattc ggaatcgctgtaaatgaccactc-3'
A1	pET44a-Met-TNFRI105, pET44a-Met-TNFRI126, o	1' PCR 5' - CATTTACAGCGAGTGAGAATTTTCTGCGCGGTG
	pET44a-Met-TNFRI171	CCTGAGCTGTTCTAAG-3' 5' - cttagaacagctcaggcacgcccgcagaaaattc tactcgctgtaaatg-3' 2' pcr 5'-GAGTGAGAATTTTCTGCCGGCGTGCCTGAGCTGT -3' 5'-ACAGCTCAGGCACGCCGGCAGAAAATTCTCACTC -3'
A2	pET-TNFRI_A30	5'-GTCATTTACAGCGattGAGAATTTTCTGCCGGC-3' 5'-GCCGGCAGAAAATTCTCAATCGCTGTAAATGAC-3'
A3	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGgggGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcccCGCTGTAAATGACCC-3'
A4	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGgcgGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcgCGCTGTAAATGACCC-3'
A5	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGggtGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCaacCGCTGTAAATGACCC-3'
A6	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGctgGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcgCGCTGTAAATGACCC-3'
A7	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGcccGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcgCGCTGTAAATGACCC-3'

ES 2 626 418 T3

No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
A8	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGtttGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCaaaCGCTGTAAATGACCC-3'
A9	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGgatGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcatCGCTGTAAATGACCC-3'
A10	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGtggGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCccaCGCTGTAAATGACCC-3'
A11	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGtgcGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCgcaCGCTGTAAATGACCC-3'
A12	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGaatGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCattCGCTGTAAATGACCC-3'
A13	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGcagGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCctgCGCTGTAAATGACCC-3'
A14	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGacaGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCtgtCGCTGTAAATGACCC-3'
A15	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGtacGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCgtaCGCTGTAAATGACCC-3'
A16	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGaagGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcttCGCTGTAAATGACCC-3'
A17	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGcgcGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCgcgCGCTGTAAATGACCC-3'
A18	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGcatGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCatgCGCTGTAAATGACCC-3'
A19	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGgatGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCatcCGCTGTAAATGACCC-3'
A20	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGgaaGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCttcCGCTGTAAATGACCC-3'
A21	pET-TNFRI_A2	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA -3' 5'-TAgaacagctcaggcacccccgcagaaaattCTC -3'
A22	pET-TNFRI_A9	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGGTGCCTGAGCTGTTCTA -3' 5'-TAgaacagctcaggcacccccgcagaaaattCTC -3'
A23	pET-TNFRI_A30	5'-GATTCCGAATTTTCTGCTGGCGTGCCTGAGCTGT -3' 5'-acagctcaggcaccgacagaaaattcggaatc -3'

No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
A24	pET-TNFRI_A30	5'-GATTCCGAATTTTCTGATTGCGTGCCTGAGCTGT -3' 5'-acagctcaggcagcgaatcagaaaattcggaatc -3'
A25	pET-TNFRI_A30	5'-GATTCCGAATTTTCTGTTTGCCTGAGCTGT -3' 5'-acagctcaggcagcgaacagaaaattcggaatc -3'
A26	pET-TNFRI_A30	5'-TCCGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTC-3' 5'-gaacagctcaggcaccggcagaaaattcgga-3'
A27	pET-TNFRI_A30	5' - AGCGATTCCGAATTTTCTGCTGGGGTGCCTGAGC TGTTCTAAG-3' 5' - CTTAgaacagctcaggcaccggcagaaaattc ggaatcgct-3'
A28	pET-TNFRI_A30	5' - AGCGATTCCGAATTTTCTGATTgggTGCCTGAGC TGTTCTAAG-3' 5' - CTTAgaacagctcaggcaccgaatcagaaaattc ggaatcgct-3'
A29	pET-TNFRI_A30	5' - AGCGATTCCGAATTTTCTGTTTgggTGCCTGAGC TGTTCTAAG-3' 5' - CTTAgaacagctcaggcaccgaacagaaaattc ggaatcgct-3'

(3) Producción de mutantes biológicamente activos de Met-TNFRI y Met-TNFRI en E. coli

(a) Expresión de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI

5 Se transformaron células competentes de BL21Star (DE3) (Invitrogen, No. de cat.: C6010-03) con 1 µl del plásmido construido mediante choque térmico a 42°C, durante 1 min y se incubaron en placas LB para formar colonias. El E. coli BL21Star (DE3) anclando el vector de expresión en el mismo se inoculó en 50 ml de caldo YP (extracto de levadura: Merck, No. de cat: 103753, peptona: BD, No. de cat: 243620, NaCl: Merck, No. de cat: 1064049025) que contiene 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C, durante 16 horas con aireación. El cultivo se inoculó a un O.D. de 0,1 a 600 nm en 250 ml de caldo YP que contiene 100 µg/ml de ampicilina en un matraz de 1 litro. Cuando las células se hicieron crecer a 37°C hasta un O.D. de 3~4 a 600 nm, se adicionó IPTG a una concentración final de 1,0 mM para inducir la expresión. Después de la inducción de IPTG, las células se incubaron a 37°C, durante otras 3 horas con aireación y se cosecharon por centrifugación a 6000 rpm durante 20 min.

(b) Recuperación de Met-TNFRI insoluble y mutantes del Met-TNFRI

Las células recogidas se volvieron a suspender en una solución de resuspensión (Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,5) y se degradan con un equipo de ultrasonido (Sonics, No. de cat: VCX 750). Después de la centrifugación a 8000xg y 10°C, durante 30 min, el sobrenadante se descartó y la pella se suspendió en solución reguladora de lavado 1 (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 0,5%, pH 8,0) y se centrifugó a 8000 xg y 10°C, durante 20 min.

5 El sobrenadante se descartó y la pella resultante se volvió a suspender en una solución de resuspensión y se centrifugó a 8000 xg y a 10°C, durante 20 min. La pella se usó inmediatamente o se almacenó congelada a -80°C hasta su uso.

(c) Solubilización y replegamiento de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI

10 La pella se solubilizó en 6 ml de una solución de desnaturalización (6~8 M de urea o 6~8 M de guanidina-HCl, ditiotreititol 10 mM (DTT), EDTA 2,0 mM, NaCl 0,2 M). La parte insoluble de la pella se separó por filtración a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. La solución solubilizada de pellas se diluyó 20 veces en una solución de replegamiento (Tris 50 mM, EDTA 1,0 mM, L-arginina 0,5 M, GSH 6,0 mM, GSSG 4,0 mM, NaCl 240 mM, KCl 10 mM, pH 9,0) y se agitó suavemente a 4°C, durante 12~24 horas para inducir el replegamiento.

(d) Purificación de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI replegados

15 Con el fin de purificar Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI replegados, las soluciones de replegamiento se concentraron 20 veces utilizando Amicon Ultra de 3kD (Millipore, No. de cat: UFC900324), seguido por cromatografía de filtración en gel utilizando una columna XK25/70 empacada con resina de grado prep Superdex 75 (GE) (GE, No de Cat: 19-0146-01).

20 Antes de que la muestra replegada se gárgara en esta, la columna se equilibró con 4~5 volúmenes de una solución reguladora de equilibrio (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0). Después se cargaron 2 ml de la muestra sobre la columna equilibrada, se dejó que la solución de equilibrio fluyera a través de la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min y se tomaron fracciones de 5 ml. Sólo se utilizaron las fracciones que se observaron que tenían una pureza de 90% o más, según se analizó mediante SDS-PAGE. Mediante este procedimiento se purificaron Met-TNFRI105, Met-TNFRI126, Met-TNFRI171, un mutante Met-TNFRI105, un mutante Met-TNFRI126 y un mutante
25 Met-TNFRI171 (FIG. 2).

[Ejemplo experimental 1] Análisis de la Afinidad de Met-TNFRI para el Ligando (TNF-α)

El Met-TNFRI y el mutante de Met-TNFRI, ambos que tienen una pureza de 90% o más, se analizaron cuantitativamente utilizando el procedimiento de Bradford y se ensayaron la afinidad para TNF-α, utilizando ELISA.

30 Se sembró en placas TNFRI190 (constituido por 190 residuos de aminoácidos que se extienden desde la posición 22 a la posición 211 en la secuencia de aminoácidos del TNFRI de SEQ ID NO: 1; R&D, No. de cat.: 636-R1-025-CF) a una concentración de 1 µg/ml en una cantidad de 100 µl en placas de 96 pocillos y se inmovilizaron a 4°C, durante 16 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con 300 µl de solución reguladora de lavado (Tween-20 al 0,05%, PBS, pH 7,4) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con 300 µl de una solución reguladora de bloqueo (leche descremada al 5%, PBS, pH 7,4). A continuación, se lavó cada pocillo como se ha mencionado
35 anteriormente. Se diluyó una muestra de interés a concentraciones de 500 nM, 125 nM, 31 nM, 7,8 nM, 1,9 nM, 0,48 nM, 0,12 nM, y 0,03 nM en serie y se cargó en una cantidad de 100 µl en cada pocillo por duplicado. A cada pocillo se le adicionaron 100 µl de 50 ng/ml de TNF-α, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar los pocillos con una solución reguladora de lavado, se diluyó 1/1000 de solución 100 µg/ml de anticuerpo antiTNF-α, se adicionó en una cantidad de 100 µl por cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente
40 durante 2 horas. Después de lavar las placas con una solución reguladora de lavado, se adicionó un sustrato en una cantidad de 100 µl a cada pocillo y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos. En cada pocillo, se hicieron reaccionar 100 µl del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (RnD, No. de cat: DY999) a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1,0 M (Samchun Chemical, No. de cat: S2129) a cada pocillo para detener la reacción. La absorbancia a 450 y 540 nm se leyó en un lector Vmax (MD,
45 Model: VersaMax).

La afinidad de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI para TNF-α se determinó midiendo un cambio de absorbancia con concentración y evaluando el valor de IC₅₀ midiendo un cambio de absorbancia con concentración. Se determinó la afinidad del mutante Met-TNFRI con respecto al TNFRI de tipo silvestre. Los resultados se muestran en la Tabla 3, a continuación. Los datos de los mutantes representativos del TNFRI126-A30 y TNFRI171-A30 se representan en la FIG. 3. Como se puede ver en la FIG. 3, TNFRI126 y TNFRI171 tienen sustancialmente el mismo efecto. Además,
50 los mutantes del TNFRI de la presente invención mostraron afinidad mejorada hasta 1,400% en comparación con la del TNFRI de tipo silvestre.

[Ejemplo experimental 2] Ensayo de la evaluación Met-TNFRI y mutantes del Met-TNFRI para actividad biológica por neutralización de citotoxicidad del TNF-α

Los Met-TNFRI y mutantes del Met-TNFRI purificados se analizaron cuantitativamente utilizando el procedimiento de Bradford y se aplicaron a células WEHI (ATCC, No. de cat: CRL-2148), que son susceptibles a una cierta concentración de TNF- α , para medir la protección de las células de la citotoxicidad del TNF- α .

- 5 Específicamente, se suspendieron células WEHI (ATCC, No. de cat: CRL-2148) a una densidad de 2×10^5 células/ml en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 5%, 50 U/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. La suspensión celular se sembró en placas en una cantidad de 100 μ l/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos y se cultivó a 37°C, durante 24 horas en una atmósfera de CO₂ al 5%. A cada pocillo se
- 10 adicionaron 100 μ l de TNF- α de 70 pg/ml en un medio que contenía actinomicina-D. En PBS, 100 μ g/ml de cada muestra de mutante se diluyó de 3,0 nM a 0,18 pM y se adicionó a cada pocillo que contenía TNF- α . Como referencia, se aplicó Enbrel (Amgen, nombre químico: etanercept) a una concentración desde 0,04 pM a 3,0 nM mientras que el TNFRI de tipo silvestre se usó a una concentración desde 12 pM hasta 200 nM. Las células WEHI se incubaron a 37°C, durante 24 horas en una atmósfera de CO₂ al 5% y luego durante 4~6 horas adicionales con un reactivo MTT (kit de ensayo MTT, Roche, No. de cat.: 11455007001). Se adicionó un reactivo solubilizante en cada pocillo. Después de la incubación durante 24 horas, se identificó la disolución del formazán púrpura, después
- 15 de lo cual la absorbancia a 570 nm se leyó en un lector Vmax. Las actividades de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI se determinaron midiendo los valores de ND50 mediante el cambio de absorbancia con las concentraciones y calculando la actividad relativa al TNFRI de tipo silvestre. El resultado se resumió en la Tabla 4, a continuación. Los datos de los mutantes representativos del TNFRI126-A30, TNFRI171-A2, TNFRI171-A9, TNFRI171-A21, TNFRI171-A22 y TNFRI171-A30 se muestran en la FIG. 4.
- 20 Como se puede ver en la figura 4A, se observó que TNFRI126 y TNFRI171 presentan sustancialmente el mismo efecto. Además, la actividad biológica de los mutantes del Met-TNFRI de acuerdo con la presente invención era más alta que la del TNFRI de tipo silvestre. Por ejemplo, TNFRI171-A2, TNFRI171-A21 y TNFRI171-A22 eran 200 veces mayores en actividad biológica que el TNFRI de tipo silvestre como se analiza para neutralización contra la citotoxicidad de TNF- α (Tabla 4). Por lo tanto, la actividad neutralizante de la citotoxicidad de los mutantes del
- 25 TNFRI aumentó con un aumento en la afinidad por TNF- α .

[Ejemplo experimental 3] Resistencia de Met-TNFRI y Met-TNFRI a proteasas

- Se ensayaron Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI para determinar la resistencia a la proteasa. En primer lugar, se determinó la concentración de proteína total de una proteína purificada (por ejemplo, TNFRI) utilizando el procedimiento de Bradford. La pancreatina de cerdo (Sigma, No de cat.: P7545) se trató en una cantidad de 40% de
- 30 la concentración total de proteína para degradar la proteína purificada. Se determinó la semivida de cada mutante de acuerdo con el tratamiento con pancreatina y se comparó con la del TNFRI de tipo silvestre.

- Específicamente, las concentraciones de Met-TNFRI y cada mutante se determinaron por el procedimiento de Bradford y se ajustaron en 100 μ g/ml utilizando PBS. Cada una de las muestras de proteína obtenidas de este modo se colocó en una cantidad de 250 μ l en un tubo de centrifuga de 500 ml. A este tubo se le adicionaron 30 μ l de fosfato de sodio 0,1 M que contenía 10 μ g de pancreatina, seguido de incubación a 37°C. A los 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min después de la incubación, se tomaron 30 μ l de cada muestra, se mezclaron con 270 μ l de solución de BSA al 5% que contenía 5 μ l de un inhibidor de la proteasa (Roche, No. de cat.: 11836170001) y se almacenó en nitrógeno líquido. La semivida de cada uno de los mutantes del Met-TNFRI se determinó mediante análisis cuantitativo de proteína intacta utilizando ELISA (RnD, No. de cat.: DY225). La semivida de cada uno de los mutantes se expresa como un porcentaje de la de Met-TNFRI (Tablas 3 y 4). Como se muestra,
- 40 se encontró que los mutantes del Met-TNFRI que tenían mayor afinidad se degradaban más fácilmente por las proteasas.

Tabla 3 Determinación de la afinidad y resistencia a la proteasa de los mutantes por ensayo ELISA

Mutante No.	Resultados		Mutante No	Resultados	
	Afinidad (%)	Resistencia (%)		Afinidad (%)	Resistencia (%)
Tipo silvestre (TNFRI126)	100	100	Tipo silvestre (TNFRI126)	100	100
TNFRI126-A1	324	N/A	TNFRI126-A16	882	56
TNFRI126-A2	829	70	TNFRI126-A17	771	N/A
TNFRI126-A3	341	N/A	TNFRI126-A18	1012	82
TNFRI126-A4	524	N/A	TNFRI126-A19	482	N/A
TNFRI126-A5	712	N/A	TNFRI126-A20	782	N/A

Mutante No.	Resultados		Mutante No	Resultados	
	Afinidad (%)	Resistencia (%)		Afinidad (%)	Resistencia (%)
TNFRI126-A6	741	N/A	TNFRI126-A21	1404	50
TNFRI126-A7	600	N/A	TNFRI126-A22	1434	52
TNFRI126-A8	865	64	TNFRI126-A23	1105	N/A
TNFRI126-A9	941	69	TNFRI126-A24	1059	N/A
TNFRI126-A10	800	43	TNFRI126-A25	682	N/A
TNFRI126-A11	N/A	N/A	TNFRI126-A26	1141	46
TNFRI126-A12	659	N/A	TNFRI126-A27	894	N/A
TNFRI126-A13	806	45	TNFRI126-A28	N/A	N/A
TNFRI126-A14	765	N/A	TNFRI126-A29	435	N/A
TNFRI126-A15	941	66	TNFRI126-A30	952	45

Tabla 4 Determinación de la actividad biológica por ensayo de citotoxicidad y resistencia a la proteasa de los mutantes

Mutante No.	Actividad relativa (actividad neutralizante de la citotoxicidad) (veces)	Resistencia relativa a la proteasa (%)
(TNFRI171) tipo silvestre	1	100
TNFRI171-A2	207	45
TNFRI171-A8	120	47
TNFRI171-A9	158	47
TNFRI171-A10	44	26
TNFRI171-A15	142	45
TNFRI171-A16	139	33
TNFRI171-A18	126	68
TNFRI171-A21	226	30
TNFRI171-A22	242	39
TNFRI171-A26	196	16
TNFRI171-A30	127	28

5 [Ejemplo de preparación 3] Selección de mutantes mejorados en resistencia a proteasa

(1) Diseño de los mutantes del TNFRI

Los mutantes se diseñaron para tener resistencia a las proteasas. Las posiciones de mutagénesis en la secuencia de aminoácidos del TNFRI117 se dedujeron analizando los sitios de escisión de 10 proteasas típicas presentes en el tracto gastrointestinal, células y sangre con la ayuda del programa de cortador de péptidos (http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/) proporcionado por Expasy (Expert Protein Analysis System). Los residuos de aminoácidos en los sitios de escisión inferidos se sustituyeron con aminoácidos que son resistentes a las proteasas y causan un cambio estructural tan pequeño como sea posible. La matriz PAM250 se usó para

determinar los aminoácidos para sustituir los residuos inferidos. Haciendo referencia a la matriz PAM250 que sugiere 19 aminoácidos que tienen valores positivos, cero y negativos para cada aminoácido, se determinaron como sustituyentes aminoácidos que no son escindidos por proteasas y tienen valores positivos o cero.

Tabla 5 Aminoácidos específicos de proteasas y aminoácidos inductores de resistencia

Proteasa	Aminoácidos reconocido y escindido	Aminoácido inductor de la resistencia a la escisión
Arg-C Proteasa	R	H o Q
Asp-N endopeptidasa	-D	N o Q
Quimotripsina	[FYWML], no antes de P	S o I, H
Enterocinasa	K	N o Q
Glutamil endopeptidasa	E	N o Q
Lys-C	K	N o Q
Lys-N	K	N o Q
Prolina endopeptidasa	H, K o R, -P	A o S
Trombina	R	N o Q
Tripsina	K	N o Q

5

Los mutantes del TNFRI diseñados se enumeran en la Tabla 6, a continuación.

Tabla 6 Lista de mutantes del TNFRI diseñados

Mutante No.	Mutación	Mutante No.	Mutación
TNFRIx-R1	K48Q	TNFRIx-R47	M109I
TNFRIx-R2	K48N	TNFRIx-R48	M109V
TNFRIx-R3	Y49I	TNFRIx-R49	E113Q
TNFRIx-R4	Y49H	TNFRIx-R50	E113N
TNFRIx-R5	P52A	TNFRIx-R51	D120N
TNFRIx-R6	P52S	TNFRIx-R52	D120Q
TNFRIx-R7	K61Q	TNFRIx-R53	R121H
TNFRIx-R8	K61N	TNFRIx-R54	R121Q
TNFRIx-R9	K64Q	TNFRIx-R55	D122N
TNFRIx-R10	K64N	TNFRIx-R56	D122Q
TNFRIx-R11	Y67I	TNFRIx-R57	R128H
TNFRIx-R12	Y67H	TNFRIx-R58	R128Q
TNFRIx-R13	L68I	TNFRIx-R59	K129Q
TNFRIx-R14	L68V	TNFRIx-R60	K129N
TNFRIx-R15	Y69I	TNFRIx-R61	Y132I
TNFRIx-R16	Y69H	TNFRIx-R62	Y132H

Mutante No.	Mutación	Mutante No.	Mutación
TNFR1x-R17	D71N	TNFR1x-R63	R133H
TNFR1x-R18	D71Q	TNFR1x-R64	R133Q
TNFR1x-R19	D78N	TNFR1x-R65	Y135I
TNFR1x-R20	D78Q	TNFR1x-R66	Y135H
TNFR1x-R21	D80N	TNFR1x-R67	W136H
TNFR1x-R22	D80Q	TNFR1x-R68	W136S
TNFR1x-R23	R82H	TNFR1x-R69	E138Q
TNFR1x-R24	R82Q	TNFR1x-R70	E138N
TNFR1x-R25	E83Q	TNFR1x-R71	L140I
TNFR1x-R26	E83N	TNFR1x-R72	L140V
TNFR1x-R27	E85Q	TNFR1x-R73	F141I
TNFR1x-R28	E85N	TNFR1x-R74	F141V
TNFR1x-R29	F89I	TNFR1x-R75	F144I
TNFR1x-R30	F89V	TNFR1x-R76	F144V
TNFR1x-R31	E93Q	TNFR1x-R77	L150I
TNFR1x-R32	E93N	TNFR1x-R78	L150V
TNFR1x-R33	L96I	TNFR1x-R79	L156I
TNFR1x-R34	L96V	TNFR1x-R80	L156V
TNFR1x-R35	R97H	TNFR1x-R81	E160Q
TNFR1x-R36	R97Q	TNFR1x-R82	E160N
TNFR1x-R37	L100I	TNFR1x-R83	K161Q
TNFR1x-R38	L100V	TNFR1x-R84	K161N
TNFR1x-R39	K104Q	TNFR1x-R85	E200Q
TNFR1x-R40	K104N	TNFR1x-R86	E200N
TNFR1x-R41	R106H	TNFR1x-R87	K203Q
TNFR1x-R42	R106Q	TNFR1x-R88	K203N
TNFR1x-R43	K107Q	TNFR1x-R89	E206Q
TNFR1x-R44	K107N	TNFR1x-R90	E206N
TNFR1x-R45	E108Q	TNFR1x-R91	D207Q
TNFR1x-R46	E108N	TNFR1x-R92	D207N

(* En el contexto de los siguientes ejemplos, el símbolo x representa 108, 126 o 171 para los mutantes Nos R1 a R76, 126 o 171 para mutantes Nos R77 a R84 y 171 para mutantes Nos R85 a R92 El símbolo "R" representa candidato mutante aumentado con resistencia a la proteasa, por ejemplo, TNFR1x-R1 significa un candidato mutante del TNFR1x No. 1 que se espera tenga una resistencia a la proteasa aumentada).

5

(2) Construcción del gen del TNFR108 y del vector de expresión

Para expresar la proteína del TNFRI108 soluble en E. coli, se utilizó un vector pET44a disponible comercialmente (Novagen, No. de cat.: 71122-3) para constituir un vector de expresión.

5 Específicamente, el gen del TNFRI108 se obtuvo por PCR en presencia de los cebadores siguientes utilizando como plantilla el plásmido pGEM-TNFRI171 construido en el ejemplo de preparación 1. El gen fue diseñado para tener los sitios de enzima de restricción Sma I y Hind III en 5' y 3', respectivamente, que permiten clonar el gen en el vector pET44a.

Cebador hacia adelante: 5'-ccccggggcgatgacgatgacaaagatagcgtgtgcccg-3'

Cebador reverso: 5'- taagcttattacaggagcaattaaacactgg-3'

10 La PCR se realizó como en (2) del [ejemplo de preparación 1]. En el vector pcDNA3.3 TOPO TA (Invitrogen, No. de cat: K8300-01), se introdujeron 2 µl del producto de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 2 µl de la solución de reacción y se adicionaron a una célula competente azul XL1 (RBC, No de cat.: RH119-J80), que después se transformó aplicando un choque térmico a 42°C, durante 1 minuto, seguido de cultivo estático en un medio sólido LB que contiene ampicilina para obtener una colonia. La colonia se cultivó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, se aisló el plásmido de la misma y se confirmó la secuencia génica con ddNTP fluorescente (Solgent, Corea). El plásmido recombinante resultante se denominó pcDNA3.3-TNFRI108.

15 El pcDNA3.3-TNFRI108 y pET44a preparados previamente se trataron por separado con enzimas de restricción (Sma I, Hind III) a 37°C, durante 3 horas. Después de la digestión enzimática, las digestiones se analizaron sobre gel de agarosa al 1% mediante electroforesis, y las bandas de ADN detectadas en los tamaños correspondientes se escindieron con una maquinilla de afeitar y se extrajeron utilizando un equipo de extracción de ADN (GeneAll, No. de cat: 102-102). El vector pET44a se ligó con el gen del TNFRI108 en presencia de una ligasa (NEB, No. de cat.: M2200S). Se tomaron 2 µl de la solución de reacción y se adicionaron a una célula competente azul XL1 (RBC, No de cat.: RH119-J80), que después se transformó aplicando un choque térmico a 37°C, durante 2 minutos, seguido de cultivo estático en un medio sólido LB que contiene ampicilina para obtener una colonia. La colonia se cultivó en un medio líquido LB que contenía ampicilina, el plásmido se aisló a partir de este para construir un vector de expresión TNFRI108 (FIG. 5). El vector de expresión recombinante resultante se denominó pET44a-NusA-TNFRI108.

(3) Construcción de ADN que codifica mutantes únicos de TNFRI108

30 Se construyeron mutantes únicos del TNFRI108 específicos de sitio utilizando mutagénesis dirigida al sitio. Los cebadores que se emplearon para la construcción de mutantes únicos de TNFRI108 se resumen en la Tabla 7, a continuación.

Los ADN que codifican los mutantes únicos de TNFRI108 se construyeron de la misma manera que en (2) del [ejemplo de preparación 2], con la excepción de que el plásmido pET44a-NusA-TNFRI108 se usó como plantilla en presencia de cada uno de los pares de cebadores para los mutantes R1~R76 de la Tabla 7.

Tabla 7 Cebador para la mutagénesis dirigida al sitio.

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R1	K48Q	Hacia adelante	5'-atagcgtgtgcccgcagggtcagtatattcatcc-3'
		Reverso	5'-ggatgaatatactgacctgcccgcacacgctat-3'
TNFRI-R2	K48N	Hacia adelante	5'-gtgtgcccgcagggtaactatattcatccgcaaa-3'
		Reverso	5'-tttgccgatgaatatagttacctgcccgcacac-3'
TNFRI-R3	Y49I	Hacia adelante	5'-gcccgcagggtaagattattcatccgcaaaat-3'
		Reverso	5'-atttgccgatgaataatctacctgcccgc-3'
TNFRI-R4	Y49H	Hacia adelante	5'-gtgcccgcagggtaagcatattcatccgcaaaat-3'
		Reverso	5'-atttgccgatgaatagctacctgcccgcac-3'
TNFRI-R5	P52A	Hacia Adelante	5'-cgcagggtaagtattcatgcgcaaaataactc-3'
		Reverso	5'-gagttatgtcgcatgaatatactacctgcg-3'
TNFRI-R6	P52S	Hacia adelante	5'-gggtaagtattcatagcaaaataactctatc-3'
		Reverso	

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
			5'-gatagagttatfttgctatgaatatacttacc-3'
TNFRI-R7	K61Q	Hacia adelante Reverso	5'-taactctatctgttcacacagtcacaaaggg-3' 5'-cccttgtgacactgtgtgcaacagatagagta-3'
TNFRI-R8	K61N	Hacia adelante Reverso	5'-ctctatctgttcacaaactgcacaaagggac-3' 5'-gtcccttgtgacagttgtgcaacagatagag-3'
TNFRI-R9	K64Q	Hacia adelante Reverso	5'-gcacaaagtgtcaccaggggacgtacctgtat-3' 5'-atacaggtacgtcccctgtgacactttgtgc-3'
TNFRI-R10	K64N	Hacia adelante Reverso	5'-gcacaaagtgtcacaacgggacgtacctgtata-3' 5'-tatacaggtacgtcccctgtgacactttgtgc-3'
TNFRI-R11	Y67I	Hacia adelante Reverso	5'-gtcacaaggggacgattctgtataatgactgtc-3' 5'-gacagtcattatacagaatcgcccttgtgac-3'
TNFRI-R12	Y67H	Hacia adelante Reverso	5'-gtgtcacaaggggacgcatctgtataatgactg-3' 5'-cagtcattatacagatgctccccttgtgacac-3'
TNFRI-R13	L68I	Hacia adelante Reverso	5'-cacaaggggacgtacattataatgactgtccgg-3' 5'-ccggacagtcattataaatgtacgtccccttgtg-3'
TNFRI-R14	L68V	Hacia adelante Reverso	5'-gtgtcacaaggggacgcatctgtataatgactg-3' 5'-cagtcattatacagatgctccccttgtgacac-3'
TNFRI-R15	Y69I	Hacia adelante Reverso	5'-caaagggacgtacctgattaatgactgtccggg-3' 5'-ccccggacagtcattaatcaggtagctcccctt-3'
TNFRI-R16	Y69H	Hacia adelante Reverso	5'-caaagggacgtacctgcataatgactgtccggg-3' 5'-ccccggacagtcattatgcaggtacgtcccctt-3'
TNFRI-R17	D71N	Hacia adelante Reverso	5'-gggacgtacctgtataataactgtccggggc-3' 5'-gccccggacagttattatacaggtacgtccc-3'
TNFRI-R18	D71Q	Hacia adelante Reverso	5'-gggacgtacctgtataatcaggtccggggcc-3' 5'-ggccccggacactgattatacaggtacgtccc-3'
TNFRI-R19	D78N	Hacia adelante Reverso	5'-ggggccgggtcagaacaccgactgccgcg-3' 5'-cgccgcagtcgggttctgacctggccc-3'
TNFRI-R20	D78Q	Hacia adelante Reverso	5'-ggggccgggtcagcagaccgactgccgc-3' 5'-gcggcagtcgggtctgctgacctggccc-3'
TNFRI-R21	D80N	Hacia adelante Reverso	5'-gggtcaggataccaactgccgcgagtg-3' 5'-cactcggcagttggtatcctgacct-3'
TNFRI-R22	D80Q	Hacia adelante Reverso	5'-gggtcaggataccagtgccgcgagtgcg-3' 5'-cgcactcggcactgggtatcctgacct-3'
TNFRI-R23	R82H	Hacia adelante Reverso	5'-ggataccgactgcatgagtgcgagagtg-3' 5'-cccactctcgactcatggcagtcggtatcc-3'

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R24	R82Q	Hacia adelante Reverso	5'-ggataccgactgccaggagtgcgagagtgg-3' 5'-ccactctcgactcctggcagtcggtatcc-3'
TNFRI-R25	E83Q	Hacia adelante Reverso	5'-accgactgccgacagtgagagtg-3' 5'-cactctcgactggcggcagtcggt-3'
TNFRI-R26	E83N	Hacia adelante Reverso	5'-ataccgactgccgcaactgcgagagtgggtc-3' 5'-gaccactctcgactggcggcagtcggtat-3'
TNFRI-R27	E85Q	Hacia adelante Reverso	5'-ctgccgagtgccagagtgggtcatt-3' 5'-aatgaccactctggcactcggcag-3'
TNFRI-R28	E85N	Hacia adelante Reverso	5'-gactgccgagtgcaacagtggtcattacag-3' 5'-ctgtaaatgaccactgttgactcggcagtcg-3'
TNFRI-R29	F89I	Hacia adelante Reverso	5'-gtgcgagagtgggtcaattacagcagtgag-3' 5'-ctcactcgtgtaattgaccactctgcac-3'
TNFRI-R30	F89V	Hacia adelante Reverso	5'-cgagtgcgagagtgggtcagtgacagcagtg-3' 5'-cactcgtgtcactgaccactctgcactcg-3'
TNFRI-R31	E93Q	Hacia adelante Reverso	5'-gtgggtcatttacagcagtgagaatcatctcg-3' 5'-cgcagatgattctgactcgtgtaaatgaccac-3'
TNFRI-R32	E93N	Hacia adelante Reverso	5'-gtcatttacagcagtaacaatcatctgcgccac-3' 5'-gtggcgcagatgattgtactcgtgtaaatgac-3'
TNFRI-R33	L96I	Hacia adelante Reverso	5'-gcgagtgagaatcatattcgcactgcctgagc-3' 5'-gctcaggcagtggcgaatatgattctcactcg-3'
TNFRI-R34	L96V	Hacia adelante Reverso	5'-tacagcagtgagaatcatgtgcgccactgc-3' 5'-gcagtgccgacatgattctcactcgtgta-3'
TNFRI-R35	R97H	Hacia adelante Reverso	5'-gagtgagaatcatctgcactgcctgagctg-3' 5'-cagctcaggcagtgatgcagatgattctcactc-3'
TNFRI-R36	R97Q	Hacia adelante Reverso	5'-gagtgagaatcatctgcactgcctgagctg-3' 5'-cagctcaggcagtgctgcagatgattctcactc-3'
TNFRI-R37	L100I	Hacia adelante Reverso	5'-catctgcgccactgcattagctgttctaagtgc-3' 5'-gacacttagaacagctaatgcagtgccgagatg-3'
TNFRI-R38	L100V	Hacia adelante Reverso	5'-catctgcgccactgcgtgagctgttctaag-3' 5'-cttagaacagctcacgagtgccgagatg-3'
TNFRI-R39	K104Q	Hacia adelante Reverso	5'-cgccactgcctgagctgttctcagtgctgtaaa-3' 5'-tttacgacactgagaacagctcaggcagtgccg-3'
TNFRI-R40	K104N	Hacia adelante Reverso	5'-cactgcctgagctgttctaactgtgtaagag-3' 5'-ctctttacgacagttagaacagctcaggcagtg-3'

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R41	R106H	Hacia adelante Reverso	5'-gctgttctaagtgtcataaagagatgggccaag-3' 5'-cttgcccatctctttatgacacttagaacagc-3'
TNFRI-R42	R106Q	Hacia adelante Reverso	5'-gctgttctaagtgtcagaaagagatgggccaag-3' 5'-cttgcccatctctttctgacacttagaacagc-3'
TNFRI-R43	K107Q	Hacia adelante Reverso	5'-gttctaagtgctgcaggagatgggccaagtg-3' 5'-caactggcccatctcctgacgacacttagaac-3'
TNFRI-R44	K107N	Hacia adelante Reverso	5'-gttctaagtgctgtaacgagatgggccaagtg-3' 5'-caactggcccatctcgttacgacacttagaac-3'
TNFRI-R45	E108Q	Hacia adelante Reverso	5'-gctgttctaagtgctgtaaacagatgggccaag-3' 5'-cttgcccatctgtttacgacacttagaacagc-3'
TNFRI-R46	E108N	Hacia adelante Reverso	5'-gttctaagtgctgtaaaaacatgggccaagtg-3' 5'-caactggcccatgttttacgacacttagaac-3'
TNFRI-R47	M109I	Hacia adelante Reverso	5'-ctaagtgctgtaaaagattggccaagttgaaat-3' 5'-attcaactggccaatctctttacgacacttag-3'
TNFRI-R48	M109V	Hacia adelante Reverso	5'-ctaagtgctgtaaaaggtgggccaagttgaaat-3' 5'-attcaactggcccacctctttacgacacttag-3'
TNFRI-R49	E113Q	Hacia adelante Reverso	5'-gagatgggccaagttcagattctcatgtacgg-3' 5'-ccgtacatgaagaaatctgaactggcccatctc-3'
TNFRI-R50	E113N	Hacia adelante Reverso	5'-gagatgggccaagttaacattctcatgtacgg-3' 5'-ccgtacatgaagaaatgttaactggcccatctc-3'
TNFRI-R51	D120N	Hacia adelante Reverso	5'-tttctcatgtacggtaaacccgcatcggtag-3' 5'-cataccgtatcgcggtttaccgtacatgaagaaa-3'
TNFRI-R52	D120Q	Hacia adelante Reverso	5'-tttctcatgtacggtagcagcggtagcggtag-3' 5'-cataccgtatcgcgctgtaccgtacatgaagaaa-3'
TNFRI-R53	R121H	Hacia adelante Reverso	5'-catgtacggtagaccatgatacggtagtggttg-3' 5'-caaccacataccgtatcatggctaccgtacatg-3'
TNFRI-R54	R121Q	Hacia adelante Reverso	5'-catgtacggtagaccagatacggtagtggttg-3' 5'-caaccacataccgtatctggctaccgtacatg-3'
TNFRI-R55	D122N	Hacia adelante Reverso	5'-gtacggtagaccgcaacacggtagtggtgcc-3' 5'-ggcaaccacataccgtgttgggtctaccgtac-3'
TNFRI-R56	D122Q	Hacia adelante Reverso	5'-gtacggtagaccgccagacggtagtggtgcc-3' 5'-ggcaaccacataccgtctggcggtctaccgtac-3'
TNFRI-R57	R128H	Hacia adelante Reverso	5'-cggtagtggttgccataaaaaccagtagcgc-3' 5'-ggcgatactggttttatggcaaccacataccg-3'

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R58	R128Q	Hacia adelante Reverso	5'-cggtatgtggtgccagaaaaaccagtatgcc-3' 5'-ggcgatactggttttctggcaaccacataccg-3'
TNFRI-R59	K129Q	Hacia adelante Reverso	5'-ggtatgtggtgccgtcagaaccagtatgcc-3' 5'-ggcgatactggtctgacggcaaccacatacc-3'
TNFRI-R60	K129N	Hacia adelante Reverso	5'-ggtatgtggtgccgtaacaaccagtatgcc-3' 5'-ggcgatactggtgttacggcaaccacatacc-3'
TNFRI-R61	Y132I	Hacia adelante Reverso	5'-gttgccgtaaaaaccagattgccattattgttc-3' 5'-gaccaataatggcgaatctggttttacggcaac-3'
TNFRI-R62	Y132H	Hacia adelante Reverso	5'-gttgccgtaaaaaccagcatgccattattgttc-3' 5'-gaccaataatggcgaatctggttttacggcaac-3'
TNFRI-R63	R133H	Hacia adelante Reverso	5'-gccgtaaaaaccagtatcatcattattgttcag-3' 5'-ctgaccaataatgatgatactggttttacggc-3'
TNFRI-R64	R133Q	Hacia adelante Reverso	5'-gccgtaaaaaccagtatcagcattattgttcag-3' 5'-ctgaccaataatgctgatactggttttacggc-3'
TNFRI-R65	Y135I	Hacia adelante Reverso	5'-ccagtatgccatattgttcagaaaacctgttc-3' 5'-gaacaggtttctgaccaaataatggcgatactgg-3'
TNFRI-R66	Y135H	Hacia adelante Reverso	5'-ccagtatgccatattgttcagaaaacctgttc-3' 5'-gaacaggtttctgaccaatgatggcgatactgg-3'
TNFRI-R67	W136H	Hacia adelante Reverso	5'-cagtatgccattatcattcagaaaacctgttc-3' 5'-ggaacaggtttctgaatgataatggcgatactg-3'
TNFRI-R68	W136S	Hacia adelante Reverso	5'-cagtatgccattatagctcagaaaacctgttc-3' 5'-ggaacaggtttctgagctataatggcgatactg-3'
TNFRI-R69	E138Q	Hacia adelante Reverso	5'-cgccattattgttcacagaacctgttcagtg-3' 5'-cactggaacaggttctgtgaccaataatggcg-3'
TNFRI-R70	E138N	Hacia adelante Reverso	5'-cgccattattgttcaaacaacctgttcagtg-3' 5'-cactggaacaggttgttgaccaataatggcg-3'
TNFRI-R71	L140I	Hacia adelante Reverso	5'-attgtcagaaaacattttccagtgtttaattg-3' 5'-caattaaaactggaaaatgtttctgaccaat-3'
TNFRI-R72	L140V	Hacia adelante Reverso	5'-attgtcagaaaacgtgttcagtgtttaattg-3' 5'-caattaaaactggaacacgtttctgaccaat-3'
TNFRI-R73	F141I	Hacia adelante Reverso	5'-ggtcagaaaacctgattcagtgtttaattgctc-3' 5'-gagcaattaaaactgaatcaggtttctgacc-3'
TNFRI-R74	F141V	Hacia adelante Reverso	5'-ggtcagaaaacctggtcagtgtttaattgctc-3' 5'-gagcaattaaaactgcaccaggtttctgacc-3'

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R75	F144I	Hacia adelante	5'-gaaaacctgtccagtgatttaattgctccctg-3'
		Reverso	5'-cagggagcaattaatacactggaacagggttttc-3'
TNFRI-R76	F144V	Hacia adelante	5'-gaaaacctgtccagtggtgtaattgctccctg-3'
		Reverso	5'-cagggagcaattcacacactggaacagggttttc-3'

(4) Expresión de TNFRI108 y mutantes del TNFRI108

Se transformaron células competentes BL21Star (DE3) (Invitrogen, No. de cat.: C6010-03) con 1 µl del plásmido construido mediante choque térmico a 42°C, durante 1 min y se incubaron en placas LB para formar colonias. La E. coli BL21Star (DE3) que portaba el vector mutante pET44a-NusA-TNFRI108 y TNFRI108 en la misma se inoculó en 5 ml de caldo LB (BD, No. de cat.: 244620) que contenía ampicilina 100 µg/ml y se incubó a 37°C, durante 16 horas con aireación. El cultivo se inoculó en 50 ml de un medio que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se hizo crecer hasta un O.D. de 0,6~0,8. Se adicionó IPTG (Sigma, No. de cat.: I9003) a una concentración final de 1,0 mM para inducir la expresión. Después de la inducción de IPTG, las células se incubaron a 37°C, durante 3 horas adicionales con aireación y se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm durante 20 min.

(5) Purificación de TNFRI108 y mutantes del TNFRI108

Después de la degradación de las células recogidas, el sobrenadante se purificó principalmente utilizando cromatografía de afinidad de metales y después cromatografía hidrofóbica a proteínas de interés con una pureza de 90% o más.

Las células recogidas se volvieron a suspender en una solución (Tris 50 mM (pH 8,5)) y se degradan con un equipo de ultrasonido (Sonics, No. de cat.: VCX 750). Después de la centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min, se recuperó el sobrenadante. Se cargaron resinas hipercélulas (Pall, No. de cat.: 20093-010) en una cantidad de 300 µl/pocillo en placas de filtro de 96 pocillos (Pall, No. de cat.: PN5065), se lavaron con 4 volúmenes de columna de agua destilada y se trataron con dos volúmenes de columna de NiCl₂ 0,1 M para unir los iones níquel a las resinas. Se lavaron con dos volúmenes de columna de agua destilada y luego se equilibraron con 6 volúmenes de columna de una solución reguladora de equilibrio (Tris 25 mM, NaCl 0,1 M (pH 8,5)). Se adicionaron dos volúmenes de columna de la muestra a las resinas y se retiraron las muestras no unidas fluyendo 4 volúmenes de columna de una solución reguladora de equilibrio. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de una solución reguladora de lavado (Tris 25 mM, NaCl 0,1 M, imidazol 50 mM (pH 8,5)), el TNFRI108 unido a la columna se eluyó con dos volúmenes de columna de un eluyente (Tris 25 mM, NaCl 0,1 M, imidazol 250 mM (pH 8,5)).

En la solución de proteína eluida de la cromatografía de afinidad metálica, se diluyó sulfato de amonio 1,0 M ((NH₄)₂SO₄) a 400 mM. Se cargaron resinas de fenil-sefarosa (GE, No de cat. 17-108201) en una cantidad de 300 µl/pocillo en placas de filtro de 96 pocillos y se equilibraron con 6 volúmenes de columna de una solución reguladora de equilibrio (fosfato de sodio 20 mM (Na₂PO₄), sulfato de amonio 400 mM (pH 7,0)). El eluato de la cromatografía de afinidad de metal se adicionó a la columna y se lavó con 2 volúmenes de columna de una solución reguladora de equilibrio para eliminar las proteínas no unidas. Después de lavar con 10 volúmenes de columna de una solución reguladora de lavado (fosfato de sodio 20 mM (Na₂PO₄), sulfato de amonio 160 mM (pH 7,0)), se llevó a cabo la elución con 6 volúmenes de columna de un eluyente (fosfato de sodio 20 mM (pH 7,0)). El eluato se concentró en al menos 100 µg/ml antes de llevar a cabo el análisis cuantitativo utilizando el procedimiento de Bradford. La pureza de todas las muestras purificadas se evaluó mediante SDS-PAGE (FIG. 6).

[Ejemplo experimental 4] Resistencia de TNFRI108 y Mutantes de TNFRI108 a proteasas

Los mutantes del TNFRI108 y TNFRI108 se ensayaron para determinar la resistencia a la proteasa. En primer lugar, se determinó la concentración total de una solución de proteína purificada (por ejemplo, TNFRI108) utilizando el procedimiento de Bradford. Se utilizó pancreatina de cerdo en una cantidad de 40% de la concentración de proteína total para degradar la proteína purificada. Se determinó la semivida de cada mutante de acuerdo con el tratamiento con pancreatina y se comparó con la del fragmento del polipéptido del TNFRI108.

Con el fin de evaluar la resistencia de los mutantes del TNFRI108 a proteinasas, las medias vidas de los mutantes se midieron después del tratamiento con pancreatina (Sigma, No. de cat.: P7545) y en comparación con los de TNFRI108. La resistencia de los mutantes representativos TNFRI108-R14, TNFRI108-R64 y TNFRI108-R68 a pancreatina se muestra en la FIG. 7. Se repitió el mismo procedimiento que en el [ejemplo experimental 3] con la excepción de que 250 µl de cada muestra de proteína se trataron con 6 µg de pancreatina. Los resultados se resumen en la Tabla 8, a continuación.

Tabla 8 Resistencia a la proteasa de los mutantes del TNFR 108 (reaccionados a 37°C)

Mutante No.	Resistencia en comparación con TNFRI108	Mutante No.	Resistencia en comparación con TNFRI108
TNFRI108-R1	73%	TNFRI108-R39	89%
TNFRI108-R2	48%	TNFRI108-R40	90%
TNFRI108-R3	5%	TNFRI108-R41	125%
TNFRI108-R4	6%	TNFRI108-R42	113%
TNFRI108-R5	26%	TNFRI108-R43	110%
TNFRI108-R6	57%	TNFRI108-R44	96%
TNFRI108-R7	108%	TNFRI108-R45	37%
TNFRI108-R8	111%	TNFRI108-R46	57%
TNFRI108-R9	43%	TNFRI108-R47	158%
TNFRI108-R10	14%	TNFRI108-R48	103%
TNFRI108-R11	24%	TNFRI108-R49	51%
TNFRI108-R12	30%	TNFRI108-R50	23%
TNFRI108-R13	166%	TNFRI108-R51	67%
TNFRI108-R14	168%	TNFRI108-R52	71%
TNFRI108-R15	14%	TNFRI108-R53	116%
TNFRI108-R16	13%	TNFRI108-R54	119%
TNFRI108-R17	17%	TNFRI108-R55	83%
TNFRI108-R18	81%	TNFRI108-R56	28%
TNFRI108-R19	89%	TNFRI108-R57	141%
TNFRI108-R20	106%	TNFRI108-R58	116%
TNFRI108-R21	ND	TNFRI108-R59	86%
TNFRI108-R22	ND	TNFRI108-R60	84%
TNFRI108-R23	ND	TNFRI108-R61	96%
TNFRI108-R24	ND	TNFRI108-R62	89%
TNFRI108-R25	75%	TNFRI108-R63	91%
TNFRI108-R26	75%	TNFRI108-R64	213%
TNFRI108-R27	93%	TNFRI108-R65	171%
TNFRI108-R28	149%	TNFRI108-R66	111%
TNFRI108-R29	ND	TNFRI108-R67	109%
TNFRI108-R30	ND	TNFRI108-R68	288%
TNFRI108-R31	70%	TNFRI108-R69	107%
TNFRI108-R32	50%	TNFRI108-R70	105%

Mutante No.	Resistencia en comparación con TNFRI108	Mutante No.	Resistencia en comparación con TNFRI108
TNFRI108-R33	70%	TNFRI108-R71	74%
TNFRI108-R34	55%	TNFRI108-R72	103%
TNFRI108-R35	80%	TNFRI108-R73	176%
TNFRI108-R36	50%	TNFRI108-R74	158%
TNFRI108-R37	84%	TNFRI108-R75	83%
TNFRI108-R38	89%	TNFRI108-R76	97%
(ND; no Detectado)			

(6) Construcción de vectores de expresión que llevan Met-TNFRI126 y mutantes del Met-TNFRI126

5 También se estableció la resistencia a la proteasa de los mutantes únicos, confirmada en TNFRI108, para los mutantes del Met-TNFRI126 y Met-TNFRI126. En este contexto, se expresaron TNFRI108-R7, TNFRI108-R8, TNFRI108-R9, TNFRI108-R10, TNFRI108-R14, TNFRI108-R64, TNFRI108-R65, TNFRI108-R68, TNFRI108-R73, y TNFRI108-R74 en la forma de Met-TNFRI126 para examinar su resistencia a proteasas.

10 Los plásmidos que llevan los Met-TNFRI126 y mutantes Met-TNFRI126 se construyeron de la misma manera que en (2) del [ejemplo de preparación 2] con la excepción de que se utilizó el plásmido pET44a-Met-TNFRI126 construido en [ejemplo de preparación 1] como una plantilla en presencia de cada uno de los pares de cebadores correspondientes a los mutantes Nos. R7, R8, R9, R10, R14, R64, R65, R68, R73 y R74 de la Tabla 7.

(7) Producción y purificación de Met-TNFRI126 y mutantes Met-TNFRI126

Los Met-TNFRI126 y mutantes Met-TNFRI126 se prepararon y purificaron de la misma manera que en (3) del ejemplo de preparación 2 con la excepción de que se usaron 1 µl de cada uno de los plásmidos construidos anteriormente.

15 **[Ejemplo experimental 5]** Resistencia de Met-TNFRI126 y mutantes Met-TNFRI126 a Proteasas

20 La resistencia a proteasa se ensayó de la misma manera que en [ejemplo experimental 4] con la excepción de que se emplearon Met-TNFRI126 y mutantes Met-TNFRI126 en lugar de TNFRI108 (Tabla 9). También se detectó una alta resistencia a la proteasa en R14, R64, R68, R73 y R74, que se observó que tenían una alta resistencia a la proteasa en TNFRI108, mientras que R9 y R10, que presentaban una baja resistencia a la proteasa en TNFRI108, se midieron también como de baja resistencia.

Tabla 9 Resistencia a la proteasa relativa a Met-TNFRI126

Mutante No.	Resistencia relativa a Met-TNFRI126 (%)
TNFRI126-R7	87%
TNFRI126-R8	95%
TNFRI126-R9	65%
TNFRI126-R10	30%
TNFRI126-R14	143%
TNFRI126-R64	152%
TNFRI126-R65	99%
TNFRI126-R68	120%
TNFRI126-R73	159%
TNFRI126-R74	169%

(8) Construcción de vectores de expresión que llevan Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171

Los mutantes únicos resultantes de una mutación en el cuarto dominio de TNFRI se eligieron entre los mutantes únicos diseñados enumerados en la Tabla 6 de (1) del [ejemplo de preparación 3], y preparados en la forma de Met-TNFRI171.

5 Para ello, se construyeron vectores de expresión para expresar los Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171 en E. coli. Los genes que codifican los mutantes del Met-TNFRI171 se construyeron por PCR utilizando los cebadores para los mutantes mostrados en la Tabla 10, a continuación, con el plásmido pET44a-Met-TNFRI171 sirviendo como plantilla.

10 Los plásmidos que llevan los Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171 se construyeron de la misma manera que en (2) del [ejemplo de preparación 2], con la excepción de que se utilizó el plásmido pET44a-Met-TNFRI171 construido en el [ejemplo de preparación 1] como una plantilla en presencia de cada uno de los pares de cebadores mostrados en la Tabla 10.

Tabla 10 Cebadores para la mutagénesis dirigida al sitio

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R77	L150I	Hacia adelante	5'- aattgctccctgtgtattaacggcact gtgcatc-3'
		Reverso	5'- gatgcacagtgccgttaatacacaggg agcaatt-3'
TNFRI-R78	L150V	Hacia adelante	5'- ttaattgctccctgtgtgtgaacggca ctgtgca-3'
		Reverso	5'- tgcacagtgccgttcacacacagggag caattaa-3'
TNFRI-R79	L156I	Hacia adelante	5'- gaacggcactgtgcatatttctgtca ggagaag-3'
		Reverso	5'- cttctcctgacaggaaatgacacagt gccgttc-3'
TNFRI-R80	L156V	Hacia adelante	5'- tgaacggcactgtgcatgtgtcctgtc aggagaa-3'
		Reverso	5'- ttctcctgacaggacacatgacacagt ccgttca-3'

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R81	E160Q	Hacia adelante Reverso	5' - gcatctgtcctgtcagcagaagcagaa tacagtt-3' 5' - aactgtattctgcttctgctgacagga cagatgc-3'
TNFRI-R82	E160N	Hacia adelante Reverso	5' - gcatctgtcctgtcagaacaagcagaa tacagtt-3' 5' - aactgtattctgcttgttctgacagga cagatgc-3'
TNFRI-R83	K161Q	Hacia adelante Reverso	5' - atctgtcctgtcaggagcagcagaata cagtttg-3' 5' - caaactgtattctgctgctcctgacag gacagat-3'
TNFRI-R84	K161N	Hacia adelante Reverso	5' - ctgtcctgtcaggagaaccagaataca gtttgta-3' 5' - tacaaactgtattctggttctcctgac aggacag-3'
TNFRI-R85	E200Q	Hacia adelante Reverso	5' - ttgtgcctaccccagattcagaatggt aagggca-3' 5' - tgcccttaacattctgaatctggggta ggcaciaa-3'

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R86	E200N	Hacia adelante Reverso	5'- gtgcctaccccagattaacaatgttaa gggact-3' 5'- agtgcccttaacattgttaaatctggg taggcac-3'
TNFRI-R87	K203Q	Hacia adelante Reverso	5'- cccagattgagaatggttcagggcact gaggac-3' 5'- gtcctcagtgccctgaacattctcaat ctgggg-3'
TNFRI-R88	K203N	Hacia adelante Reverso	5'- cccagattgagaatgttaacggcactg aggactc-3' 5'- gagtcctcagtgccgtaaacattctca atctggg-3'
TNFRI-R89	E206Q	Hacia adelante Reverso	5'- ttgagaatgttaagggcactcaggact caggcac-3' 5'- gtgcctgagtcctgagtgcccttaaca ttctcaa-3'
TNFRI-R90	E206N	Hacia adelante Reverso	5'- aatgttaagggcactaacgactcaggc accacat-3' 5'- atgtggtgcctgagtcgtagtgccct taacatt-3'

Mutante No.	Mutación	Dirección del cebador	Secuencia del cebador
TNFRI-R91	D207Q	Hacia adelante	5'- gttaagggcactgagcagtcaggcacc acataag-3'
		Reverso	5'- cttatgtggtgcctgactgctcagtgc ccttaac-3'
TNFRI-R92	D207N	Hacia adelante	5'- atgtaagggcactgagaactcaggca ccacata-3'
		Reverso	5'- tatgtggtgcctgagttctcagtgcc ttaacat-3'

(9) Producción y purificación de Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171

Los Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171 se prepararon y purificaron de la misma manera que en (3) del [ejemplo de preparación 2], con la excepción de que se utilizaron 1 µl de cada uno de los plásmidos construidos anteriormente.

5

[Ejemplo experimental 6] Resistencia de Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171 a proteasas

La resistencia a proteasa se ensayó de la misma manera que en [ejemplo experimental 3] con la excepción de que se emplearon Met-TNFRI171 y mutantes del Met-TNFRI171 en lugar de TNFRI108 (Tabla 11). La resistencia de los mutantes representativos Met-TNFRI171-R83, Met-TNFRI171-R84 y Met-TNFRI171-R92 a la pancreatina se muestra en la FIG. 8.

10

Tabla 11 Resistencia a la proteasa relativa a Met-TNFRI171

Mutante No.	Resistencia relativa a Met-TNFRI171
TNFRI171-R77	120%
TNFRI171-R78	87%
TNFRI171-R79	113%
TNFRI171-R80	103%
TNFRI171-R81	57%
TNFRI171-R82	68%
TNFRI171-R83	187%
TNFRI171-R84	187%
TNFRI171-R85	116%
TNFRI171-R86	90%
TNFRI171-R87	111%
TNFRI171-R88	99%
TNFRI171-R89	114%

Mutante No.	Resistencia relativa a Met-TNFRI171
TNFRI171-R90	102%
TNFRI171-R91	117%
TNFRI171-R92	127%

[Ejemplo 1] Construcción de mutantes con afinidad mejorada para TNF- α así como resistencia mejorada a proteasa (Superlead)

(1) Diseño de Superlead

5 Como se evaluó en [ejemplo de preparación 2], los mutantes con afinidad mejorada para TNF- α eran altamente susceptibles a las proteasas. Para conferir resistencia mejorada a la proteasa en estos mutantes, las mutaciones para la mejora de la resistencia a la proteasa, confirmadas en [ejemplo de preparación 3], se combinaron con mutaciones para la mejora de la afinidad, como se confirmó en [ejemplo de preparación 2]. Como resultado, se construyeron mutantes Superlead de acuerdo con la longitud de TNFRI, como se muestra en las Tablas 12 a 14.

Tabla 12 Lista de modificaciones de aminoácidos diseñadas en TNFRI171

No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido	No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido
S31	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A	S48	L68V,S92I,E93P,H95F,R97P,H98G
S32*	S92I,H95F,R97P,H98A,K161Q	S49*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,K161Q
S33*	S92I,H95F,R97P,H98A,K161N	S50*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,K161N
S34*	S92I,H95F,R97P,H98A,E200Q	S51*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,E200Q
S35*	S92I,H95F,R97P,H98A,D207N	S52*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,D207N
S36	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A	S53	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A,K161Q
S37*	S92M,H95F,R97P,H98A,K161Q	S54	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A,K161N
S38*	S92M,H95F,R97P,H98A,K161N	S55	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A,D207N
S39*	S92M,H95F,R97P,H98A,E200Q	S56	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A,K161Q
S40*	S92M,H95F,R97P,H98A,D207N	S57	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A,K161N
S41	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A	S58	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A,D207N
S42*	S92H,H95F,R97P,H98A,K161Q	S59	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A,K161Q
S43*	S92H,H95F,R97P,H98A,K161N	S60	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A,K161N
S44*	S92H,H95F,R97P,H98A,E200Q	S61	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A,D207N
S45*	S92H,H95F,R97P,H98A,D207N	S62	L68V,S92I,H95F,R97P,H98G,K161Q
S46	L68V,S92I,H95F,R97P,H98G	S63	L68V,S92M,H95F,R97P,H98G,K161N
S47	L68V,S92M,H95F,R97P,H98G		
*de referencia			

10

Tabla 13 Lista de modificaciones de aminoácidos diseñadas en TNFRI126

No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido	No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido
S31	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A	S53	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A,K161Q
S36	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A	S54	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A,K161N

S41	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A	S56	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A,K161Q
S46	L68V,S92I,H95F,R97P,H98G	S57	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A,K161N
S47	L68V,S92M,H95F,R97P,H98G	S59	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A,K161Q
S48	L68V,S92I,E93P,H95F,R97P,H98G	S60	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A,K161N
S49*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,K161Q	S62	L68V,S92I,H95F,R97P,H98G,K161Q
S50*	S92I,E93P,H95F,R97P,H98G,K161N	S63	L68V,S92M,H95F,R97P,H98G,K161N
*de referencia			

Tabla 14 Lista de modificaciones de aminoácidos diseñadas en TNFRI105

No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido	No.	Posición y tipo de modificación de aminoácido
S31	L68V,S92I,H95F,R97P,H98A	S46	L68V,S92I,H95F,R97P,H98G
S36	L68V,S92M,H95F,R97P,H98A	S47	L68V,S92M,H95F,R97P,H98G
S41	L68V,S92H,H95F,R97P,H98A		

Las secuencias de aminoácidos de los mutantes del TNFRI171, TNFRI126 y TNFRI105 a los que se aplicaron las mutaciones combinadas están representadas por las SEQ ID NOS: 6 a 99.

5 (2) Construcción de ADN que codifica mutantes del TNFRI

Se construyeron mutantes del TNFRI específicos de sitio utilizando mutagénesis dirigida al sitio. Los cebadores que se emplearon para la construcción de mutantes de TNFRI que contienen las mutaciones de aminoácidos de las Tablas 12 a 14 se resumen en la Tabla 15, a continuación. Los ADN que codifican los mutantes del TNFRI se construyeron de la misma manera que en (2) de [ejemplo de preparación 2], con la excepción de que se emplearon los pares de cebadores mostrados en la Tabla 15.

10

Tabla 15 Cebadores para la mutagénesis dirigida al sitio

Mutación No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
S31 (pET-TNFRI_S31)	pET-TNFRI_A2	5'-cacaaggacgtacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacacgtacgtccctttgtg-3'
S32 (pET-TNFRI_S32)	pET-TNFRI_A2	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagtttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S33 (pET-TNFRI_S33)	pET-TNFRI_A2	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagttgta-3' 5'-tacaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S34 (pET-TNFRI_S34)	pET-TNFRI_A2	5'-ttgtgctaccagattcagaatgtaaggca-3' 5'-tgccctaacattctgaatctgggtaggcacaa-3'
S35 (pET-TNFRI_S35)	pET-TNFRI_A2	5'-atgtaaggcactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtggctcctgagttctcagtgcccttaacat-3'
S36 (pET-TNFRI_S36)	pET-TNFRI_A9	5'-cacaaggacgtacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacacgtacgtccctttgtg-3'
S37 (pET-TNFRI_S37)	pET-TNFRI_A9	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagtttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'

ES 2 626 418 T3

Mutación No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
S38 (pET-TNFRI_S38)	pET-TNFRI_A9	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S39 (pET-TNFRI_S39)	pET-TNFRI_A9	5'-ttgtgcctacccagattcagaatgtaaggga-3' 5'-tgcccttaacattctgaatctgggtaggcacaa-3'
S40 (pET-TNFRI_S40)	pET-TNFRI_A9	5'-atgtaagggaactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtggtgctgagttctcagtgccctaacat-3'
S41 (pET-TNFRI_S41)	pET-TNFRI_A18	5'-cacaagggaactgacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacagtcagtcctttgtg-3'
S42 (pET-TNFRI_S42)	pET-TNFRI_A18	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S43 (pET-TNFRI_S43)	pET-TNFRI_A18	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S44 (pET-TNFRI_S44)	pET-TNFRI_A18	5'-ttgtgcctacccagattcagaatgtaaggga-3' 5'-tgcccttaacattctgaatctgggtaggcacaa-3'
S45 (pET-TNFRI_S45)	pET-TNFRI_A18	5'-atgtaagggaactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtggtgctgagttctcagtgccctaacat-3'
S46 (pET-TNFRI_S46)	pET-TNFRI_A21	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGaacagctcaggcaccggcagaaaattCTC-3'
S47 (pET-TNFRI_S47)	pET-TNFRI_A22	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAGaacagctcaggcaccggcagaaaattCTC-3'
S48 (pET-TNFRI_S48)	pET-TNFRI_A26	5'-cacaagggaactgacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacagtcagtcctttgtg-3'
S49 (pET-TNFRI_S49)	pET-TNFRI_A26	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S50	pET-TNFRI_A26	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3'
(pET-TNFRI_S50)		5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S51 (pET-TNFRI_S51)	pET-TNFRI_A26	5'-ttgtgcctacccagattcagaatgtaaggga-3' 5'-tgcccttaacattctgaatctgggtaggcacaa-3'
S52 (pET-TNFRI_S52)	pET-TNFRI_A26	5'-atgtaagggaactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtggtgctgagttctcagtgccctaacat-3'
S53 (pET-TNFRI_S53)	pET-TNFRI_S31	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'

Mutación No.	Cebador	
	Plantilla PCR	Secuencia del cebador
S54 (pET-TNFRI_S54)	pET-TNFRI_S31	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S55 (pET-TNFRI_S55)	pET-TNFRI_S31	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtgggcctgagttctcagtgccctaacat-3'
S56 (pET-TNFRI_S56)	pET-TNFRI_S36	5'-atctgcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S57 (pET-TNFRI_S57)	pET-TNFRI_S36	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S58 (pET-TNFRI_S58)	pET-TNFRI_S36	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtgggcctgagttctcagtgccctaacat-3'
S59 (pET-TNFRI_S59)	pET-TNFRI_S41	5'-atctgcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S60 (pET-TNFRI_S60)	pET-TNFRI_S41	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S61 (pET-TNFRI_S61)	pET-TNFRI_S41	5'-atgtaagggcactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtgggcctgagttctcagtgccctaacat-3'
S62 (pET-TNFRI_S62)	pET-TNFRI_S46	5'-atctgcctgtcaggagcagcagaatacagttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S63 (pET-TNFRI_S63)	pET-TNFRI_S47	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttga-3' 5'-tacaaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'

(3) Producción de Met-TNFRI y mutantes Met-TNFRI biológicamente activos en *E. coli*

Los Met-TNFRI y mutantes Met-TNFRI construidos anteriormente se produjeron y purificaron de acuerdo con el procedimiento descrito en (3) de [ejemplo de preparación 2].

[Ejemplo experimental 7] Ensayo de afinidad de los mutantes del Met-TNFRI para TNF- α

- 5 La afinidad del Met-TNFRI para TNF- α se ensayó utilizando el mismo procedimiento que en el [ejemplo experimental 1] (Tablas 16 a 18).

[Ejemplo experimental 8] Resistencia de Met-TNFRI y mutantes de Met-TNFRI a proteasas

- 10 La resistencia a proteasa se evaluó de la misma manera que en [ejemplo experimental 3] (Tablas 16 a 18). La resistencia de los mutantes superlead representativos TNFRI171-S31, TNFRI171-S47, TNFRI171-S53 y TNFRI171-S63 a pancreatina se muestra en la FIG. 9. Se usó el fragmento del TNFRI171 como control.

Tabla 16 Resistencia de afinidad y proteasa de mutantes superlead

Mutante No.	Afinidad relativa para el ligando (%)	Resistencia relativa a la proteasa (%)
(TNFRI171) Tipo silvestre	100	100
TNFRI171-S31	563	97
TNFRI171-S32*	668	48

ES 2 626 418 T3

Mutante No.	Afinidad relativa para el ligando (%)	Resistencia relativa a la proteasa (%)
TNFRI171-S33*	568	50
TNFRI171-S34*	700	48
TNFRI171-S35*	521	44
TNFRI171-S36	510	120
TNFRI171-S37*	668	57
TNFRI171-S38*	589	61
TNFRI171-S39*	705	57
TNFRI171-S40*	773	56
TNFRI171-S41	558	126
TNFRI171-S42*	416	67
TNFRI171-S43*	579	68
TNFRI171-S44*	694	69
TNFRI171-S45*	679	67
TNFRI171-S46	805	81
TNFRI171-S47	758	98
TNFRI171-S48	594	36
TNFRI171-S49*	547	14
TNFRI171-S50*	589	14
TNFRI171-S51*	537	14
TNFRI171-S52*	626	15
TNFRI171-S53	1017	123
TNFRI171-S54	900	125
TNFRI171-S55	973	85
TNFRI171-S56	510	129
TNFRI171-S57	773	159
TNFRI171-S58	978	123
TNFRI171-S59	684	148
TNFRI171-S60	775	132
TNFRI171-S61	778	112
TNFRI171-S62	1196	105
TNFRI171-S63	1354	124
*de referencia		

Tabla 17 Resistencia de afinidad y proteasa de mutantes superlead

Mutante No.	Afinidad relativa para el ligando (%)	Resistencia relativa a la proteasa (%)
(TNFRI126) Tipo silvestre	100	100
TNFRI126-S31	457	137
TNFRI126-S36	489	159
TNFRI126-S41	432	157
TNFRI126-S46	412	87
TNFRI126-S47	501	94
TNFRI126-S48	477	84
TNFRI126-S53	522	156
TNFRI126-S54	448	161
TNFRI126-S56	602	172
TNFRI126-S57	465	191
TNFRI126-S59	463	171
TNFRI126-S60	397	163
TNFRI126-S62	543	129
TNFRI126-S63	486	142

Tabla 18 Resistencia de afinidad y proteasa de mutantes superlead

Mutante No.	Afinidad relativa para el ligando (%)	Resistencia relativa a la proteasa (%)
(TNFRI105) Tipo silvestre	100	100
TNFRI105-S31	453	153
TNFRI105-S36	459	167
TNFRI105-S41	403	182
TNFRI105-S46	547	137
TNFRI105-S47	497	143

- 5 **[Ejemplo experimental 9]** Eficacia terapéutica de 8 Mutantes TNFRI171 (S54, S62, A2, A9, S36, S57, S58, S63) para edema de pata inducido por carragenano en ratones

In vivo se determinó la eficacia terapéutica de los mutantes mediante este experimento. La eficacia terapéutica de los mutantes del acuerdo con la presente invención se ensayó in vivo. Para ello, 8 mutantes que presentan alta resistencia a la proteasa y/o afinidad por TNF- α , se inyectaron por vía subcutánea en ratones que sufrían de edema de pata inducido por carragenano y se midieron el tamaño de edema de pata y el nivel de IL-6 en las patas.

10 Se prepararon 0,25 mg/ml de 8 mutantes del TNFRI171 (TNFRI171-S54, TNFRI171-S62, TNFRI171-A2, TNFRI171-A9, TNFRI171-S36, TNFRI171-S57, TNFRI171-S58 y TNFRI171-S63), 0,25 mg/ml de (fragmento WT, TNFRI171) de tipo silvestre, un vehículo (NaPO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0), 0,5 mg/ml de Enbrel (Wyeth). Los ratones ICR (20~25 g), de 5 semanas, adquiridos de OrientBio (CRJ) se aclimataron durante aproximadamente 7 días en el Gyeonggi Bio-Center antes del uso. Se les permitió el acceso libre al agua y al alimento bajo condiciones automatizadas de temperatura (23 \pm 2°C), humedad (55 \pm 5%) y ciclo de luz/oscuridad (12 horas). Cada grupo constaba de 5 ratones. Como inductor de inflamación, el lambda-carragenano (Sigma) se disolvió en agua destilada

para formar una solución al 1%. Esta solución de carragenano se administró a una dosis de 50 µl en la pata derecha por inyección intraplantar utilizando una jeringa de aguja fina (BD)

5 El fármaco y las sustancias de interés se administraron de acuerdo con sus propiedades PK. Enbrel, que tiene una semivida larga, se administró 2 horas antes de la inyección de carragenano mientras que los 8 mutantes, WT y el vehículo se introdujeron en los ratones 30 min antes de la inyección de carragenano. Se administraron en el cuello por inyección subcutánea (SC). Enbrel se inyectó a una dosis de 5 mg/kg/10 ml mientras que la dosis de inyección de WT y los candidatos fue de 2,5 mg/kg/10 ml.

10 Antes y 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección de carragenano, se midió el volumen de la pata derecha utilizando pletismómetro (Ugo Basile). Se hizo una marca en el tobillo de la pata derecha antes de la medición para que la diferencia en cada medida podría ser evitado. Después de la medición del tamaño del edema durante 4 horas, todos los animales fueron sacrificados con CO₂, y las patas derechas fueron extirpadas y almacenadas a -70°C en un ultracongelador (Thermo) antes del análisis. Con el fin de medir el nivel de IL-6 en el tejido de la pata, las patas se descongelaron y se cortaron finamente utilizando tijeras y se molieron en 500 µl de PBS utilizando un homogeneizador. Después de la centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se dividió en 100 µl para análisis de proteínas y 200 µl para el análisis de IL-6 y se almacenó a -70°C en un ultracongelador (Thermo). El análisis cuantitativo de la proteína se llevó a cabo utilizando el procedimiento Bradford mientras que el nivel de IL-6 se determinó utilizando un kit ELISA (Komabiotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y normalizó a la cantidad de proteína. Los niveles de IL-6 se representan como porcentajes basados en el grupo vehículo y se muestran en la FIG. 10.

20 Dos horas después de la inyección intraplantar del carragenano, como se puede ver en la FIG. 10A, se observó que los edemas de todos los grupos de ensayo, excepto el grupo S63 y el grupo Enbrel, se redujeron significativamente en tamaño, en comparación con el grupo vehículo. Cuatro horas después de la inyección intraplantar de carragenano, el edema en los pies de todos los grupos de ensayo se había reducido con significación (P <0,01), en comparación con el grupo de vehículo. Como se puede ver, la FIG. 10B, el nivel de citocina inflamatoria IL-6 se redujo significativamente en todos los grupos de ensayo, en comparación con el grupo de vehículo (P <0,01), cuatro horas después de la inyección intraplantar de carragenano. La actividad inhibitoria frente a IL-6 fue notoria en los grupos S54, S62, S36, S57, S58 y S63, en comparación con el grupo Enbrel, con la actividad más elevada obtenida del grupo S58 (P <0,01).

30 **[Ejemplo experimental 10]** Comparación de eficacia terapéutica del edema de pata inducido por el carragenano en ratones entre TNFRI171-S63 y (fragmento de TNFRI171) tipo silvestre

35 En consideración de las propiedades físicas y los resultados in vivo de los mutantes del TNFRI171, se seleccionó uno (TNFRI171-S63) y se comparó con un vehículo (NaPO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0), Enbrel (Wyeth) y WT (fragmento del TNFRI171). WT se formuló a 0,25 mg/ml mientras que cada uno de los mutantes del TNFRI171-S63 y Enbrel se formulaban a una concentración de 0,5 mg/ml. El volumen del edema de la pata y el nivel de IL-6 se midieron de la misma manera que en el [ejemplo experimental 9] para evaluar la eficacia terapéutica in vivo del mutante. El resultado se muestra en la FIG. 11.

40 Dos horas después de la inyección intraplantar de carragenano, como se puede ver en la FIG. 11A, se observó que los edemas del grupo administrado con TNFRI171-S63 a una dosis de 5 mg/kg se redujeron significativamente en tamaño, en comparación con el grupo vehículo. Cuatro horas después de la inyección intraplantar de carragenano, el edema en el grupo Enbrel y el grupo TNFRI171-S63 (5 mg/kg) se había reducido significativamente, en comparación con el grupo vehículo. Se produjo una mayor reducción del edema en el grupo TNFRI171-S63 (5 mg/kg) que en el grupo positivo administrado con Enbrel a una dosis de 5 mg/kg (FIG. 11A).

45 Como se puede ver en la FIG. 11B, el nivel de la citocina IL-6 inflamatoria se redujo significativamente en todos los grupos de ensayo excepto en el grupo WT (2,5 mg/kg), en comparación con el grupo vehículo (P <0,01), cuatro horas después de la inyección intraplantar de carragenano (FIG. 11B). La actividad inhibitoria frente a IL-6 fue notable en ambos grupos que recibieron TNFRI171-S63 a una dosis de 2,5 mg/kg y 5 mg/kg, en comparación con el grupo Enbrel (5 mg/kg). Dada la misma concentración, se encontró que WT y Enbrel reducen la IL-6 de forma similar. En consecuencia, TNFRI171-S63 exhibió excelentes efectos inhibitorios sobre el edema y la IL-6, en comparación con WT y Enbrel.

50 <110> Hanall Biopharma Co., Ltd.

<120> Polipéptidos modificados del receptor 1 del factor de necrosis tumoral humano 1 o fragmentos de los mismos y procedimiento de preparación de los mismos

<130> P11047-HAN-PCT

<160> 102

55 <170> KopatentIn 1.71

ES 2 626 418 T3

<210> 1

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(455)

<223> TNFRI de tipo silvestre

<400> 1

```

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

```

10

ES 2 626 418 T3

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 2

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(171)

<400> 2

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(126)

<400> 3

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(105)

<400> 4

```

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

```

10

<210> 5

<211> 516

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> SECUENCIA SINTÉTICA DE ÁCIDO NUCLEICO TNFRI171 (Para expresión bacteriana)

<400> 5

```
gatagcgtgt gcccgaggg taagtatatt catccgcaa ataaactctat ctgttgca 60
aagtgtcaca aagggacgta cctgtataat gactgtccgg gccgggtca ggataccgac 120
tgccgcgagt gcgagagtgg gtcatttaca gcgagtgaga atcatctgog ccactgcctg 180
agctgttcta agtgtcgtaa agagatgggc caagttgaaa tttcttcatg tacggtagac 240
cgcgatacgg tatgtggttg ccgtaaaaac cagtatcgcc attattggtc agaaaacctg 300
ttccagtgtt ttaattgctc cctgtgtctg aacggcactg tgcactctgc ctgtcaggag 360
aagcagaata cagtttgtag ctgccatgca ggtttcttcc taagagaaaa cgagtgtgct 420
tctgttagta actgtaagaa aagcctggag tgcacgaagt tgtgcctacc ccagattgag 480
aatgttaagg gcactgagga ctcaggcacc acataa 516
```

<210> 6

5 <211> 455

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S31 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A

10 <400> 6

ES 2 626 418 T3

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn

ES 2 626 418 T3

```

                325                330                335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
      340                345                350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
      355                360                365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
      370                375                380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
      385                390                395
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
      405                410                415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
      420                425                430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
      435                440                445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
      450                455

```

<210> 7

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S32 S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 7

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

145              150              155              160
Gln Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
      165              170
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
      180              185              190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
      195              200              205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
      210              215              220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
      225              230              235
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
      245              250              255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
      260              265              270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
      275              280              285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
      290              295              300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
      305              310              315              320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
      325              330              335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
      340              345              350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
      355              360              365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
      370              375              380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
      385              390              395              400
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
      405              410              415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
      420              425              430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
      435              440              445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
      450              455

```

<210> 8

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S33 S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

ES 2 626 418 T3

<400> 8

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

ES 2 626 418 T3

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 9

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S34 S92I/H95F/R97P/H98A/E200Q

<400> 9

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

10

ES 2 626 418 T3

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Gln Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 10

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S35 S92I/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 10

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1                               5 10 15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20                               25 30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35                               40 45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50                               55 60
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65                               70 75 80
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85                               90 95
Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100                              105 110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115                              120 125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130                              135 140
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145                              150 155 160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165                              170 175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180                              185 190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
 195                              200 205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210                              215 220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225                              230 235 240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245                              250 255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260                              265 270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275                              280 285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290                              295 300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305                              310 315 320

```


ES 2 626 418 T3

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 11

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 11

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

ES 2 626 418 T3

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 12

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S37 S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 12

ES 2 626 418 T3

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Gln Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly

ES 2 626 418 T3

```

305              310              315              320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
              325              330
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
              340              345              350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
              355              360              365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
              370              375              380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
              385              390              395              400
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
              405              410              415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
              420              425              430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
              435              440              445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
              450              455

```

<210> 13

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S38 S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 13

```

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

```

ES 2 626 418 T3

130						135									140
Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu
145					150					155					160
Asn	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Glu
				165					170					175	
Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr
			180					185					190		
Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser
		195					200					205			
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Leu
	210					215					220				
Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Arg	Trp	Lys
225				230						235					240
Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu
				245					250					255	
Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser
			260					265					270		
Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val
		275					280					285			
Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys
	290					295						300			
Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly
305					310					315					320
Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn
				325					330					335	
Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp
			340					345					350		
Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro
		355					360					365			
Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu
	370					375					380				
Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln
385					390					395					400
Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala
				405					410					415	
Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Arg	Asp	Met	Asp	Leu	Leu	Gly
			420					425					430		
Cys	Leu	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Ala	Leu	Cys	Gly	Pro	Ala	Ala	Leu	Pro
		435					440					445			
Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg									
	450					455									

<210> 14

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S39 S92M/H95F/R97P/H98A/E200Q

<400> 14

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1           5           10           15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
          20           25           30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
          35           40           45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
          50           55           60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
          65           70           75           80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
          85           90           95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
          100          105          110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
          115          120          125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
          130          135          140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
          145          150          155          160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
          165          170          175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
          180          185          190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Gln Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
          195          200          205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
          210          215          220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
          225          230          235          240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
          245          250          255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
          260          265          270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
          275          280          285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
          290          295          300

```

ES 2 626 418 T3

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 15

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S40 S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 15

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

ES 2 626 418 T3

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 16

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S41 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A

<400> 16

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
  1           5           10           15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
  20           25           30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
  35           40           45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
  50           55           60
Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
  65           70           75           80
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala His Glu Asn Phe Leu
  85           90           95
Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
  100          105          110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
  115          120          125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
  130          135          140
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
  145          150          155          160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
  165          170          175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
  180          185          190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
  195          200          205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
  210          215          220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
  225          230          235          240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
  245          250          255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
  260          265          270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
  275          280          285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
  290          295          300

```

ES 2 626 418 T3

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 17

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S42 S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 17

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

ES 2 626 418 T3

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Gln Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 18

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S43 S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 18

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1          5          10          15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20          25          30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35          40          45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50          55          60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65          70          75          80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala His Glu Asn Phe Leu
 85          90          95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100          105          110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115          120          125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130          135          140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145          150          155          160

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165          170          175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180          185          190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195          200          205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210          215          220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225          230          235          240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
245          250          255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
260          265          270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
275          280          285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys

```

ES 2 626 418 T3

```

                290                      295                      300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
305                      310                      315                      320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
325                      330
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
340                      345                      350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
355                      360                      365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
370                      375                      380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
385                      390                      395                      400
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
405                      410
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420                      425                      430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435                      440                      445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450                      455

```

<210> 19

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S44 S92H/H95F/R97P/H98A/E200Q

<400> 19

```

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

```


ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S45 S92H/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 20

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
  1          5          10          15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
  20          25          30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
  35          40          45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
  50          55          60
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
  65          70          75          80
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala His Glu Asn Phe Leu
  85          90          95
Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100          105          110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115          120          125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130          135          140
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145          150          155          160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165          170          175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180          185          190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
 195          200          205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210          215          220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225          230          235          240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245          250          255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260          265          270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275          280          285

```

ES 2 626 418 T3

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 21

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S46 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G

<400> 21

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

ES 2 626 418 T3

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 22

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI-S47 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G

<400> 22

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1          5          10          15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20          25          30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35          40          45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50          55          60
Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65          70          75          80
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85          90          95
Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100          105          110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115          120          125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
130          135          140
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145          150          155          160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165          170          175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180          185          190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
195          200          205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210          215          220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225          230          235          240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
245          250          255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
260          265          270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
275          280          285

```

ES 2 626 418 T3

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 23

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S48 L68V/S92I/E93P/H95F/R97P/H98G

<400> 23

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Pro Asn Phe Leu
 85 90 95

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

ES 2 626 418 T3

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg

450

455

5 <210> 24
<211> 455

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S49 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161Q

5 <400> 24

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

                275                280                285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290                295                300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305                310                315                320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325                330                335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340                345                350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355                360                365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370                375                380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385                390                395                400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405                410                415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420                425                430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435                440                445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450                455

```

<210> 25

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S50 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 25

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1                5                10                15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20                25

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35                40                45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50                55                60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65                70                75                80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Pro Asn Phe Leu
 85                90                95

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val

```


ES 2 626 418 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S51 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/E200Q

<400> 26

```

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

```


ES 2 626 418 T3

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 27

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S52 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/D207N

<400> 27

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Pro Asn Phe Leu
 85 90 95

ES 2 626 418 T3

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
 195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 28

<211> 455

5 <212> PRT

ES 2 626 418 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S53 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 28

```

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

```

5

ES 2 626 418 T3

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 29

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 29

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95

ES 2 626 418 T3

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175
 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 30

<211> 455

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S55 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/D207N

5 <400> 30

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

                260                265                270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
      275                280                285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
      290                295                300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
      305                310                315
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
      325                330                335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
      340                345                350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
      355                360                365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
      370                375                380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
      385                390                395
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
      405                410                415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
      420                425                430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
      435                440                445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
      450                455

```

<210> 31

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S56 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 31

```

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

```

ES 2 626 418 T3

85					90					95					
Pro	Ala	Cys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	Met	Gly	Gln	Val
			100					105					110		
Glu	Ile	Ser	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gly	Cys	Arg
			115				120					125			
Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp	Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	Phe
	130					135					140				
Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu
145						150					155				160
Gln	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Arg	Glu
				165					170						175
Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr
			180					185					190		
Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser
			195				200						205		
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Leu
	210					215						220			
Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Arg	Trp	Lys
225						230					235				240
Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu
				245					250					255	
Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser
			260					265					270		
Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val
			275				280					285			
Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys
	290					295					300				
Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly
305						310					315				320
Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn
				325					330					335	
Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp
			340					345					350		
Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro
		355					360					365			
Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu
	370					375					380				
Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln
385						390					395				400
Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala
				405					410					415	
Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Arg	Asp	Met	Asp	Leu	Leu	Gly
			420					425					430		
Cys	Leu	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Ala	Leu	Cys	Gly	Pro	Ala	Ala	Leu	Pro
			435				440					445			
Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg									
	450					455									

ES 2 626 418 T3

<211> 455

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> TNFRI-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 32

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1           5           10           15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20           25           30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35           40           45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50           55           60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65           70           75           80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85           90           95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100          105

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115          120          125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130          135          140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145          150          155

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165          170          175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180          185          190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195          200          205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210          215          220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225          230          235          240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245          250          255

```

ES 2 626 418 T3

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 33

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 33

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S59 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

5 <400> 34

```

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

```

ES 2 626 418 T3

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 35

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S60 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 35

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
 35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80

ES 2 626 418 T3

<210> 36

<211> 455

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> TNFRI-S61 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 36

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

                245                250                255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
      260                265
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
      275                280                285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
      290                295                300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
      305                310                315
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
      325                330                335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
      340                345                350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
      355                360                365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
      370                375                380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
      385                390                395
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
      405                410                415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
      420                425                430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
      435                440                445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
      450                455

```

<210> 37

<211> 455

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 37

```

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

```


ES 2 626 418 T3

<210> 38

<211> 455

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> TNFRI-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 38

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
  1                               5                               10                               15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
  20                               25                               30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln
  35                               40                               45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
  50                               55                               60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
  65                               70                               75                               80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
  85                               90                               95

Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
  100                              105                              110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
  115                              120                              125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
  130                              135                              140

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
  145                              150                              155                              160

Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
  165                              170                              175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
  180                              185                              190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
  195                              200                              205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
  210                              215                              220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
  225                              230                              235                              240

```

ES 2 626 418 T3

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270

Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 275 280 285

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 290 295 300

Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 305 310 315 320

Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 39

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI171-S31 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 39

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 40

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S32 S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 40

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 41

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S33 S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 41

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 42

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S34 S92I/H95F/R97P/H98A/E200Q

<400> 42

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

          50              55              60
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65              70              75              80
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
          85              90
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
          100              105              110
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
          115              120              125
His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
          130              135              140
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Gln
          145              150              155              160
Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
          165              170

```

<210> 43

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S35 S92I/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 43

```

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

```

ES 2 626 418 T3

<210> 44

<211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> TNFRI 171-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 44

```

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

```

<210> 45

10 <211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S37 S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

15 <400> 45

```

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

```


ES 2 626 418 T3

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

<210> 46

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S38 S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 46

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

ES 2 626 418 T3

<210> 47

<211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> TNFRI 171-S39 S92M/H95F/R97P/H98A/E200Q

<400> 47

```

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

```

<210> 48

10 <211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S40 S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

15 <400> 48

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1           5           10           15
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
          20           25           30

```

ES 2 626 418 T3

```

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
   35                               40                               45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
   50                               55                               60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
   65                               70                               75                               80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
   85                               90                               95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
  100                               105                               110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
  115                               120                               125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
  130                               135                               140

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

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser Gly Thr Thr
  165                               170

```

<210> 49

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S41 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A

<400> 49

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 50

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S42 S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 50

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 51

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S43 S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 51

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1           5           10           15
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys

```


ES 2 626 418 T3

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1                    5                                10                    15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
 20                    25                                30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
 35                    40                                45

Phe Thr Ala His Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50                    55                                60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65                    70                                75                                80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
 85                    90                                95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100                   105                                110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115                   120                                125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130                   135                                140

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

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165                   170

```

<210> 53

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S45 S92H/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 53

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 54

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S46 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G

<400> 54

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1          5          10          15

```


ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 55

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S47 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G

<400> 55

ES 2 626 418 T3

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1                    5                                10                15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
                20                    25                                30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
          35                    40                                45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50                    55                                60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65                    70                                75                                80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
          85                    90                                95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
          100                    105                            110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
          115                    120                            125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
          130                    135                            140

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

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
          165                                170

```

<210> 56

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S48 L68V/S92I/E93P/H95F/R97P/H98G

<400> 56

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 57

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S49 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 57

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 58

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S50 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 58

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 59

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S51 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/E200Q

<400> 59

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 60

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S52 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/D207N

ES 2 626 418 T3

```

<400>      60
Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
  1          5          10          15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
  20          25          30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
  35          40          45

Phe Thr Ala Ile Pro Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
  50          55          60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
  65          70          75          80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
  85          90          95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100          105          110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115          120          125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130          135          140

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

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser Gly Thr Thr
 165          170

```

<210> 61

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S53 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 61

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 62

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 62

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 63

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S55 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 63

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 64

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S56 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 64

```

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

```

ES 2 626 418 T3

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
 100 105 110
 Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Gln Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
 115 120 125
 His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
 130 135 140
 Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
 165 170

<210> 65

<211> 170

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 65

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

10 <210> 66

<211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI 171-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 66

```

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

```

<210> 67

5 <211> 171

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S59 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

10 <400> 67

ES 2 626 418 T3

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

<210> 68

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S60 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 68

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 69

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S61 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 69

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 70

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 70

```

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

```

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 71

<211> 171

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 171-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 71

```

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

```

10 <210> 72

<211> 126

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI126-S31 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A

5 <400> 72

```

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

```

<210> 73

<211> 126

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S32 S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 73

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 74

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S33 S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 74

```

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

```

10 <210> 75

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 626 418 T3

<220>

<223> TNFRI 126-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 75

```

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

```

5

<210> 76

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> TNFRI 126-S37 S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 76

```

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

```

<210> 77

ES 2 626 418 T3

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> TNFRI 126-S38 S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 77

```

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

<210> 78

<211> 126

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S41 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A

<400> 78

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 79

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S42 S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 79

```

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

```

10 <210> 80

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI 126-S43 S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 80

```

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

```

<210> 81

5 <211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S46 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G

10 <400> 81

```

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

```

<210> 82

<211> 126

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S47 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G

5 <400> 82

```

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

```

<210> 83

<211> 126

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S48 L68V/S92I/E93P/H95F/R97P/H98G

<400> 83

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 84

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S49 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 84

```

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

```

10 <210> 85

<211> 126

<212> PRT

ES 2 626 418 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S50 S92I/E93P/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 85

```

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

```

5

<210> 86

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> TNFRI 126-S53 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 86

```

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

```

<210> 87

ES 2 626 418 T3

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> TNFRI 126-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 87

```

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

```

<210> 88

<211> 126

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S56 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 88

ES 2 626 418 T3

```

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

```

<210> 89

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 89

```

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

```

10

<210> 90

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

ES 2 626 418 T3

<223> TNFRI 126-S59 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q

<400> 90

```

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

<210> 91

5 <211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S60 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N

10 <400> 91

```

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

<210> 92

<211> 126

15 <212> PRT

ES 2 626 418 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 126-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 92

```

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

```

5

<210> 93

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> TNFRI 171-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 93

```

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

```

ES 2 626 418 T3

<210> 94

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> TNFRI105-S31 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 94

```

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

<210> 95

10 <211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 105-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

15 <400> 95

```

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

<210> 96

ES 2 626 418 T3

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> TNFRI 105-S41 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A

<400> 96

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1                    5                      10                15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
                20                      25                30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
          35                      40                45

Phe Thr Ala His Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50                    55                      60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65                      70                75                80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
          85                      90                95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
          100                      105
    
```

<210> 97

<211> 105

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 105-S46 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G

<400> 97

```

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Gln Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
 1                    5                      10                15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
                20                      25                30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
          35                      40                45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 50                    55                      60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 65                      70                75                80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
          85                      90                95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn
          100                      105
    
```

15

<210> 98

<211> 105

ES 2 626 418 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 105-S47 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G

5 <400> 98

```

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

<210> 99

<211> 105

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TNFRI 105-S48 L68V/S92I/E93P/H95F/R97P/H98G

<400> 99

```

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

15 <210> 100

<211> 321

<212> ADN

ES 2 626 418 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Met-TNFR1105 secuencia del ácido nucleico sintética (para expresión bacteriana)

<400> 100

```
atggatagcg tgtgcccgca gggtaagtat attcatccgc aaaataactc tatctgttgc      60
acaaagtgtc acaaaggac gtacctgtat aatgactgtc cggggccggg tcaggatacc      120
gactgccgag agtgcgagag tgggtcattt acagcgagtg agaatcatct gcgccactgc      180
ctgagctggt ctaagtgtcg taaagagatg ggccaagtg aaatttcttc atgtacggta      240
gaccgcgata cggtatgtgg ttgccgtaa aaccagtatc gccattattg gtcagaaaac      300
ctgttccagt gttttaatta a                                     321
```

5

<210> 101

<211> 384

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Secuencia del ácido nucleico sintética Met-TNFR1126 (para expresión bacteriana)

<400> 101

```
atggatagcg tgtgcccgca gggtaagtat attcatccgc aaaataactc tatctgttgc      60
acaaagtgtc acaaaggac gtacctgtat aatgactgtc cggggccggg tcaggatacc      120
gactgccgag agtgcgagag tgggtcattt acagcgagtg agaatcatct gcgccactgc      180
ctgagctggt ctaagtgtcg taaagagatg ggccaagtg aaatttcttc atgtacggta      240
gaccgcgata cggtatgtgg ttgccgtaa aaccagtatc gccattattg gtcagaaaac      300
ctgttccagt gttttaattg ctccctgtgt ctgaacggca ctgtgcatct gtcctgtcag      360
gagaagcaga atacagtttg ttaa                                     384
```

<210> 102

15

<211> 519

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del ácido nucleico sintética Met-TNFR1171 (para expresión bacteriana)

20

<400> 102

ES 2 626 418 T3

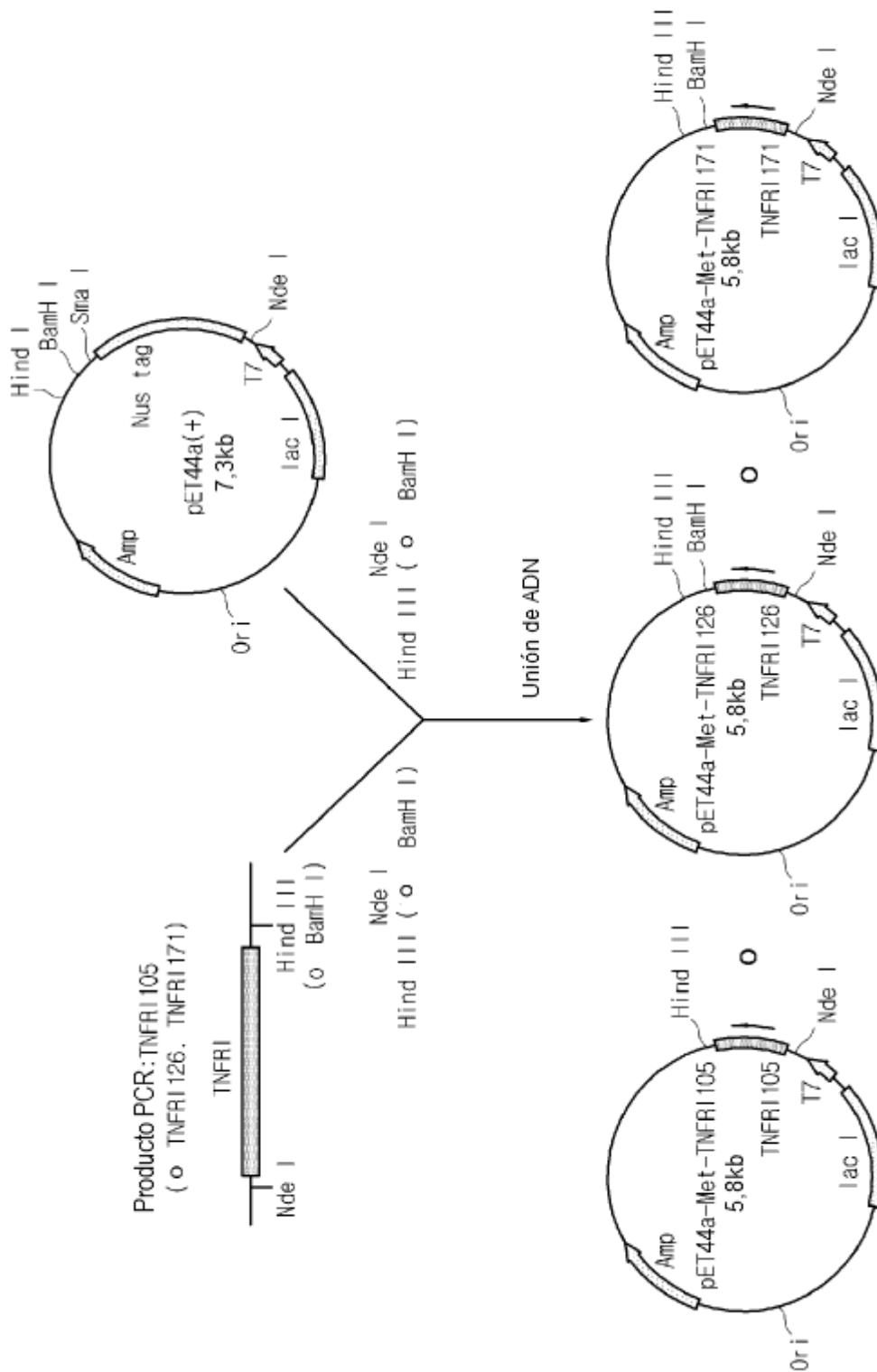
```
atggatagcg tgtgcccgca gggtaagtat attcatccgc aaaataactc tatctgttgc      60
acaaagtgtc acaaagggac gtacctgtat aatgactgtc cggggccggg tcaggatacc      120
gactgccgag agtgcgagag tgggtcattt acagcgagtg agaatcatct gcgccactgc      180
ctgagctggt ctaagtgtcg taaagagatg ggccaagttg aaatttcttc atgtacggta      240
gaccgcgata cgttatgtgg ttgccgtaa aaccagtatc gccattattg gtcagaaac      300
ctgttccagt gttttaattg ctccctgtgt ctgaacggca ctgtgcatct gtcctgtcag      360
gagaagcaga atacagtttg tacctgccat gcaggtttct ttctaagaga aaacgagtgt      420
gtctcctgta gtaactgtaa gaaaagcctg gagtgcacga agttgtgcct accccagatt      480
gagaatgta agggcactga ggactcaggc accacataa      519
```

REIVINDICACIONES

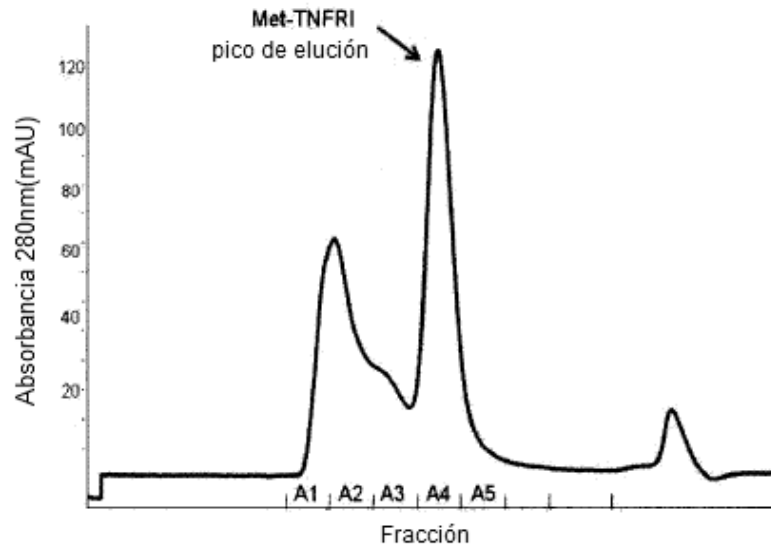
1. Un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI171) que consiste en los aminoácidos 41-211 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral representado por SEQ ID NO: 1;
- 10 una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI126) que consiste en los aminoácidos 41-166 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral representado por SEQ ID NO: 1; y
- 15 una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92H/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G y L68V/S92M/H95F/R97P/H98G en una secuencia de aminoácidos (TNFRI105) que consiste en los aminoácidos 41-145 de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral representado por SEQ ID NO: 1.
2. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de la reivindicación 1,
- 20 en el que la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI171 comprende además una modificación de un residuo de aminoácido en la posición 161 o 207; o
- la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI126 comprende además una modificación de un residuo de aminoácido en la posición 161.
3. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de la reivindicación 1, en el que los
- 25 residuos de aminoácidos se modifican de tal manera que:
- K en la posición 161 está sustituida con Q o N; y
- D en la posición 207 está sustituida con N.
4. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de la reivindicación 1,
- 30 en el que la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI171 comprende además una sustitución de E por P en la posición 93; o
- la secuencia de aminoácidos basada en la secuencia de aminoácidos del TNFRI126 comprende además una sustitución de E por P en la posición 93.
5. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de la reivindicación 2, que comprende una
- 35 modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161Q,
- L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N,
- L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/D207N,
- L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161Q,
- L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N,
- L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N,
- 40 L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161Q,
- L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/K161N,
- L68V/S92H/H95F/R97P/H98A/D207N,
- L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, y
- L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N.

6. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 39, 44, 49, 54, 55, 61-72, 75, 78, 81, 82, y 86-98.
- 5 7. Un complejo polipeptídico, que comprende dos o más copias del polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, estando dichas copias unidas covalentemente entre sí.
- 10 8. El polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una modificación química seleccionada del grupo que consiste en glicosilación, acilación, metilación, fosforilación, hasilación, carbamilación, sulfatación, prenilación, oxidación, guanidinación, amidinación, carbamilación, trinitrofenilación, nitración y PEGilación.
9. Un polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral, que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una modificación de aminoácidos de L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N en una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 41-211(TNFRI171) de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de tipo silvestre del receptor-1 del factor de necrosis tumoral representado por SEQ ID NO: 1.
- 15 10. Un gen que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El gen de la reivindicación 10, construido sobre la base de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 con modificaciones de codones, realizándose dichas modificaciones de codones para permitir que el gen se exprese en *E. coli*.
- 20 12. Un vector que lleva el gen de la reivindicación 10.
13. Una célula, transformada con el vector de la reivindicación 12.
14. La célula de la reivindicación 13, en el que la célula es *E. coli*.
15. Una formulación farmacéutica, que comprende el polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 16. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad mediada por TNF seleccionada del grupo que consiste en síndrome de dificultad respiratoria en adultos, anorexia, cáncer, síndrome de fatiga crónica, rechazo de huésped contra injerto, hiperalgesia, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad neuroinflamatoria, lesión por reperfusión/isquémica incluyendo isquemia cerebral, lesión cerebral como resultado de un traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedades oculares, dolor, pancreatitis, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, dermatosclerosis, esclerosis sistémica, vasculitis, vasculitis cerebral, síndrome de Sjogren, fiebre reumatoide, policondritis, polimialgia reumática, arteritis reumatoide y de células gigantes, choque séptico, efectos secundarios inducidos por radioterapia, lupus eritematoso sistémico, trastorno de la articulación temporomandibular, tiroiditis y trasplante de tejido, que comprende el polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 17. Una composición farmacéutica para uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad mediada por TNF seleccionada del grupo que consiste en síndrome de dificultad respiratoria en adultos, anorexia, cáncer, síndrome de fatiga crónica, rechazo de injerto contra huésped, hiperalgesia, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad neuroinflamatoria, isquemia incluyendo lesión por reperfusión/isquémica cerebral, trauma, epilepsia y hemorragia, cada una causante de neurodegeneración o lesión cerebral resultante de espasmos, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedades oculares, dolor, pancreatitis, fibrosis pulmonar, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis sero-negativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y
- 40 18. Un procedimiento de producción del polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende usar el gen de la reivindicación 10 o un vector que lleva el gen.
- 45 19. Un procedimiento de producción del polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende usar el gen de la reivindicación 10 o un vector que lleva el gen.
- 50 20. Un procedimiento de producción del polipéptido modificado del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende usar el gen de la reivindicación 10 o un vector que lleva el gen.

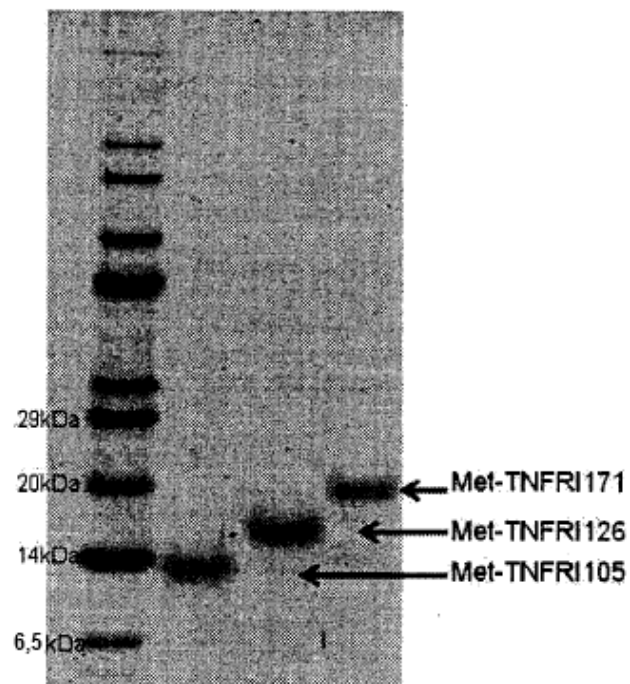
[Fig. 1]



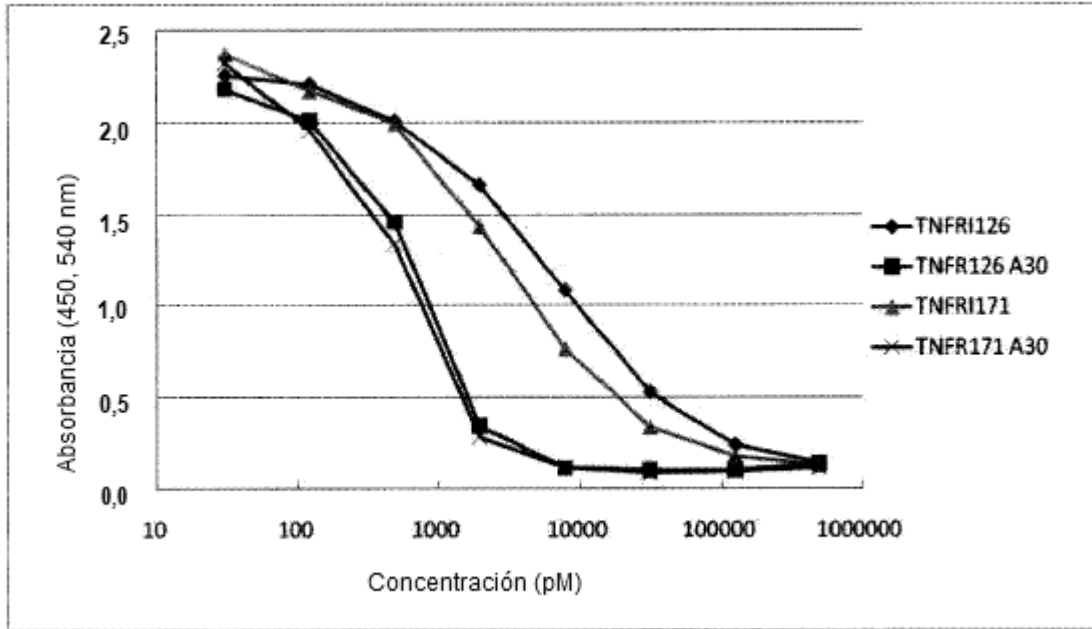
[Fig. 2a]



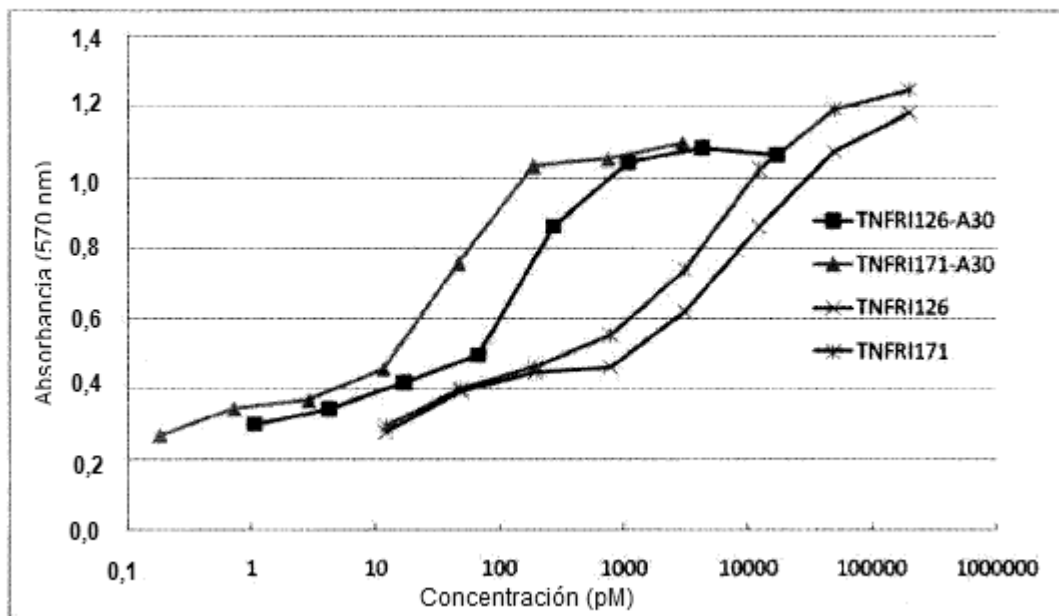
[Fig. 2b]



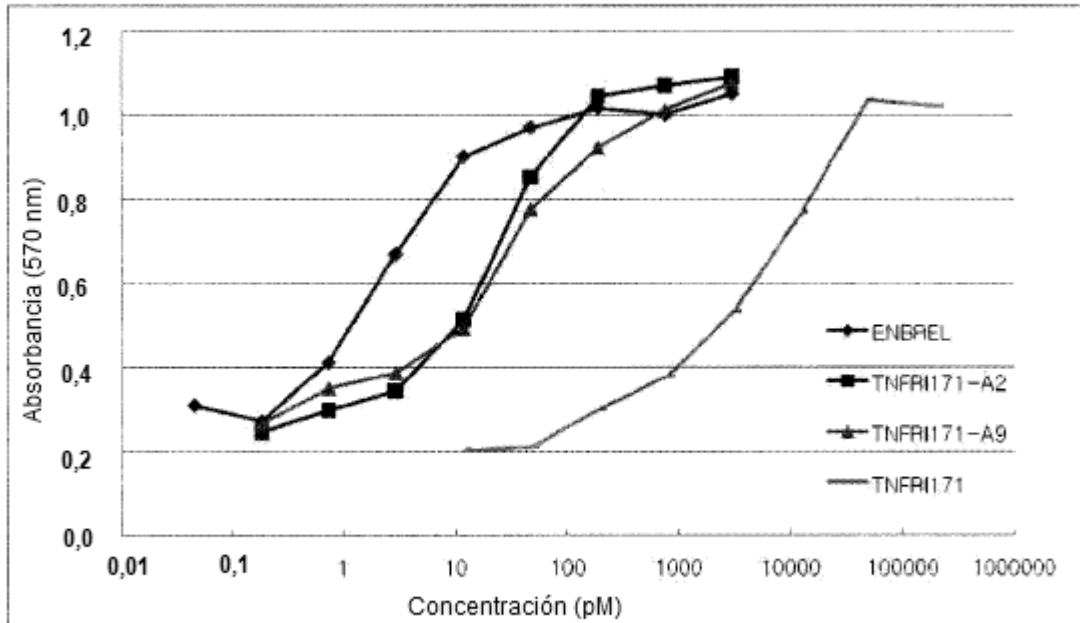
[Fig. 3]



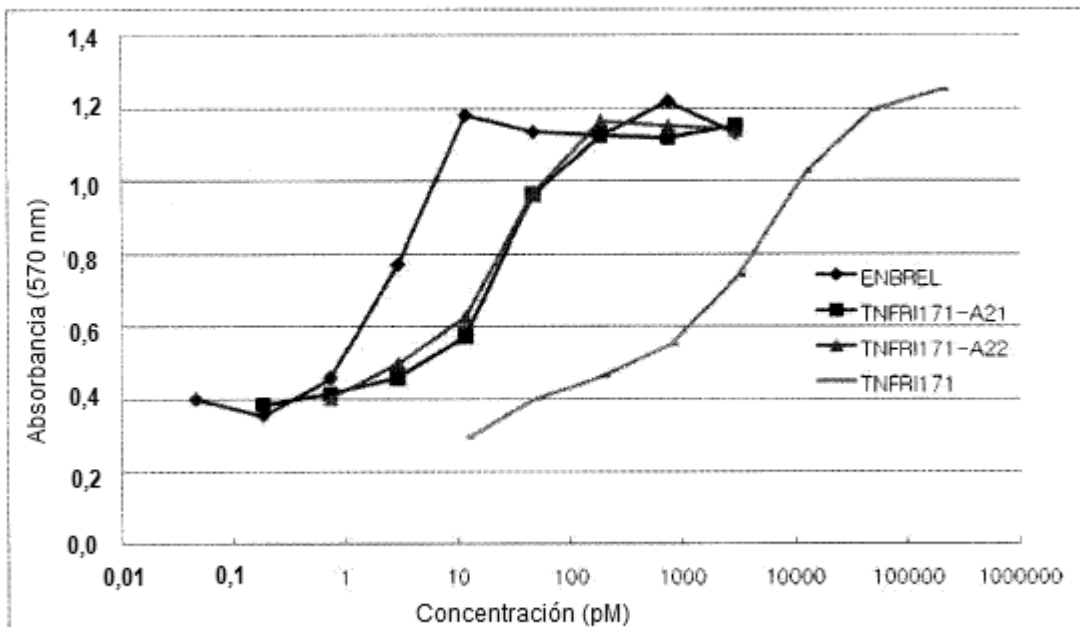
[Fig. 4a]



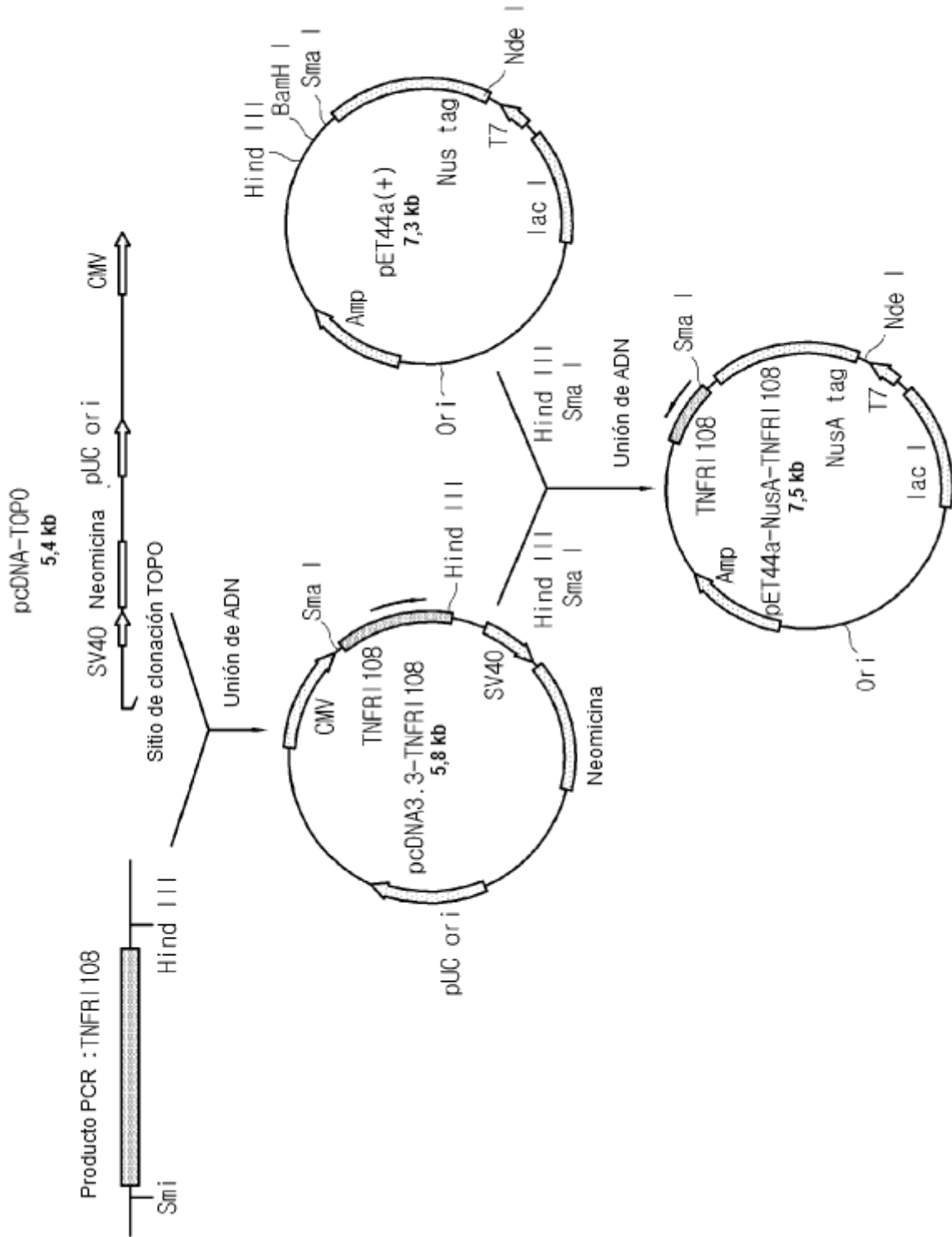
[Fig. 4b]



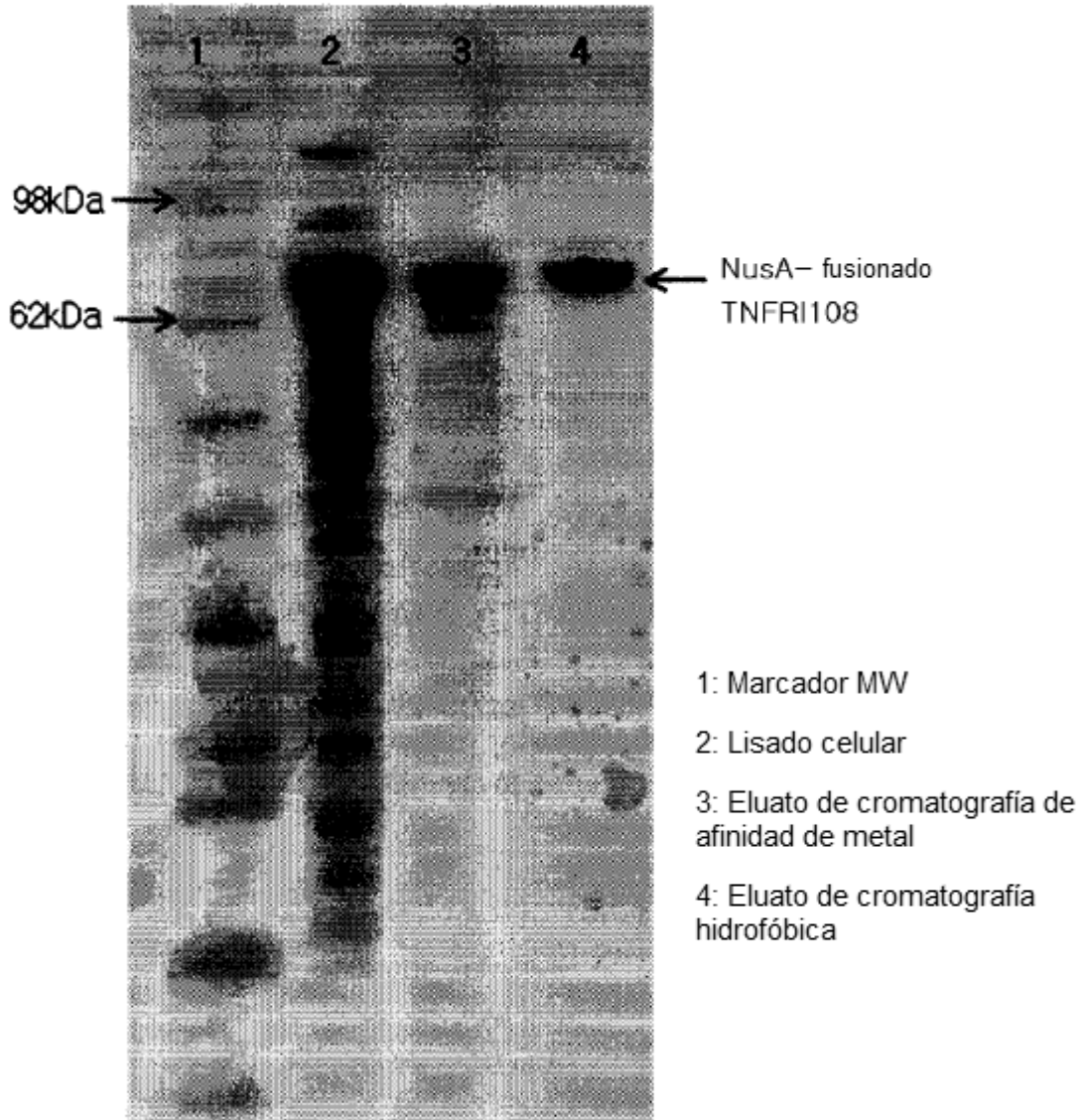
[Fig. 4c]



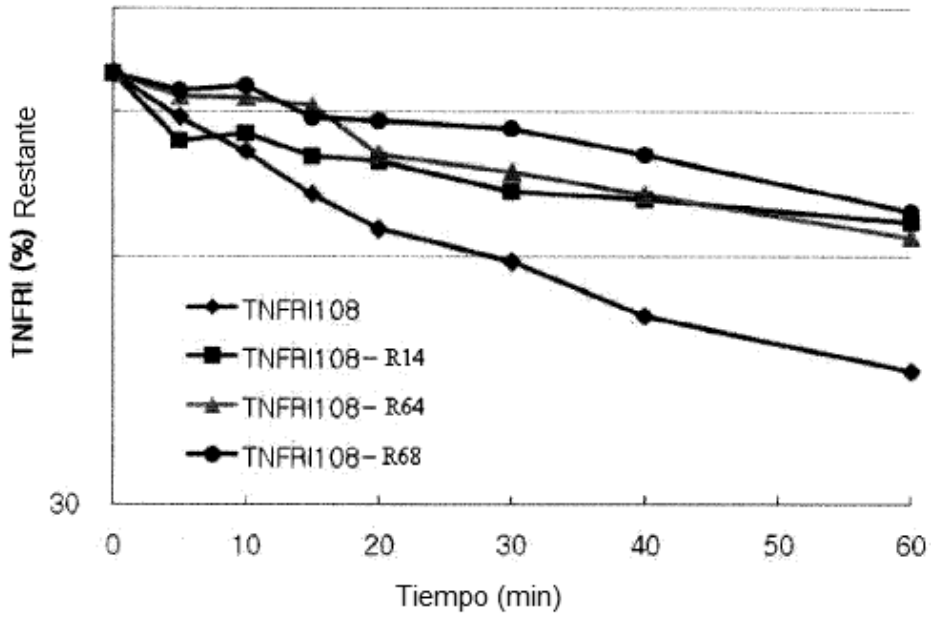
[Fig. 5]



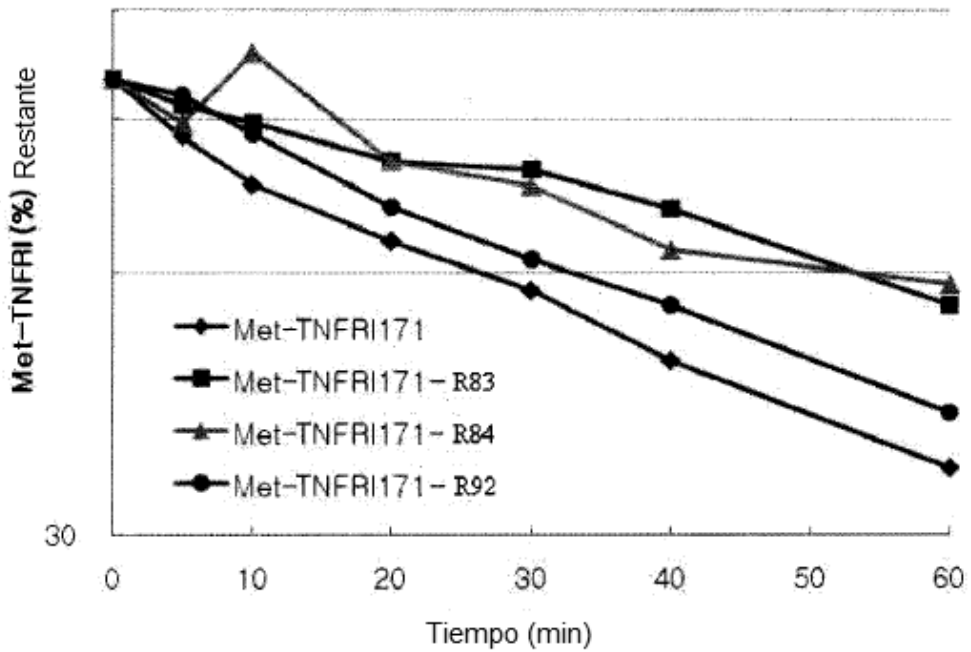
[Fig. 6]



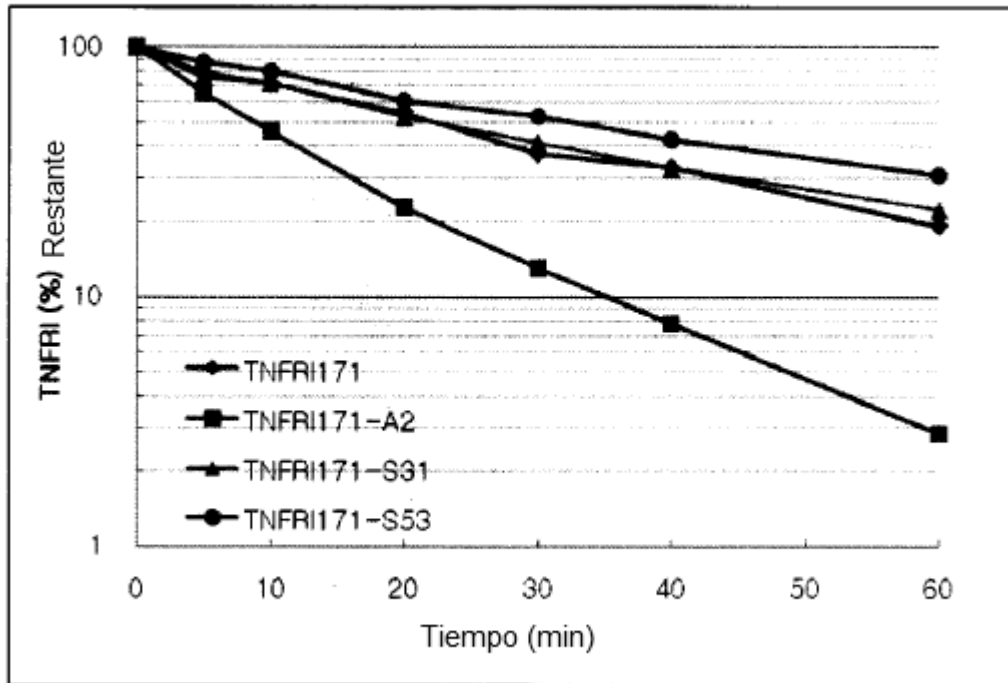
[Fig. 7]



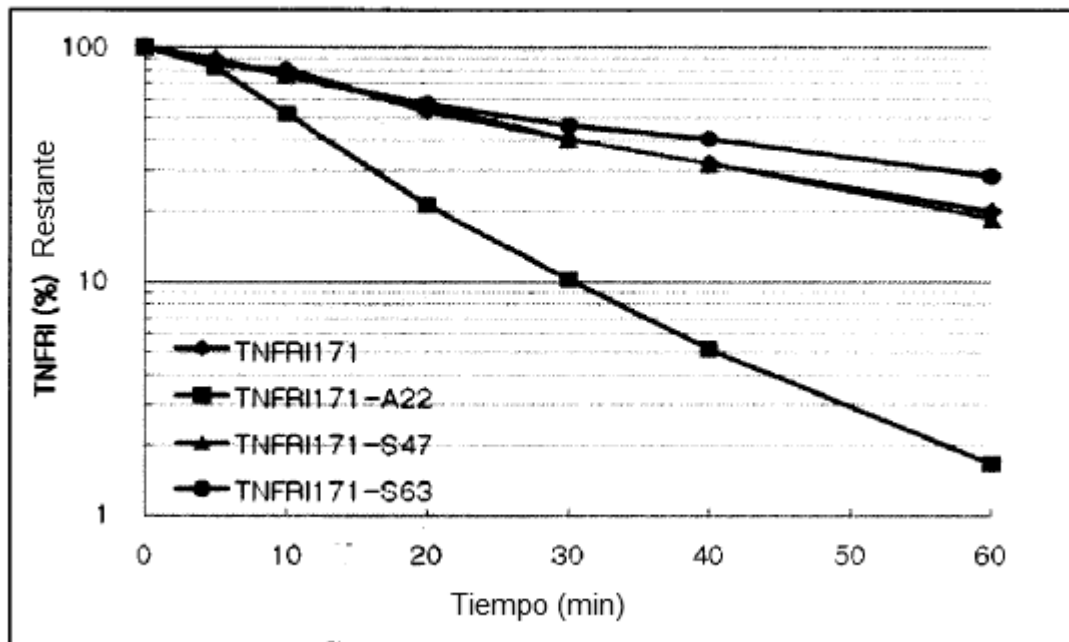
[Fig. 8]



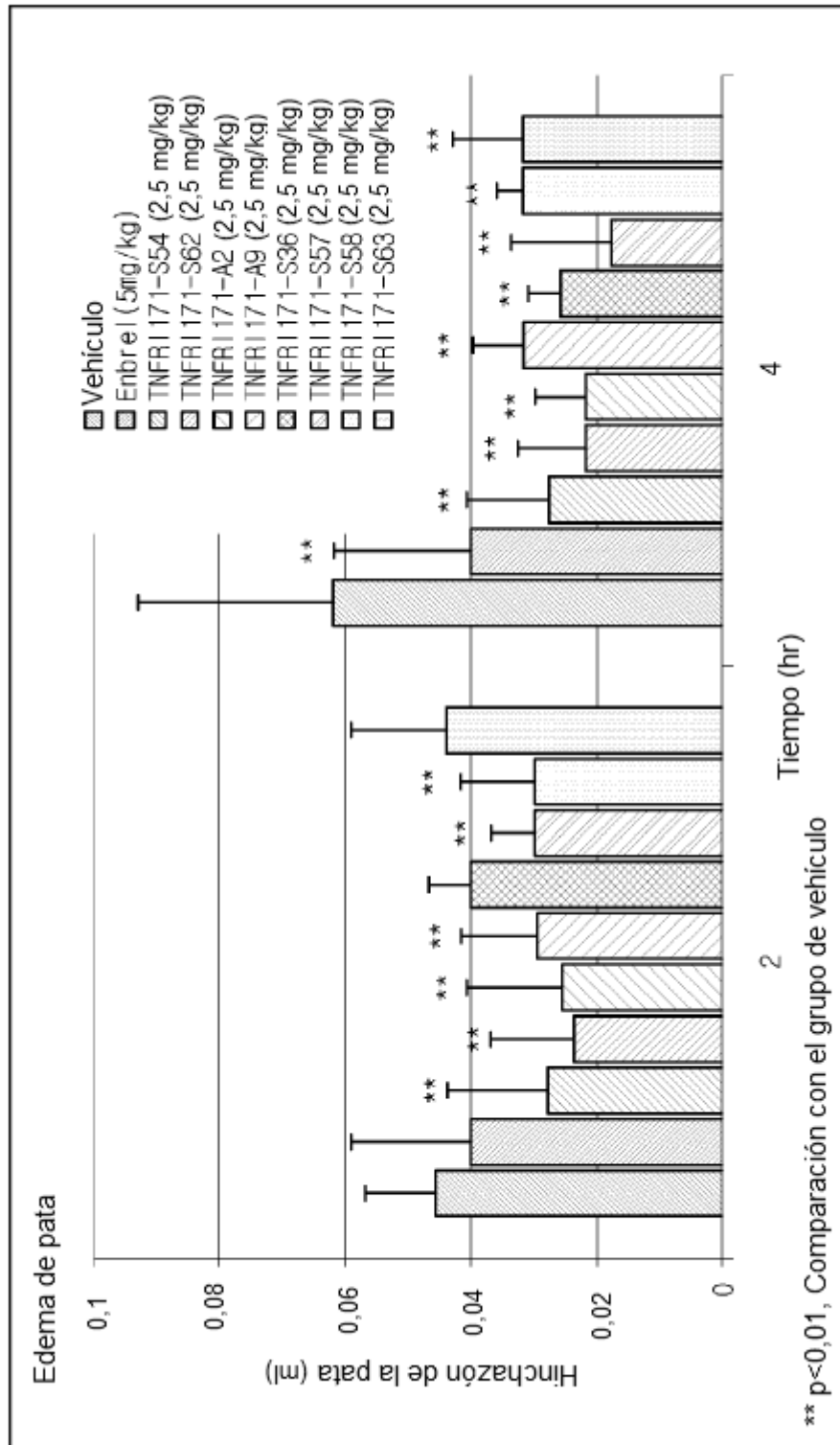
[Fig. 9a]



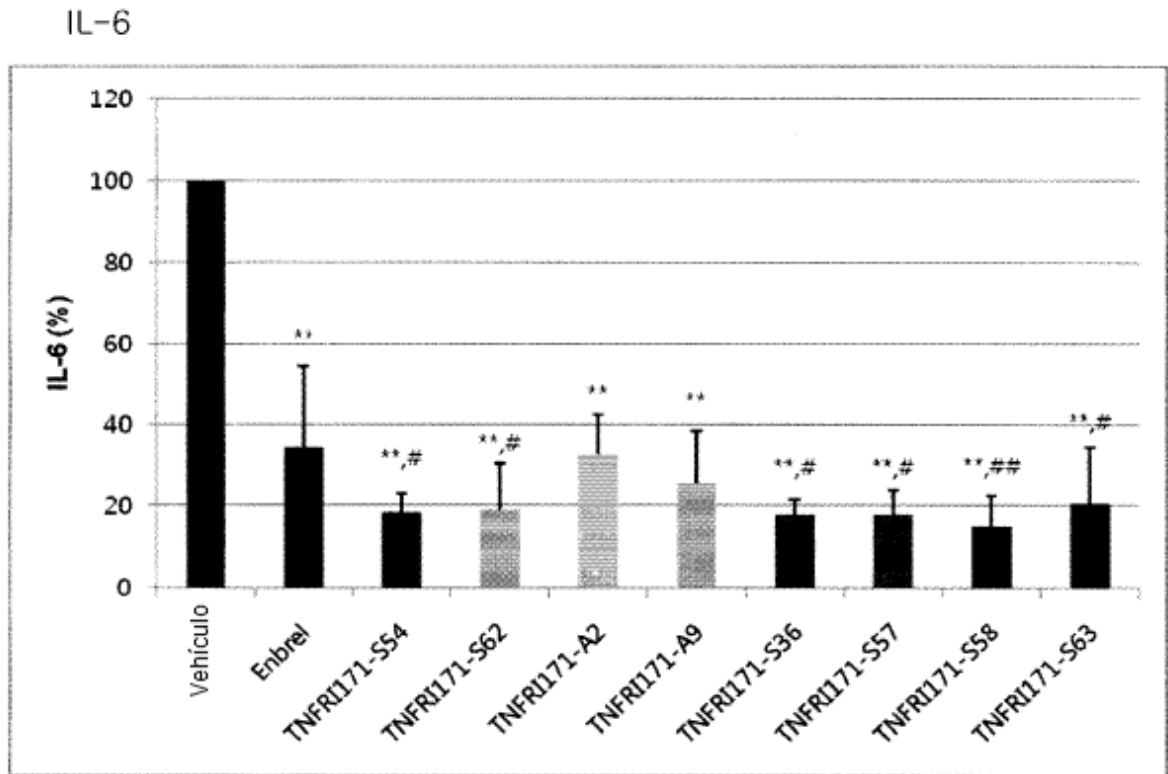
[Fig. 9b]



[Fig. 10a]



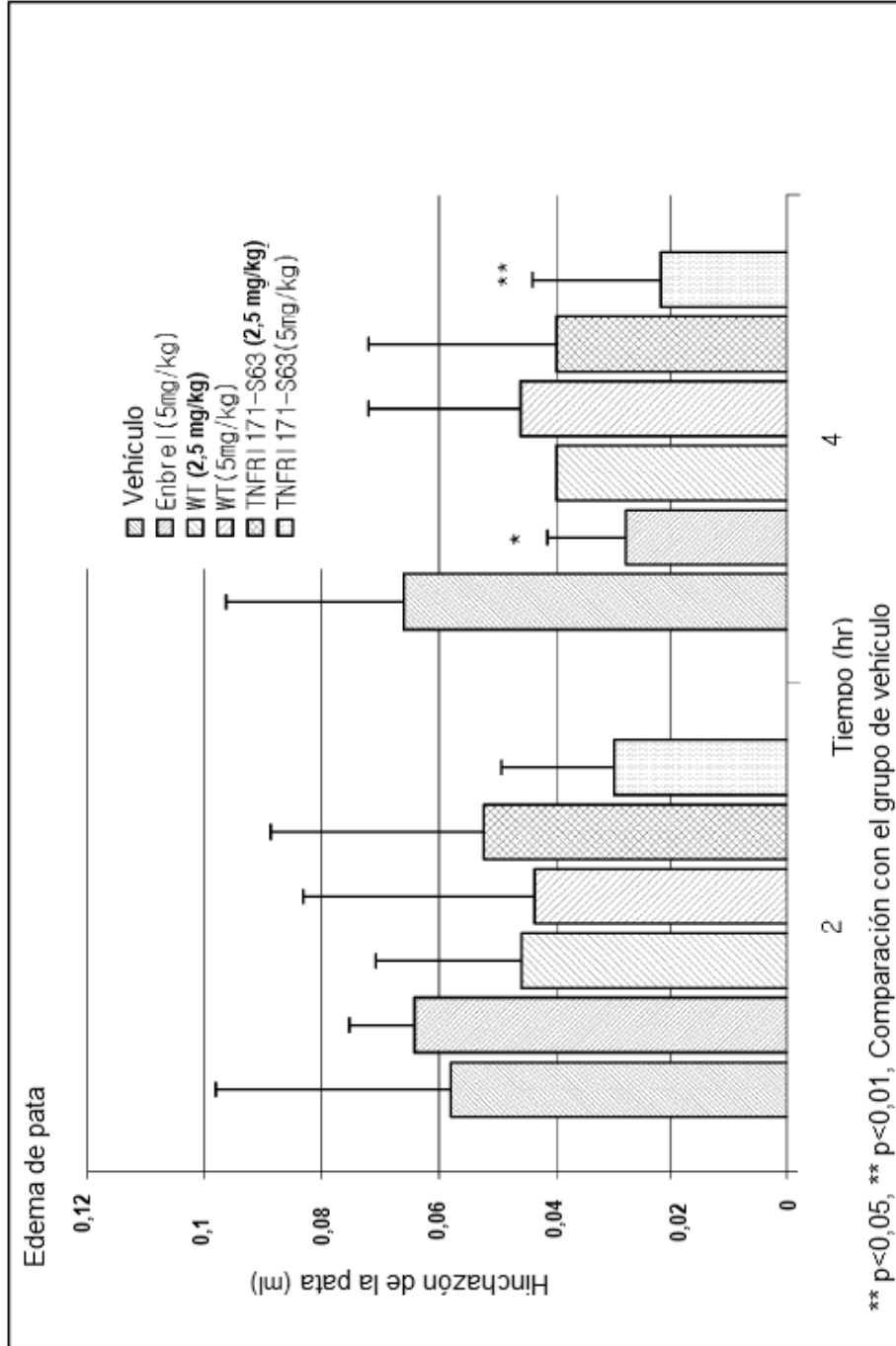
[Fig. 10b]



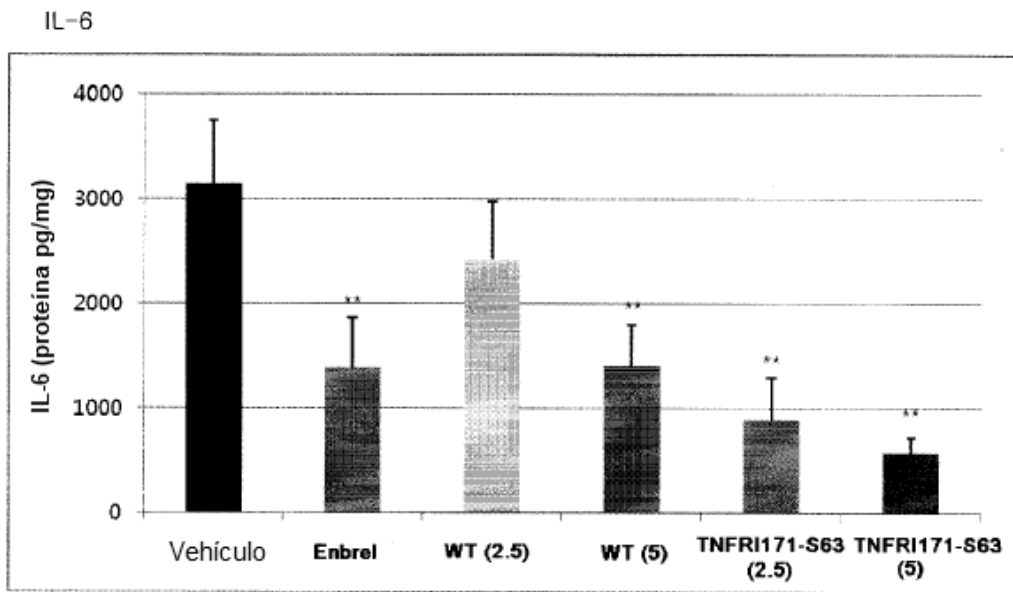
** p<0,01, Comparación con el grupo de vehículo

p<0,05, Comparación con el grupo de Enbrel

[Fig. 11a]



[Fig. 11b]



** $p < 0,01$, Comparación con el grupo de vehículo