

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 377**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2012 PCT/EP2012/050145**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12093158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2012 E 12700215 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2661496**

54 Título: **Proteína de fusión antineoplásica**

30 Prioridad:

05.01.2011 PL 39357811

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

ADAMED SP. Z O.O. (100.0%)

Pienków 149

05-152 Czosnów k/Warszawy, PL

72 Inventor/es:

PIECZYKOLAN, JERZY SZCZEPAN;

PAWLAK, SEBASTIAN DOMINIK;

ZEREK, BARTLOMIEJ MACIEJ y

RÓZGA, PIOTR KAMIL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 628 377 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

Proteína de fusión antineoplásica

5 La invención se refiere al campo de las proteínas de fusión terapéuticas, en particular proteínas de fusión recombinantes. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas de fusión que contienen el fragmento de una secuencia de la proteína TRAIL humana soluble en combinación con una secuencia de un péptido antiangiogénico, composiciones farmacéuticas que las contienen, y su uso en terapia, particularmente como agentes antineoplásicos.

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

15 La proteína TRAIL ejerce su actividad antineoplásica por la unión a los receptores 1 y 2 de superficie de TRAIL pro-apoptósica (TRAIL-R1/R2) y posterior activación de estos receptores. Estos receptores, también conocidos como DR4 y DR5 (receptor 4 de muerte y receptor 5 de muerte), pertenecen a la familia de receptores de TNF y son expresados en exceso por diferentes tipos de células cancerosas. La activación de estos receptores puede inducir la vía de señalización externa de apoptosis independiente del gen supresor p53, que por caspasa-8 activada conduce a la activación de caspasas ejecutoras y así la degradación de ácidos nucleicos. La caspasa-8 liberada tras la activación de TRAIL también pueden producir la liberación de proteína Bid y así la activación indirecta de la vía mitocondrial, siendo la proteína Bid translocada a la mitocondria, donde estimula la liberación de citocromo c, amplificando así indirectamente la señal apoptósica de receptores de muerte.

20 TRAIL actúa selectivamente sobre células tumorales esencialmente sin inducir la apoptosis en células sanas que son resistentes a esta proteína. Por tanto, se reconoció el enorme potencial de TRAIL como un agente antineoplásico que actúa sobre una amplia variedad de tipos diferentes de células tumorales, que incluyen tumores malignos hematológicos y tumores sólidos, mientras que se ahorran células normales y que ejercen efectos secundarios potencialmente relativamente pequeños.

25 La proteína TRAIL es una proteína de membrana de tipo II que tiene la longitud de 281 aminoácidos, y su región extracelular que comprende los restos de aminoácidos 114-281 tras la escisión por proteasas forma la molécula soluble sTRAIL de 20 kDa de tamaño, que también es biológicamente activa. Tanto las formas TRAIL como sTRAIL son capaces de desencadenar la apoptosis mediante la interacción con receptores de TRAIL presentes en células diana. Se demostró la fuerte actividad antitumoral y la muy baja toxicidad sistémica de la parte soluble de la molécula TRAIL usando pruebas de líneas celulares.

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

35 El fragmento de TRAIL más corto de 114-281 también es capaz de unirse con los receptores de muerte de membrana e inducir la apoptosis mediante estos receptores, como se ha informado recientemente para el mutante circularmente permutado recombinante de 122-281hTRAIL, por ejemplo, en el documento EP 1 688 498.

40 Efectos tóxicos de la proteína TRAIL recombinante sobre las células del hígado informados hasta ahora parecen estar asociados a la presencia de modificación, es decir, marcas de polihistidina, mientras que TRAIL no marcada no mostró toxicidad sistémica.

45 Sin embargo, en el transcurso de investigación adicional y desarrollo pareció que muchas células cancerosas mostraron resistencia a TRAIL primaria o adquirida (véase, por ejemplo, el documento WO2007/022214). Aunque el mecanismo de resistencia a TRAIL no ha sido completamente entendido, se cree que puede manifestarse él mismo a diferentes niveles de la vía de apoptosis inducida por TRAIL, que oscila del nivel de receptores de la superficie celular a las caspasas ejecutoras dentro de la vía de señalización. Esta resistencia limita la utilidad de TRAIL como agente antineoplásico.

50 Además, en ensayos clínicos en pacientes la eficacia actual de TRAIL como monoterapia demostró ser baja. Para vencer esta baja eficiencia y la resistencia de tumores a TRAIL, se diseñaron diversas terapias de combinación con agentes radio- y quimioterapéuticos, que produjeron efecto apoptósico sinérgico (documento WO2009/002947; A. Almasan and A. Ashkenazi, Cytokine Growth Factor Reviews 14 (2003) 337-348; RK Srivastava, Neoplasia, Vol 3, No 6, 2001, 535-546, Soria JC et al., J. Clin. Oncology, Vol 28, No 9 (2010), p. 1527-1533). El uso de rhTRAIL para el tratamiento de cáncer en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales seleccionados (paclitaxel, carboplatino) y anticuerpos anti-VEGF monoclonales se describen en el documento WO2009/140469. Sin embargo, una combinación tal necesariamente implica deficiencias muy conocidas de quimioterapia o radioterapia convencionales.

55

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

5 Una de las dianas en la terapia del cáncer también es la inhibición de la angiogénesis tumoral. La angiogénesis (neovascularización) es un proceso patológico ilimitado en el tiempo de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que suministran a los tumores oxígeno y nutrientes. La angiogénesis es indispensable para el crecimiento y la expansión del tumor y promover su metástasis.

Se conoce el efecto beneficioso de la inhibición de la angiogénesis tumoral en la terapia del cáncer. Se hicieron intentos para el uso clínico de sustancias que inhiben o regulan el proceso de angiogénesis, tanto como una terapia del cáncer como una terapia del cáncer complementaria.

10 Se conocen inhibidores de la angiogénesis, tanto los endógenos naturalmente presentes en el cuerpo humano como numerosas sustancias antiangiogénicas exógenas. Entre ellos se conocen inhibidores de la angiogénesis proteínicos, que incluyen fragmentos proteolíticos de proteínas endógenas. Como ejemplos, pueden mencionarse inhibidores de proteína de la angiogénesis tales como angiostatina (un fragmento de plasminógeno), endostatina (fragmento del extremo C de colágeno XVIII), calreticulina, vasostatina - un fragmento de calreticulina, un fragmento de prolactina, un fragmento de metaloproteína 2, o tumstatina - un fragmento de colágeno IV (Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2362-2368, Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:273-286).

20 Por ejemplo, la tumstatina es un péptido del tamaño de 28 kDa - un fragmento de colágeno de tipo IV, capaz de unirse a integrina $\alpha\beta_3$ y prevenir la angiogénesis por inhibición de la proliferación de células endoteliales. Además, la tumstatina inhibe independientemente la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y fosfatidilinositol 3-cinasa PI3 y proteína cinasa PKB/Akt.

La actividad antiangiogénica también puede ser ejercida por la inhibición de proteínas pro-angiogénicas, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que actúa mediante receptores localizados sobre el endotelio vascular y que es el principal estimulante de la neoangiogénesis.

25 En el tratamiento clínico, que incluye terapia del cáncer, ya se han usado como factores antiangiogénicos ciertas sustancias dirigidas contra VEGF, tales como los anticuerpos monoclonales bevacizumab y ranibizumab. También se conocen otros factores proangiogénicos que estimulan la proliferación y migración de células endoteliales independientemente de los receptores localizados en el endotelio, que incluyen, por ejemplo, citocinas tales como factores de crecimiento derivados de plaquetas PDGF y factor de crecimiento epidérmico EGF, TNF y angiopoyetina.

30 En el proceso de la angiogénesis también participa la enzima aminopeptidasa N (APN/CD13), que es una metaloproteasa transmembranaria. Se sabe que la inhibición de esta enzima puede conducir a la inhibición de procesos neoplásicos. Se conocen varios inhibidores de aminopeptidasa N naturales y sintéticos (Bavouis B., Dauzonne D., Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Medical Research Review*, 2006, 26, (1), 88-130).

35 Los inhibidores naturales de APN/CD13 incluyen principalmente sustancias producidas por microorganismos. Como representativas, entre otras, puede mencionarse bestatina, curcumina y apigenina. También se encontró que un péptido corto que contenía el motivo CNGRC era capaz de unirse eficientemente a CD13 (Arap et al., *Science*, 279:377-380, 1998).

40 Muchas de las sustancias antiangiogénicas están actualmente en diferentes etapas de investigaciones, que incluyen ensayos clínicos. Sin embargo, las terapias conocidas que pretenden inhibir la angiogénesis tienen muchas desventajas muy conocidas. Por ejemplo, recientemente se han cuestionado los beneficios del anticuerpo monoclonal terapéutico bevacizumab en el tratamiento de cáncer de mama. Muchos fármacos antiangiogénicos muestran, por ejemplo, una semivida muy corta, baja solubilidad, mala biodisponibilidad y efectos secundarios tóxicos.

45 La seguridad de fármacos antiangiogénicos es de especial importancia debido al uso prolongado y la falta de selectividad de terapia. La fuerte necesidad de un terapéutico eficaz y la naturaleza de las enfermedades oncológicas necesitan un procedimiento de registro simplificado para tal grupo de fármacos, por tanto es imposible conocer todos los efectos secundarios e inconvenientes del fármaco. Aunque, al contrario de los quimioterapéuticos, que se dirigen a todas las células de proliferación rápida, los fármacos antiangiogénicos se dirigen a diferentes estadios de formación de vasos sanguíneos, produciendo la reducción de la toxicidad de la terapia. Sin embargo, todavía existe la necesidad de terapia antineoplásica que pretenda inhibir la angiogénesis, mientras que se asegure la selectividad contra células tumorales. Por tanto, existe la necesidad de nuevas terapias antineoplásicas antiangiogénicas con características toxicológicas mejoradas.

55 Se describió por A.I. Guo et al. en *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2008, vol. 24(10), 925-930 que la proteína de fusión construida que contiene secuencias de un inhibidor de la angiogénesis vasostatina y TRAIL114-281 asociadas con un conector de sitio de escisión de metaloproteasa presentaba el efecto inductor de la apoptosis en células tumorales.

Se describió en el documento CN1609124A que la proteína de fusión construida que contiene secuencias de un inhibidor de la angiogénesis calreticulina y TRAIL114-281 presentaba efecto inductor de la apoptosis en células tumorales.

El documento CN 1256347C desvela proteína de fusión compuesta de cininógeno D5 60-148 y TRAIL 114-281.

5 La proteína de fusión construida que contiene secuencias de un inhibidor de la angiogénesis kininostatina, vasostatina y canstatina unida al extremo N o C de TRAIL114-281 unida con el conector que codifica GGGSGGSG se menciona en Feng Feng-Yi "Phase and Clinical Trial of Rh-Apo2L and Apo2L-Related Experimental Study", tesis doctoral, Chinese Peking Union Medical, 01-10-2006; http://www.lw23.com/lunwen_957708432.

10 Se describió que la proteína de fusión construida que contiene las secuencias tumstatina 183-230 de un inhibidor de la angiogénesis tumstatina y TRAIL114-281 presentaba inducción de la apoptosis de células de cáncer pancreático por N. Ren et al. en Academic Journal of Second Military Medical University 2008, vol. 29(5), 474-478.

15 El documento US2005/244370 y el documento WO2004/035794 correspondiente desvelan la construcción de TRAIL95-281 como un dominio efector unido por un conector peptídico con parte extracelular de otro miembro de ligandos CD40 de la familia TNF como dominio de unión de superficie celular. Se establece que la activación de la construcción es mediante la unión de su parte CD40.

20 El documento WO2010/005519 desvela proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de TRAIL y un polipéptido que se une al ligando TWEAK, específicamente el receptor de Fn14 soluble, que es el receptor de TWEAK relacionado. La proteína de fusión tiene actividad de aniquilación contra células cancerosas debido a la unión del dominio de TRAIL a sus receptores de muerte de membrana. El dominio Fn14 de la proteína de fusión, debido a su actividad de unión a TWEAK, bloquea el eje Fn14/TWEAK celular y los efectos celulares de TWEAK, que incluyen sus efectos pro-tumorigénicos y pro-apoptóticos, dependiente de la unión de TWEAK al receptor de Fn14 no soluble de membrana.

25 La presente invención proporciona una solución de este problema proporcionando novedosas proteínas de fusión que comprenden un dominio derivado de TRAIL y un dominio de péptido efector corto que tiene la actividad antiangiogénica y que no incluye fragmentos de TRAIL, en la que el péptido efector potencia o complementa la acción de TRAIL.

30 Las proteínas según la invención se dirigen selectivamente a células cancerosas, donde los elementos individuales de la proteína ejercen sus efectos, en particular los péptidos efectores inhiben la angiogénesis tumoral. La administración de las proteínas de la invención en el entorno tumoral permite minimizar la toxicidad contra células sanas en el cuerpo, además de los efectos secundarios y para reducir la frecuencia de administración. Además, la terapia dirigida con el uso de proteínas según la invención permite evitar el problema de la baja eficiencia de terapias antiangiogénicas no específicas previamente conocidas producidas por la baja permeabilidad de los vasos sanguíneos.

35 Además, resultó que en muchos casos las proteínas de fusión de la invención son más potentes que TRAIL soluble y sus variantes que incluyen un fragmento de la secuencia. Hasta ahora, los péptidos efectores conocidos usados en la proteína de fusión de la invención no se usaron en medicina como tales debido a la cinética desfavorable, rápida degradación por proteasas no específicas o acumulación en el cuerpo producida por la falta de una secuencia apropiada de activación de vías que son necesarias para permitir la acción apropiada del péptido efector en el sitio diana. La incorporación del péptido efector en la proteína de fusión permite su administración selectiva al sitio donde se desea su acción. Además, la unión del péptido efector aumenta la masa de proteína, produciendo semivida prolongada y elevada retención de la proteína en el tumor y su eficiencia potenciada.

Adicionalmente, en muchos casos, proteínas de fusión novedosas también vencen la resistencia a TRAIL.

Descripción de las figuras

La invención se describirá ahora en detalle con referencia a las figuras del dibujo.

45 La Fig. 1 presenta una estructura esquemática de proteínas de fusión de la invención según el Ej. 1, Ej. 2, Ej. 4, Ej. 5 y Ej. 6.

La Fig. 2 presenta una estructura esquemática de proteínas de fusión de la invención según el Ej. 9, Ej. 10 y Ej. 11.

La Fig. 3 presenta una estructura esquemática de proteínas de fusión de la invención según el Ej. 14 y Ej. 15.

50 La Fig. 4 muestra espectros de dicroísmo circular para rhTRAIL95-281 y proteínas de fusión del Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5, Ej. 9 y Ej. 14 expresadas en elipticidad específica.

La Fig. 5 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones CrI:CD1-Foxn1nu afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5 y Ej. 9 en comparación con rhTRAIL114-281.

- La Fig. 6 presenta la inhibición de los valores de crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5 y Ej. 9 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 5 La Fig. 7 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 8 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 10 La Fig. 9 presenta una estructura esquemática de proteínas de fusión de la invención según el Ej. 16, Ej. 17, Ej. 18 y Ej. 19.
- La Fig. 10 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 4, Ej. 9 y Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 15 La Fig. 11 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 4, Ej. 9 y Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 12 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 20 La Fig. 13 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 14 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon Colo205 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 25 La Fig. 15 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon Colo205 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 16 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon SW620 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 30 La Fig. 17 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon SW620 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 35 La Fig. 18 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 19 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 40 La Fig. 20 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 6 en comparación con rhTRAIL114-281.
- La Fig. 21 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 6 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 45 La Fig. 22 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 6, Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.
- 50

La Fig. 23 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 6, Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.

5 La Fig. 24 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460-Luc2 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 5 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 25 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460-Luc2 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 5 en comparación con rhTRAIL114-281.

10 La Fig. 26 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5 y Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.

15 La Fig. 27 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5 y Ej. 1 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 28 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.

20 La Fig. 29 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 30 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado HepG2 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281

25 La Fig. 31 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado HepG2 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281.

30 La Fig. 32 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de páncreas PANC-1 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281

La Fig. 33 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de páncreas PANC-1 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 11 en comparación con rhTRAIL114-281.

35 La Fig. 34 presenta los cambios de volumen tumoral (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con sarcoma uterino humano multirresistente MES-SA/Dx5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281.

La Fig. 35 presenta los valores de inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con sarcoma uterino humano multirresistente MES-SA/Dx5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 en comparación con rhTRAIL114-281.

40 Descripción detallada de la invención

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

- dominio (a) que es el fragmento funcional de una secuencia de proteína hTRAIL soluble que empieza con un aminoácido en una posición no inferior a hTRAIL95 y capaz de inducir la señal apoptósica en células de mamífero tras la unión a sus receptores sobre la superficie de las células, o un homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con dicho fragmento funcional, y
- dominio (b) que es una secuencia de un péptido efector antiangiogénico, que es el inhibidor del receptor de factores de crecimiento y está seleccionado del grupo de fragmentos de factores de crecimiento que consiste en fragmento de VEGF de SEQ. No. 17, fragmento de PDGF de SEQ. No. 22 y fragmento de EGF de SEQ. No. 23;

50 en la que la secuencia del dominio (b) está unida en el extremo C o extremo N del dominio (a).

El término "el fragmento soluble funcional de una secuencia de hTRAIL soluble" debe entenderse como que indica cualquiera de tal fragmento de hTRAIL soluble que es capaz de inducir la señal apoptósica en células de mamífero tras la unión a sus receptores sobre la superficie de las células.

5 También se apreciará por un experto que se conoce en la técnica la existencia de al menos el 70 % de homología de la secuencia de TRAIL.

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

10 El término "péptido" según la invención debe entenderse como una molécula formada de la pluralidad de aminoácidos unidos juntos por medio de un enlace peptídico. Así, el término "péptido" según la invención incluye oligopéptidos, polipéptidos y proteínas.

En la presente invención, las secuencias de aminoácidos de péptidos se presentarán de un modo convencional adoptado en la materia en la dirección de extremo N (extremo N) del péptido hacia su extremo C (extremo C). Así, cualquier secuencia tendrá su extremo N en el lado izquierdo y el extremo C en el lado derecho de su presentación lineal.

15 La proteína de fusión de la invención incorpora al menos un dominio (b) del péptido efector, unido en el extremo C o extremo N del dominio (a).

En una realización particular, el dominio (a) es un fragmento de la secuencia de hTRAIL, que empieza con un aminoácido del intervalo de hTRAIL95 a hTRAIL121, ambos incluidos, y que termina con el aminoácido hTRAIL 281.

20 En particular, el dominio (a) puede seleccionarse del grupo que consiste en secuencias correspondientes a hTRAIL95-281, hTRAIL119-281, hTRAIL120-281 y hTRAIL121-281. Será evidente para aquellos expertos en la materia que hTRAIL95-281, hTRAIL119-281, hTRAIL120-281 y hTRAIL121-281 representan un fragmento de proteína TRAIL humana que empieza con el aminoácido marcado con el número 95, 119, 120 y 121, respectivamente, en la secuencia de hTRAIL conocida (SEQ. No. 16) publicada en GenBank con el N.º de acceso P50591.

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

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

35 Debe entenderse que un homólogo de un fragmento de hTRAIL es una variación/modificación de la secuencia de aminoácidos de este fragmento, en el que al menos un aminoácido se cambia, que incluye 1 aminoácido, 2 aminoácidos, 3 aminoácidos, 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, y no más del 15 % de los aminoácidos, y en el que un fragmento de la secuencia modificada ha preservado la funcionalidad de la secuencia de hTRAIL, es decir, la capacidad de unión a receptores de muerte de la superficie celular e inducción de apoptosis en células de mamífero. La modificación de la secuencia de aminoácidos puede incluir, por ejemplo, sustitución, delección y/o adición de aminoácidos.

40 Preferentemente, el homólogo de fragmento de hTRAIL que tiene secuencia modificada muestra una afinidad modificada por los receptores de muerte DR4 (TRAIL-R1) o DR5 (TRAIL-R2) en comparación con el fragmento nativo de hTRAIL.

El término "afinidad modificada" se refiere a una elevada afinidad y/o afinidad con selectividad por receptor alterada.

Preferentemente, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene secuencia modificada muestra elevada afinidad por los receptores de muerte DR4 y DR5 en comparación con fragmento nativo de hTRAIL.

45 Particularmente preferentemente, el homólogo del fragmento de hTRAIL que tiene secuencia modificada muestra elevada afinidad por el receptor de muerte DR5 en comparación con el receptor de muerte DR4, es decir, un aumento de la selectividad DR5/DR4.

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

50 Las modificaciones de hTRAIL que producen elevada afinidad y/o selectividad hacia los receptores de muerte DR4 y DR5 son conocidas para aquellos expertos en la materia, por ejemplo de la publicación Tur V, van der Sloot AM, Reis CR, Szegezdi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ. DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. J. Biol. Chem. 2008 Jul

18;283(29):20560-8, que describe la mutación D218H que tiene elevada selectividad hacia DR4, o Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. 2009 Jun;14(6):778-87, que describe la mutación D269H que tiene una reducida afinidad hacia DR4. Los mutantes de hTRAIL que producen elevada afinidad hacia un receptor seleccionado de DR4 y DR5 en comparación con los receptores DR1 y DR2 y elevada afinidad hacia el receptor DR5 en comparación con DR4 también se describen en los documentos WO2009077857 y WO2009066174.

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

Mutaciones adecuadas también son una o más mutaciones en las posiciones de hTRAIL nativo seleccionadas del grupo que consiste en 195, 269 y 214, particularmente mutaciones que implican la sustitución de un aminoácido con un aminoácido básico tal como lisina, histidina o arginina. Particularmente, pueden especificarse una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en D269H, E195R, y T214R, como se describe en el documento WO2009077857.

En una realización particular, el dominio (a) que es un homólogo del fragmento de hTRAIL está seleccionado del mutante D218H de la secuencia de TRAIL nativa, como se describe en el documento WO2009066174, o el mutante Y189N-R191K-Q193R-H264R-I266R-D269H de la secuencia de TRAIL nativa, como se describe en Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. 2009 Jun;14(6):778-87.

Dentro del grupo de inhibidores de receptores para los factores de crecimiento, el péptido efector de dominio (b) puede ser un fragmento de factor de crecimiento endotelial vascular humano VEGF que une el receptor de VEGF competitivamente al ligando natural, aunque él mismo carece de actividad angiogénica. Como consecuencia, la actividad angiogénica de VEGF se bloquea, no hay estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos y se inhibe el crecimiento tumoral. El péptido efector del grupo anterior es el péptido que inhibe la vía de señalización de VEGF y específicamente el fragmento de 7 aminoácidos de VEGF humano presentado por SEQ. No. 17 en el Listado de secuencias adjunto.

Se cree que el péptido que comprende la secuencia del heptapéptido de VEGF incorporado en la proteína de fusión de la invención eliminará eficazmente células cancerosas por la inhibición del proceso de angiogénesis.

También dentro del grupo de inhibidores de receptores para factores de crecimiento, el péptido efector del dominio (b) puede ser un fragmento de factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF, que une el receptor de PDGF competitivamente al ligando natural, aunque él mismo carece de actividad angiogénica. Como consecuencia, se bloquea la actividad angiogénica de PDGF, no hay estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos y se inhibe el crecimiento tumoral.

Un péptido efector tal es un péptido de 19 aminoácidos - un fragmento de ligando de PDGF, mostrado por una secuencia de SEQ. No. 22 en el Listado de secuencias adjunto.

Se cree que el péptido que comprende la secuencia del fragmento de la proteína factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF incorporado en la proteína de fusión de la invención eliminará eficazmente las células cancerosas por inhibición del proceso de angiogénesis.

También dentro del grupo de inhibidores de receptores para factores de crecimiento, el péptido efector antiangiogénico del dominio (b) puede ser un fragmento de péptido del factor de crecimiento epidérmico EGF, que une el receptor de EGF competitivamente al ligando natural, aunque él mismo carece de actividad angiogénica. Como consecuencia, se bloquea la actividad angiogénica de EGF, no hay estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos y se inhibe el crecimiento tumoral. Tales péptidos de bloqueo Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu y Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu capaces de unirse al receptor de EGF sin activación de cinasa intracelular y de bloquear la actividad de EGR se conocen, por ejemplo, del documento EP0641358. Un péptido efector tal - un fragmento de ligando de EGF, se muestra por una secuencia de SEQ. No. 23 en el Listado de secuencias adjunto.

Se cree que el péptido que comprende la secuencia de factor de crecimiento epidérmico EGF incorporada en la proteína de fusión de la invención eliminará eficazmente células cancerosas por inhibición del proceso de angiogénesis.

Tras la unión a receptores de TRAIL presentes sobre la superficie de células cancerosas, la proteína de fusión ejercerá un doble efecto. El dominio (a), que es un fragmento funcional de TRAIL o su homólogo con funcionalidad

conservada, ejercerá su actividad agonista conocida - es decir, unión a receptores de muerte sobre la superficie celular y activación de la vía de apoptosis extrínseca. Después de la internalización de la proteína de fusión que comprende el péptido antiangiogénico, el dominio (b) será capaz de ejercer posiblemente su acción intracelularmente en paralelo a la actividad del dominio de TRAIL. De esta forma, la actividad antineoplásica de TRAIL puede potenciarse por la activación de otros elementos y mecanismos - tales como la inhibición estérica del sitio de unión de los ligandos de VEGF, PDGF y EGF naturales, e inhibición de la angiogénesis y neovascularización.

En una de las realizaciones de la invención, el dominio (a) y el dominio (b) están unidos por al menos un dominio (c) que comprende la secuencia de un sitio de escisión reconocido por proteasas presentes en el entorno celular, especialmente en el entorno de la célula tumoral. El enlace del dominio (a) con el dominio (b) por al menos un dominio (c) significa que entre los dominios (a) y (b) puede estar presente más de un dominio (c), en particular uno o dos dominios (c).

Puede seleccionarse un sitio de escisión de proteasa de:

- una secuencia reconocida por metaloproteasa MMP, en particular (Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro/PLGLAGEP) designada como SEQ. No. 24, o (Pro Leu Gly Ile Ala Gly Glu /PLGIAGE) designada como SEQ. No. 55, o (Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro /PLGLAGEP) designada como SEQ. No. 56;

- una secuencia reconocida por urocinasa uPA, en particular Arg Val Val Arg (RVVR en el uso de una letra) designada como SEQ. No. 25 o un fragmento de la misma, que con el último aminoácido de la secuencia con el que está unida, forma SEQ. No. 25,

y sus combinaciones.

En una de las realizaciones de la invención, el sitio de escisión de proteasa es una combinación de la secuencia reconocida por metaloproteasa MMP y una secuencia reconocida por urocinasa uPA, localizadas próximas entre sí en cualquier orden.

En una realización, el dominio (c) es una combinación de MMP/uPA SEQ. No. 24/SEQ. No. 25 o una combinación de uPA/MMP SEQ. No. 25/SEQ. No. 24.

En otra realización, el dominio (c) es una combinación de MMP/uPA SEQ. No. 55/SEQ. No. 25 o una combinación de uPA/MMP SEQ. No. 25/SEQ. No. 55.

En otra realización, el dominio (c) es una combinación de MMP/uPA SEQ. No. 56 /SEQ. No. 25 o una combinación de uPA/MMP SEQ. No. 25/SEQ. No. 56. La proteasas metaloproteasa MMP y urocinasa uPA se expresan en exceso en el entorno tumoral. La presencia de la secuencia reconocida por la proteasa permite la escisión del dominio (a) del dominio (b), es decir, la liberación del dominio funcional (b) y así su activación.

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

Aparte de los principales elementos funcionales de la proteína de fusión, el (los) dominio(s) de sitio de escisión, las proteínas de fusión de la invención pueden contener una secuencia/secuencias neutras de un conector de glicina-cisteína-alanina estérico flexible (espaciador). Tales conectores/espaciadores son muy conocidos y se describen en la bibliografía. Su incorporación en la secuencia de la proteína de fusión pretende proporcionar el correcto plegamiento de proteínas producido por el proceso de su expresión en exceso en las células huésped.

En particular, el conector estérico flexible puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ. No. 26 y SEQ. No. 27, que son combinaciones de restos de glicina, cisteína y alanina. En otra realización, el conector estérico flexible puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ. No. 28, SEQ. No. 29, SEQ. No. 30 y SEQ. No. 54, que consiste en restos de glicina y serina. Adicionalmente, el conector estérico flexible puede ser cualquier fragmento de SEQ. No. 28, SEQ. No. 29 SEQ. No. 30 y SEQ. No. 54, que actúa de conector estérico flexible, por ejemplo un fragmento Gly Gly Gly / GGG o un fragmento Gly Gly / GG.

En una realización, el conector estérico flexible también puede seleccionarse de resto de aminoácido individual tal como resto de ácido glutámico, resto de cisteína, serina, prolina o de glicina.

En otra realización, el conector estérico flexible puede ser cualquier combinación de conectores que consiste en SEQ. No. 26, SEQ. No. 27 SEQ. No. 28, SEQ. No. 29, SEQ. No. 30, SEQ. No. 54 y restos de aminoácidos individuales de resto de ácido glutámico, cisteína, serina, prolina o glicina.

Realizaciones particulares de la proteína de fusión de la invención son proteínas de fusión que comprenden un péptido antiangiogénico seleccionado del grupo que consiste en las proteínas representadas por SEQ. No. 1, SEQ. No. 2, SEQ. No. 4, SEQ. No. 5, SEQ. No. 6 y SEQ. No. 46, SEQ. No. 47 y SEQ. No. 48, que comprenden como péptido efector un heptapéptido derivado de VEGF.

Otra realización específica de la proteína de fusión de la invención es la proteína de fusión que comprende un péptido antiangiogénico seleccionado del grupo que consiste en las proteínas representadas por SEQ. No. 9, SEQ. No. 10, SEQ. No. 11 y SEQ. No. 49 que comprenden como péptido efector un fragmento de PDGF.

5 Otra realización específica de la proteína de fusión de la invención es la proteína de fusión que comprende un péptido antiangiogénico seleccionado del grupo que consiste en las proteínas representadas por SEQ. No. 14 y SEQ. No. 15 que comprenden como péptido efector un fragmento de EGF.

Una descripción detallada de la estructura de proteínas de fusión representativas mencionadas anteriormente se muestra en las Figuras 1 a 3 y en la Fig. 9, y en los ejemplos presentados en el presente documento más adelante.

10 Según la presente invención, por proteína de fusión se indica una única molécula de proteína que contiene dos o más proteínas o fragmentos de la misma, covalentemente unidos mediante enlace peptídico dentro de sus cadenas peptídicas respectivas, sin conectores químicos adicionales.

La proteína de fusión también puede describirse alternativamente como una construcción de proteína o una proteína quimérica. Según la presente invención, los términos "construcción" o "proteína quimérica", si se usan, deben entenderse como con referencia a la proteína de fusión como se ha definido anteriormente.

15 Para un experto en la materia será evidente que la proteína de fusión así definida pueda sintetizarse por métodos conocidos de síntesis química de péptidos y proteínas.

20 La proteína de fusión puede sintetizarse por métodos de síntesis de péptidos química, especialmente usando las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida usando resinas adecuadas como vehículos. Tales técnicas son convencionales y conocidas en la técnica, y se describen, entre otros, en las monografías, tales como, por ejemplo, Bodanszky and Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, 1984, Springer-Verlag, New York, Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Edición, 1984, Pierce Chemical Company.

25 La proteína de fusión puede sintetizarse por los métodos de síntesis química de péptidos como una proteína continua. Alternativamente, los fragmentos individuales (dominios) de proteína pueden sintetizarse por separado y luego combinarse juntos en un péptido continuo mediante un enlace peptídico, por condensación del extremo amino de un fragmento de péptido a partir del extremo carboxilo del segundo péptido. Tales técnicas son convencionales y muy conocidas.

30 Para la verificación de la estructura del péptido conocido pueden usarse métodos de análisis de la composición de aminoácidos de péptidos, tales como la técnica de espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Para confirmar la secuencia de péptidos también pueden usarse secuenciadores de proteínas, que degradan secuencialmente el péptido e identifican la secuencia de aminoácidos.

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

35 También se desvela la secuencia de polinucleótidos, particularmente la secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, la secuencia de polinucleótidos, particularmente ADN, que codifica la proteína de fusión como se ha definido anteriormente, es una secuencia optimizada para la expresión en *E. coli*.

También se desvela un vector de expresión que contiene la secuencia de polinucleótidos, particularmente la secuencia de ADN, como se ha definido anteriormente.

40 También se desvela una célula huésped que comprende un vector de expresión como se ha definido anteriormente.

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

45 Los métodos de generación de proteínas recombinantes, que incluyen proteínas de fusión, son muy conocidos. En resumen, esta técnica consiste en la generación de molécula de polinucleótido, por ejemplo molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína diana y que dirige la expresión de la proteína diana en el huésped. Entonces, la proteína diana que codifica la molécula de polinucleótido se incorpora en un vector de expresión apropiado, que garantiza una expresión eficiente del polipéptido. El vector de expresión recombinante se introduce entonces en células huésped para la transfección/transformación, y como resultado se produce una célula huésped transformada. Esto va seguido de un cultivo de células transformadas para expresar en exceso la proteína diana, purificación de proteínas obtenidas, y opcionalmente corte por escisión de las secuencias de marca usadas para la expresión o purificación de la proteína.

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

Pueden usarse cósmidos, plásmidos o virus modificados como vectores de expresión para la introducción y replicación de secuencias de ADN en células huésped. Normalmente, los plásmidos se usan como vectores de expresión. Plásmidos adecuados son muy conocidos y están comercialmente disponibles.

5 El vector de expresión comprende una molécula de polinucleótido que codifica la proteína de fusión de la invención y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia codificante incorporada en una célula huésped adecuada. La selección de secuencias reguladoras depende del tipo de células huésped y puede ser fácilmente llevada a cabo por un experto en la materia. Ejemplos de tales secuencias reguladoras son promotor y potenciador de la transcripción o secuencia de unión a ARN polimerasa, secuencia de unión a ribosoma, que contiene la señal de iniciación de la transcripción, insertada antes de la secuencia codificante, y secuencia 10 terminadora de la transcripción, insertada después de la secuencia codificante. Además, dependiendo de la célula huésped y el vector usado, pueden introducirse otras secuencias en el vector de expresión, tales como el origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores, y secuencias que permiten la inducción de transcripción.

15 El vector de expresión también comprenderá una secuencia de gen marcador, que confiere fenotipo definido a la célula transformada y permite la selección específica de células transformadas. Además, el vector también puede contener una segunda secuencia de marcador que permite distinguir células transformadas con plásmido recombinante que contiene insertada la secuencia codificante de la proteína diana de aquellas que han captado el plásmido sin inserción. Casi siempre, se usan marcadores de resistencia a antibióticos típicos, sin embargo, puede usarse cualquier otro gen indicador conocido en el campo, cuya presencia en una célula (*in vivo*) puede ser 20 fácilmente determinada usando técnicas de autorradiografía, espectrofotometría o bio- y quimio-luminiscencia. Por ejemplo, dependiendo de la célula huésped, pueden usarse genes indicadores tales como β -galactosidasa, β -glucuronidasa, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa o proteína verde fluorescente.

25 Además, el vector de expresión puede contener secuencia señal, que transporta proteínas al compartimento celular apropiado, por ejemplo periplasma, donde se facilita el plegamiento. Adicionalmente, puede estar presente una secuencia que codifica una etiqueta/marca, tal como HisTag unida al extremo N o GST unida al extremo C, que facilita la posterior purificación de la proteína producida usando el principio de afinidad, por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. También pueden estar presentes secuencias adicionales que protegen la proteína contra la degradación proteolítica en las células huésped, además de secuencias que aumentan su solubilidad.

30 El elemento auxiliar unido a la secuencia de la proteína diana puede bloquear su actividad, o ser perjudicial por otro motivo, tal como, por ejemplo, debido a toxicidad. Tal elemento debe eliminarse, que puede llevarse a cabo por escisión enzimática o química. En particular, debe eliminarse una marca de seis histidinas HisTag u otros marcadores de este tipo unidos para permitir la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad, debido a su efecto descrito sobre la toxicidad hepática de la proteína TRAIL soluble. Pueden usarse sistemas de expresión heterólogos basados en diversas células huésped muy conocidas, que incluyen células procariontes: bacterianas, 35 tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, y líneas celulares eucariotas (insecto, de mamífero, planta).

40 Preferentemente, debido a la facilidad de cultivo y manipulación genética, y una gran cantidad de producto obtenido, se usa el sistema de expresión en *E. coli*. Por consiguiente, la secuencia de polinucleótidos que contiene la secuencia diana que codifica la proteína de fusión de la invención se optimizará para la expresión en *E. coli*, es decir, contendrá en la secuencia codificante codones óptimos para la expresión en *E. coli*, seleccionados de las posibles variantes de secuencia conocidas en el estado de técnica. Además, el vector de expresión contendrá los elementos anteriormente descritos adecuados para *E. coli* unidos a la secuencia codificante.

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

SEQ. No. 31; SEQ. No. 32; SEQ. No. 34; SEQ. No. 35; SEQ. No. 36; SEQ. No. 39; SEQ. No. 40; SEQ. No. 41 SEQ. No. 44; SEQ. No. 45, SEQ. No. 50, SEQ. No. 51, SEQ. No. 52; SEQ. No. 53; que codifican una proteína de fusión que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos, respectivamente:

50 SEQ. No. 1; SEQ. No. 2; SEQ. No. 4; SEQ. No. 5; SEQ. No. 6; SEQ. No. 9; SEQ. No. 10; SEQ. No. 11; SEQ. No. 14 SEQ. No. 15, SEQ. No. 46; SEQ. No. 47; SEQ. No. 48; y SEQ. No. 49.

55 En una realización preferida, un vector de expresión adecuado para la transformación de *E. coli* comprende la secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo de secuencias de polinucleótidos SEQ. No. 31 a SEQ. No. 45 y SEQ. No 50 a SEQ. No. 53 indicadas anteriormente, además de célula de *E. coli* transformada con un vector de expresión tal.

La transformación, es decir, introducción de una secuencia de ADN en células huésped bacterianas, particularmente *E. coli*, se realiza normalmente en las células competentes, preparadas para captar el ADN, por ejemplo, mediante tratamiento con iones calcio a baja temperatura (4 °C), y luego sometiendo a choque térmico (a 37-42 °C) o por

electroporación. Tales técnicas son muy conocidas y normalmente son determinadas por el fabricante del sistema de expresión o se describen en la bibliografía y manuales para el trabajo de laboratorio, tales como Maniatis et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, N.Y., 1982).

5 El procedimiento de expresión en exceso de proteínas de fusión de la invención en el sistema de expresión en *E. coli* se describirá además más adelante.

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

15 Los términos "vehículo, diluyente y componente auxiliar farmacéuticamente aceptables" comprenden cualquier disolvente, medio de dispersión, tensioactivo, antioxidante, estabilizador, conservante (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agente isotónico, conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la invención puede contener diversos tipos de vehículos, diluyentes y excipientes, dependiendo de la vía de administración elegida y forma de dosificación deseada, tales como formas líquidas, sólidas y de aerosol para oral, parenteral, inhalada, tópica, y si esa forma seleccionada debe ser estéril para la vía de administración tal como mediante inyección. La vía de administración preferida de la composición farmacéutica según la invención es parenteral, que incluye vías de inyección tales como intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratumoral, o por infusiones intravenosas únicas o continuas.

25 En una realización, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse mediante inyección directamente al tumor. En otra realización, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía intravenosa. En otra realización más, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía subcutánea o por vía intraperitoneal. Una composición farmacéutica para administración parenteral puede ser una disolución o dispersión en un medio acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable, tamponada a un pH apropiado e isosmótico con líquidos corporales, si fuera necesario, y también puede contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y sustancias solubles, que hacen la composición compatible con los tejidos o sangre del receptor. Otros componentes, que pueden incluirse en la composición, son, por ejemplo, agua, alcoholes tales como etanol, polioles tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, lípidos tales como triglicéridos, aceites vegetales, liposomas. La fluidez apropiada y el tamaño de partículas de la sustancia pueden proporcionarse recubriendo sustancias, tales como lecitina, y tensioactivos, tales como polisorbatos de hidroxipropilcelulosa, y similares.

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

40 Alternativamente, la composición farmacéutica para administración mediante inyección o infusión puede estar en una forma de polvo, tal como un polvo liofilizado para reconstitución inmediatamente antes de uso en un vehículo adecuado tal como, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril.

45 La composición farmacéutica de la invención para administración parenteral puede también tener la forma de administración nasal, que incluye disoluciones, esprays o aerosoles. Preferentemente, la forma para administración intranasal será una disolución acuosa y será isotónica o tamponada o mantendrá el pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, para mantener un carácter similar a las secreciones nasales. Además, contendrá conservantes o estabilizadores, tales como en las muy conocidas preparaciones intranasales.

50 La composición puede contener diversos antioxidantes que retrasan la oxidación de uno o más componentes. Además, con el fin de prevenir la acción de microorganismos, la composición puede contener diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, por ejemplo, y no se limitan a, parabenos, clorobutanol, timerosal, ácido sórbico, y sustancias conocidas similares de este tipo. En general, la composición farmacéutica de la invención puede incluir, por ejemplo al menos aproximadamente el 0,01 % en peso de principio activo. Más particularmente, la composición puede contener el principio activo en la cantidad del 1 % al 75 % en peso de la unidad de composición, o por ejemplo del 25 % al 60 % en peso, pero no se limitan a los valores indicados. La actual cantidad de la dosis de la composición según la presente invención administrada a pacientes, que incluyen el hombre, se determinará por factores físicos y fisiológicos, tales como peso corporal, gravedad de la afección, tipo de enfermedad que está tratándose, intervenciones terapéuticas previas o concomitantes, el paciente y la vía de administración. Una dosis unitaria adecuada, la dosis total y la concentración de principio activo en la composición va a determinarse por el médico práctico.

La composición puede administrarse, por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 1 microgramo/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del paciente, por ejemplo en el intervalo de 5 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 5 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal. La proteína de fusión y las composiciones que lo contienen presentan antineoplásica o antitumoral y pueden usarse para el tratamiento de enfermedades de cáncer. La invención también proporciona la proteína de fusión de la invención como se ha definido anteriormente para su uso en un método de tratamiento de enfermedades de cáncer en mamíferos, que incluyen seres humanos. El método de tratamiento de enfermedades de cáncer en mamíferos, que incluyen seres humanos, comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz antineoplásica de la proteína de fusión de la invención como se ha definido anteriormente, opcionalmente en forma de composición farmacéutica apropiada.

La proteína de fusión de la invención puede usarse para el tratamiento de tumores malignos hematológicos, tales como leucemia, granulomatosis, mieloma y otros tumores malignos hematológicos. La proteína de fusión también puede usarse para el tratamiento de tumores sólidos, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer cerebral, y similares. La vía de administración apropiada de la proteína de fusión en el tratamiento del cáncer será en particular la vía parenteral, que consiste en administrar la proteína de fusión de la invención en forma de inyecciones o infusiones, en la composición y forma apropiadas para esta vía de administración. La invención se describirá en más detalle en los siguientes procedimientos generales y ejemplos de proteínas de fusión específicas.

20 Procedimiento general para la expresión en exceso de la proteína de fusión

Preparación de un plásmido

Se usó la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión diana como molde para generar una secuencia de ADN que la codifica, que comprende codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*. Un procedimiento tal permite aumentar la eficiencia de otra etapa de síntesis de proteínas diana en *Escherichia coli*. La secuencia de nucleótidos resultante se sintetizó entonces automáticamente. Adicionalmente, se añadieron los sitios de escisión de enzimas de restricción NdeI (en el extremo 5' de la hebra adelantada) y XhoI (en el extremo 3' de la hebra adelantada) al gen resultante que codifica la proteína diana. Estos se usaron para clonar el gen en el vector pET28a (Novagen). También pueden usarse para clonar el gen que codifica la proteína para otros vectores. La proteína diana expresada de esta construcción puede ser opcionalmente provista en el extremo N de una marca de polihistidina (seis histidinas), precedida de un sitio reconocido por trombina, que posteriormente sirvió para su purificación por cromatografía de afinidad. Algunas dianas se expresaron sin ninguna marca, en particular sin marca de histidina, y aquellas fueron posteriormente purificadas en SP Sepharose. La correctitud de la construcción resultante se confirmó en primer lugar por análisis de restricción de plásmidos aislados usando las enzimas NdeI y XhoI, seguido de secuenciación automática del marco de lectura entero de la proteína diana. Los cebadores usados para la secuenciación fueron complementarios a las secuencias del promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') y terminador T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') presentes en el vector. El plásmido resultante se usó para la expresión en exceso de la proteína de fusión diana en una cepa de *E. coli* comercial, que se transformó según las recomendaciones del fabricante. Se usaron las colonias obtenidas en el medio de selección (agar LB, kanamicina 50 µg/ml, 1 % de glucosa) para preparar un cultivo durante la noche en medio líquido LB complementado con kanamicina (50 µg/ml) y 1 % de glucosa. Después de aproximadamente 15 h de crecimiento en la estufa de incubación con agitación, los cultivos se usaron para inocular el cultivo apropiado.

Expresión en exceso y purificación de proteínas de fusión - procedimiento general A

Se inoculó medio LB con kanamicina (30 µg/ml) y sulfato de cinc 100 µM con cultivo durante la noche. El cultivo se incubó a 37 °C hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm alcanzó 0,60-0,80. Entonces se añadió IPTG a la concentración final en el intervalo de 0,25 - 1 mM. Después de la incubación (3,5 - 20 h) con agitación a 25 °C el cultivo se centrifugó durante 25 min a 6.000 g. Se resuspendieron sedimentos bacterianos en un tampón que contenía KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, pH 7,4. La suspensión se sonicó sobre hielo durante 8 minutos (40 % de amplitud, pulso de 15 segundos, intervalo de 10 s). El extracto resultante se clarificó por centrifugación durante 40 minutos a 20000 g, 4 °C. Se pretrató resina de Ni-Sepharose (GE Healthcare) por equilibrado con tampón, que se usó para la preparación del extracto de células bacterianas. La resina se incubó entonces durante la noche a 4 °C con el sobrenadante obtenido después de la centrifugación del extracto. Entonces se cargó en columna de cromatografía y se lavó con 15 a 50 volúmenes de tampón KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4. La proteína obtenida se eluyó de la columna usando gradiente de imidazol en tampón KH₂PO₄ 50 mM con NaCl 0,5 M, pH 7,4. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE. Se combinaron fracciones apropiadas y se dializaron durante la noche a 4 °C contra tampón Tris 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, L-arginina 500 mM, ZnSO₄ 0,1 mM, 0,01 % de Tween 20, y al mismo tiempo Histag, si está presente, se escindió con trombina (1:50). Después de la escisión, se separó trombina de la proteína de fusión diana expresada con Histag por purificación usando la resina Benzamide Sepharose™. La purificación de proteínas de fusión diana expresadas sin Histag se realizó en SP Sepharose. La pureza del producto se analizó por electroforesis SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982).

Expresión en exceso y purificación de proteínas de fusión - procedimiento general B

Se inoculó medio LB con kanamicina (30 µg/ml) y sulfato de cinc 100 µM con cultivo durante la noche. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que la densidad óptica (DO) a 600 nm alcanzó 0,60-0,80. Entonces se añadió IPTG a la concentración final en el intervalo 0,5 - 1 mM. Después de 20 h de incubación con agitación a 25 °C el cultivo se centrifugó durante 25 min a 6000 g. Las células bacterianas después de la expresión en exceso se rompieron en una prensa francesa en un tampón que contenía KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pH 7,8. El extracto resultante se clarificó por centrifugación durante 50 minutos a 8000 g. Se incubó la resina de Ni-Sepharose durante la noche con el sobrenadante obtenido. Entonces la resina con proteína unida se cargó en la columna de cromatografía. Para lavar las fracciones que contenían proteínas no de unión, la columna se lavó con 15 a 50 volúmenes de tampón KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), pH 7,8. Entonces, para lavar la mayoría de las proteínas que se unían específicamente con el lecho, la columna se lavó con un tampón que contenía KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, 10 % de glicerol, PMSF 0,5 mM, pH 7,5. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982). Se combinaron las fracciones que contenían la proteína diana y, si la proteína se expresó con marca de histidina, se escindió con trombina (1 U por 4 mg de proteína, 8 h a 16 °C) para eliminar la marca de polihistidina. Entonces las fracciones se dializaron contra el tampón de formulación (L-arginina 500 mM, Tris 50 mM, ZnSO₄ 2,5 mM, pH 7,4).

Ejemplo 1. La proteína de fusión de SEQ. No. 1

La proteína de SEQ. No. 1 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 173 aminoácidos y la masa de 19,8 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 121-281 está unido el heptapéptido derivado de VEGF (SEQ. No. 17) como un péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL se incorpora el conector estérico de glicina flexible (SEQ. No. 28).

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 1 y SEQ. No. 31, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 1 de la estructura descrita anteriormente se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 31 de ADN. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN en dos versiones, una que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina y la segunda sin ninguna marca, y se llevó a cabo la expresión en exceso de las proteínas de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando las cepas *BL21 (DE3)* y *Tuner(DE3)pLysS* de *E. coli*, ambas de Novagen. Las proteínas se separaron por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 2. La proteína de fusión de SEQ. No. 2

La proteína de fusión de SEQ. No. 2 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 199 aminoácidos y la masa de 22,8 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 95-281 está unido el heptapéptido derivado de VEGF (SEQ. No. 17) como un péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL se incorpora el conector estérico de glicina flexible (SEQ. No. 28).

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 2 y SEQ. No. 32, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 2 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 32 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 4. La proteína de fusión de SEQ. No. 4

La proteína de SEQ. No. 4 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 187 aminoácidos y la masa de 21,4 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 121-281 están unidas dos secuencias de heptapéptido derivado de VEGF (SEQ. No. 17) como péptido efector. Entre las dos secuencias de péptido efector se incorpora la secuencia de sitio de escisión reconocido por metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la secuencia del sitio de escisión de MMP y la secuencia de proteína efectora se incorpora un único resto de ácido glutámico E. Entre el péptido efector (SEQ. 17) y la secuencia de TRAIL se incorpora el conector de glicina estérico flexible (SEQ. No. 28).

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 4 y SEQ. No. 34, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

5 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 4 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 34 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN en dos versiones, una que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina y la segunda sin ninguna marca, y se llevó a cabo la expresión en exceso de las proteínas de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21DE3pLysSRIL* de *E. coli* de Stratagene y *Tuner (DE3)* de Novagen. Las proteínas se separaron por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 5. La proteína de fusión de SEQ. No. 5

15 La proteína de SEQ. No. 5 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 187 aminoácidos y la masa de 21,8 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 121-281 están unidas dos secuencias de heptapéptido derivado de VEGF (SEQ. No. 17) como péptido efector. Entre las dos secuencias de péptidos efectores la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la secuencia de sitio de escisión de MMP y la secuencia de proteína efectora se incorpora el único resto de ácido glutámico E. Adicionalmente, en el extremo N de TRAIL están unidos dos restos de glicina.

20 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 5 y SEQ. No. 35, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 5 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 35 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN en dos versiones, una que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina y la segunda sin ninguna marca, y se llevó a cabo la expresión en exceso de las proteínas de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando la cepa *Tuner (DE3)* de *E. coli* de Novagen. Las proteínas se separaron por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 6. La proteína de fusión de SEQ. No. 6

30 La proteína de SEQ. No. 6 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 222 aminoácidos y la masa de 25,3 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 95-281 están unidas dos secuencias de heptapéptido derivado de VEGF (SEQ. No. 17) como un péptido efector. Entre las dos secuencias de péptido efector la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 55) debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre el péptido efector (SEQ. 17) y la secuencia de TRAIL se incorpora el conector estérico flexible de cisteína (SEQ. No. 26).

35 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 1, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 6 y SEQ. No. 36, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

40 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 6 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 36 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, sin una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando la cepa *Tuner(DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 9. La proteína de fusión de SEQ. No. 9

45 La proteína de SEQ. No. 9 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 192 aminoácidos y la masa de 22,1 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 119-281 está unido una secuencia de fragmento de PDGF (SEQ. No. 22) como un péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral.

50 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 2, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 9 y SEQ. No. 39, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

55 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 9 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 39 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN en dos versiones, una que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina y la segunda sin ninguna marca, y se llevó a cabo la

expresión en exceso de las proteínas de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando la cepa *Rosetta (DE3)* de *E. coli* de Novagen. Las proteínas se separaron por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 10. La proteína de fusión de SEQ. No. 10

5 La proteína de SEQ. No. 10 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 216 aminoácidos y la masa de 24,9 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 95-281 está unido un fragmento de PDGF (SEQ. No. 22) como un péptido efector. Entre la secuencia de péptido efector y el dominio de TRAIL la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral.

10 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 2, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 10 y SEQ. No. 40, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

15 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 10 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 40 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando las cepas *BL21 (DE3)* y *Tuner(DE3)pLysS* de *E. coli*, ambas de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 11. La proteína de fusión de SEQ. No. 11

20 La proteína de SEQ. No. 11 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 226 aminoácidos y la masa de 25,7 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL95-281 está unido un fragmento de PDGF (SEQ. No. 22) como un péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la secuencia de TRAIL y la secuencia de sitio de escisión reconocido por metaloproteasa MMP la proteína contiene también conector de glicina-cisteína-alanina flexible (SEQ. No. 27).

25 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 2, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 11 y SEQ. No. 41, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

30 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 11 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 41 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, sin una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando las cepas *BL21 (DE3)* y *Tuner(DE3)pLysS* de *E. coli*, ambas de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

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

La proteína de SEQ. No. 14 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 181 aminoácidos y la masa de 21 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 120-281 está unido un fragmento de EGF (SEQ. No. 23) como un péptido efector. Entre el péptido efector y el extremo N de TRAIL dominio la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 56), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral.

40 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 14 y SEQ. No. 44, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

45 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 14 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 44 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen y la cepa *BL21DE3pLysSRIL* de Stratagene. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

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

La proteína de SEQ. No. 15 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 217 aminoácidos y la masa de 24,4 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia hTRAIL95-281 está unido un fragmento de EGF (SEQ. No. 23) como un péptido efector. Entre el péptido efector y el extremo N del dominio de TRAIL la proteína contiene secuencias de

sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 24), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la secuencia de sitio de escisión reconocido por metaloproteasa MMP y la secuencia de TRAIL la proteína contiene un único resto de prolina seguido del conector de glicina-cisteína-alanina flexible (SEQ. No. 26).

- 5 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 3, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 15 y SEQ. No. 45, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 15 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 45 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

10

Ejemplo 16. La proteína de fusión de SEQ. No. 46

- 15 La proteína de fusión de SEQ. No. 46 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 211 aminoácidos y la masa de 24,4 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 95-281 están unidos dos heptapéptidos derivados de VEGF (SEQ. No. 17) unidos entre sí como péptido efector. Entre los péptidos efectores la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 55), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral.

- 20 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 9, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 46 y SEQ. No. 50, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 46 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 50 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

25

Ejemplo 17. La proteína de fusión de SEQ. No. 47

- 30 La proteína de fusión de SEQ. No. 47 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 22,7 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 120-281 están unidos dos heptapéptidos derivados de VEGF (SEQ. No. 17) unidos entre sí como péptido efector. Entre los péptidos efectores la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 55), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la proteína efectora y el dominio de TRAIL la proteína contiene posteriormente el conector flexible (SEQ. No. 26) que promueve la formación de trímero y el conector de glicina-serina flexible (SEQ. no. 54).
- 35

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 9, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 47 y SEQ. No. 51, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

- 40 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 47 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 51 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.
- 45

Ejemplo 18. La proteína de fusión de SEQ. No. 48

- La proteína de fusión de SEQ. No. 48 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 192 aminoácidos y la masa de 21,9 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL 120-281 están unidos dos heptapéptidos derivados de VEGF (SEQ. No. 17) unidos entre sí como péptido efector. Entre los péptidos efectores la proteína contiene secuencia de sitio de escisión reconocido por urocinasa uPA (SEQ. No. 25), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la proteína efectora y el dominio de TRAIL la proteína contiene posteriormente el conector flexible (SEQ. No. 26) que promueve la formación de trímero y el conector de glicina-serina flexible (SEQ. no. 54).
- 50

La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en la Fig. 9, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 48 y SEQ. No. 52, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

5 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 48 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 52 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, con una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general B, usando la cepa *BL21 (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

10 Ejemplo 19. La proteína de fusión de SEQ. No. 49

La proteína de SEQ. No. 49 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 206 aminoácidos y la masa de 23,3 kDa, en la que en el extremo N de la secuencia TRAIL120-281 está unido un fragmento de PDGF (SEQ. No. 22) como un péptido efector. Entre el péptido efector y la secuencia de TRAIL la proteína contiene secuencias de sitios de escisión reconocidos por urocinasa uPA (SEQ. No. 25) y metaloproteasa MMP (SEQ. No. 55), debido a que el péptido efector experimentará escisión en el entorno tumoral. Entre la secuencia de TRAIL y la secuencia de sitio de escisión reconocido por metaloproteasa MMP la proteína contiene también localizada posteriormente el conector de glicina-cisteína-alanina flexible (SEQ. No. 26) que promueve la formación de trímero y el conector de glicina-serina flexible (SEQ. No. 54).

20 La estructura de la proteína de fusión se muestra esquemáticamente en Fig. 9, y su secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 49 y SEQ. No. 53, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 49 se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 53 de ADN. Se generó un plásmido que contiene la secuencia codificante de ADN, sin una secuencia que permite expresar His tag y un sitio reconocido por trombina, y se llevó a cabo la expresión en exceso de la proteína de fusión según los procedimientos generales descritos anteriormente. La expresión en exceso se realizó según el procedimiento general A, usando las cepas *BL21 (DE3)* y *Tuner(DE3)pLysS* de *E. coli*, ambas de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente.

Ejemplo 20. Examen de actividad antitumoral de las proteínas de fusión

30 Se llevó a cabo el examen de actividad antitumoral de las proteínas de fusión *in vitro* en un ensayo de citotoxicidad en líneas de células tumorales e *in vivo* en ratones. Para fines de comparación, se usaron la proteína rhTRAIL114-281 y placebo.

1. Medición de la determinación de dicroísmo circular del contenido de estructuras secundarias de proteínas obtenidas

35 Se determinó la calidad de las preparaciones de proteínas de fusión en términos de su estructura por dicroísmo circular (CD) para el Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5, Ej. 9 y Ej. 14.

El dicroísmo circular se usa para la determinación de estructuras secundarias y la conformación de proteína. El método de CD usa la actividad óptica de las estructuras de proteína, manifestada en girar el plano de polarización de la luz y la aparición de polarización elíptica. El espectro de proteínas de CD en el ultravioleta (UV) lejano proporciona datos precisos sobre la conformación de la principal cadena de polipéptidos.

40 Diálisis

Se dializaron muestras de la proteína a analizar después de la formulación en un tampón que consiste en Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 100 mM, 10 % de glicerol, ZnCl₂ de 0,1 mM, sacarosa 80 mM, DTT 5 mM, pH 7,4 (o alternativamente NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0 para proteínas expresadas en exceso como se ha descrito anteriormente, pero que carecen de la His-tag y purificadas en SP Sepharose - marcadas en la Tabla 5 de resultados con el asterisco *) en las bolsas de diálisis (Sigma-Aldrich) con el corte 12 kDa. La diálisis se realizó contra un exceso de 100 veces (v/v) de tampón en comparación con las preparaciones de proteína con agitación durante varias horas a 4 °C. Después de completarse la diálisis, se centrifugó cada preparación (25.000 rpm, 10 min, 4 °C) y se recogieron los sobrenadantes apropiados. Se determinó la concentración de proteína en las muestras así obtenidas por el método de Bradford como un promedio de triplicados.

Determinación de la concentración de proteína usando el método de Bradford

En ensayos de concentración de proteína del reactivo preparado disolviendo 17,5 mg de Coomassie G-250 en una mezcla de etanol (4,8 % v / v), ácido fosfórico (V) (5,95 % v / v) y agua. Para determinar la concentración de proteína se añadieron 1-10 ml de muestra a 800 ml de reactivo de Bradford. Una muestra de referencia que contiene reactivo

de Bradford y un volumen apropiado de tampón en el que se determinó la proteína disuelta. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Cary 300 a una longitud de onda de 595 nm después de al menos 5 minutos de incubación de las muestras a temperatura ambiente. La concentración de proteína se calculó a partir de la curva patrón preparada para el BSA en el intervalo de 10 concentraciones 1-10 µg/ml. La concentración de proteína de partida se estimó después de tener en cuenta la dilución durante la preparación de la medición de muestra.

Medición de dicroísmo circular

Se realizó la medición de dicroísmo circular para proteínas en el intervalo de concentración de 0,1-2,7 mg/ml en el espectropolarímetro Jasco J-710, en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0,2 mm o 1 mm. La medición se realizó bajo el flujo de nitrógeno a 7 l/min, que permitió realizar la medición en el intervalo de longitud de onda de 195 a 250 nm. Parámetros de la medición: resolución espectral de - 1 nm; mitad de la anchura del haz de luz 1 nm; sensibilidad 20 mdeg, el tiempo promedio para una longitud de onda - 8 s, velocidad de barrido 10 nm/min, promedio de 3 mediciones.

Los resultados se presentaron como el promedio de tres mediciones. Los espectros de dicroísmo circular para rhTRAIL114-281 y las proteínas de Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5, Ej. 9 y Ej. 14 se presentan en la Fig. 4.

Determinación del contenido de estructura secundaria

Se analizaron numéricamente los espectros obtenidos en el intervalo de 193-250 nm usando el software CDPro. Se omitieron los puntos para los que la tensión en el fotomultiplicador superó los 700 V, debido a la relación demasiado baja de señal con respecto a ruido en este intervalo de longitud de onda. Los datos obtenidos sirvieron para los cálculos del contenido de estructuras secundarias particulares en las proteínas analizadas usando el software CDPro (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de estructuras secundarias en las proteínas analizadas

Proteína	NRMSD (Exp-Cal)	hélice α	hoja β	Desplazamiento	Trastorno
Ej. 4	0,319	3,7 %	39,4 %	20,7 %	36,2 %
Ej. 1	0,093	7,8 %	8,6 %	63,1 %	20,5 %
Ej. 5	0,04	41,3 %	15,0 %	2,5 %	41,2 %
Ej. 9	0,112	2,9 %	41,0 %	20,7 %	35,4 %
Ej. 14	0,244	0,2 %	55,3 %	17,1 %	27,4 %
rhTRAIL*		1,94 %	50,97 %	7,74 %	39,35 %
rhTRAIL 114-281	0,389	4,9 %	33,7 %	23,1 %	38,3 %
* valor obtenido basándose en la estructura cristalina 1D4V					

Los controles (rhTRAIL114-281) muestran el espectro de CD característico para las proteínas con predominantemente estructuras de tipo hoja β (elipticidad rápidamente delineada mínima a la longitud de onda 220 nm). Esto confirma el cálculo de los componentes de estructuras secundarias, que sugiere un número marginal de elementos de hélice α . El resultado obtenido también está de acuerdo con los datos de la estructura cristalina de la proteína hTRAIL y característica para las proteínas de la invención del Ej. 4, Ej. 9 y Ej. 14, en las que los elementos de beta constituyen más del 40 % de su composición.

En el caso de todas las proteínas fusionadas, los espectros de dicroísmo se caracterizan por un mínimo a la longitud de onda 220 nm. Moléculas de proteínas efectoras pequeñas unidas a TRAIL en las proteínas fusionadas constituyen la parte minoritaria de la proteína y no crean necesariamente una estructura secundaria definida, las proteínas analizadas no deben diferir significativamente de la proteína inicial. Diferencias significativas, tales como alto contenido de estructuras alfa en el caso de proteína según el Ej. 5, u hojas tal como se observan para proteínas del Ej. 1, son posiblemente debidas al limitado intervalo del espectro de CD sujeto a análisis, especialmente en la región 180 - 200 nm.

2. Pruebas de líneas celulares *in vitro*Líneas celulares

Tabla 2. Células adherentes

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
Colo 205 ATCC N.º CCL-222	<i>cáncer colorrectal humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
HT-29 ATCC N.º CCL-2	<i>cáncer colorrectal humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
DU-145 ATCC N.º HTB-81	<i>cáncer de próstata humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3
PC-3 ATCC N.º CRL-1435	<i>cáncer de próstata humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
MCF-7 ATCC N.º HTB-22	<i>cáncer de mama humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4,5
MDA-MB-231 ATCC N.º HTB-26	<i>cáncer de mama humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4,5
UM-UC-3 ATCC N.º CLR-1749	<i>cáncer de vejiga humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5
SW780 ATCC N.º CRL-2169	<i>cáncer de vejiga humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3
SW620 ATCC N.º CCL-227	<i>cáncer colorrectal humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
BxPC-3 ATCC N.º CRL-1687	<i>cáncer pancreático humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4,5
NIH: OVCAR-3 ATCC N.º HTB-161	<i>cáncer de ovario humano</i>	RPMI + 20 % de FBS + 0,01 mg/ml de insulina + penicilina + estreptomycin	7
HepG2 ATCC N.º HB-8065	<i>hepatoma de hígado humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	7
293 ATCC N.º CLR-1573	<i>células de riñón embrionario humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
ACHN ATCC N.º CCL-222	<i>cáncer de riñón humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
CAKI 2 ATCC N.º HTB-47	<i>cáncer de riñón humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5
HT144 ATCC N.º HTB-63	<i>células de melanoma humanas</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	7
LNCaP ATCC N.º CRL-1740	<i>cáncer de próstata humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4,5
NCI-H69 ATCC N.º HTB-119	<i>cáncer de pulmón de células pequeñas humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	22
Jurkat A3 ATCC N.º CRL-2570	<i>leucemia humana</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
MES-SA/Dx5 ATCC N.º CRL-1977	cáncer uterino	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
SK-MES-1 ATCC N.º HTB-58	<i>cáncer de pulmón humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
A549 ATCC N.º CCL-185	<i>cáncer de pulmón humano</i>	RPMI + 20 % de FBS + penicilina + estreptomycin	2,5
HCT116 ATCC N.º CCL-247	<i>cáncer colorrectal humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3
MCF10A ATCC N.º CRL-10317	<i>células epiteliales mamarias</i>	DMEM-F12 (1:1) + 5 % de suero de caballo + 0,5 µg/ml de hidrocortisona + 10 µg/ml de insulina + 20 ng/ml de EGF	4,5
MES-SA ATCC N.º CRL-1976	<i>cáncer uterino</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5
PANC-1 CLS N.º 300228	<i>cáncer pancreático humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5

Tabla 3. Células no adherentes:

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	Número de células por pocillo (miles)
NCI-H69 ATCC N.º HTB-119	cáncer de pulmón de células pequeñas humano	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	22
Jurkat A3 ATCC N.º CRL-2570	<i>leucemia humana</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10
HL60 ATCC N.º CCL-240	<i>leucemia humana</i>	RPMI + 20 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10
CCRF-CEM ATCC N.º CCL-119	<i>leucemia humana</i>	RPMI + 20 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10

Prueba de toxicidad de MTT

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

- 15 Se diluyó medio de cultivo celular a una densidad definida (10^4 - 10^5 células por 100 µl). Entonces se aplicaron 100 µl de suspensión de células apropiadamente diluida a una placa de 96 pocillos por triplicado. Así, las células preparadas se incubaron durante 24 h a 37 °C en 5 % o 10 % de CO₂, dependiendo del medio usado, y luego a las células (en 100 µl de medio) se añadieron adicionalmente 100 µl del medio que contenía diversas concentraciones de proteínas probadas. Después de la incubación de las células con proteínas probadas durante el periodo de las siguientes 72 horas, que es equivalente a 3-4 veces de la división celular, el medio con la proteína de prueba se
- 20 añadió a 20 ml de la disolución de trabajo de MTT [5 mg/ml], y la incubación continuó durante 3 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Entonces se eliminó el medio con disolución de MTT, y los cristales de formazano se disolvieron añadiendo 100 µl de DMSO. Después de agitar, la absorbancia se midió a 570 nm (filtro de referencia 690 nm).

Prueba de citotoxicidad de EZ4U

5 Se usó la prueba de EZ4U (Biomedica) para probar la actividad citotóxica de las proteínas en líneas de células no adherentes. La prueba es una modificación de MTT en la que el formazano formado en la reducción de sal de tetrazolio es soluble en agua. Se llevó a cabo el estudio de viabilidad celular después de la incubación de 72 horas continua de las células con proteína (siete concentraciones de proteína, cada una por triplicado). Sobre esta base se determinaron los valores de CI_{50} (como un promedio de dos experimentos independientes) usando el software GraphPad Prism 5.

10 Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se resumen en la Tabla 4 como valores de CI_{50} (ng/ml), que se corresponden con una concentración de proteína a la que el efecto citotóxico de las proteínas de fusión se observa al nivel del 50 % con respecto a las células de control tratadas solo con disolvente.

15 En la Tabla 4, las proteínas que se expresaron originalmente con marca de histidina que se eliminó posteriormente se designan como a) en el Ej. N.º. Las proteínas que se expresaron originalmente sin marca de histidina se designan como b) en el Ej. N.º. Cada experimento representa el valor promedio de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. Como criterio de ausencia de actividad de preparaciones de proteína se adoptó el límite de CI_{50} de 2000 ng/ml. Las proteínas de fusión con un valor de CI_{50} por encima de 2000 se consideraron inactivas.

Se seleccionaron células para esta prueba para incluir las líneas celulares tumorales naturalmente resistentes a la proteína TRAIL (el criterio de resistencia natural a TRAIL: CI_{50} para la proteína TRAIL > 2000), líneas celulares tumorales sensibles a proteína TRAIL y resistentes a la línea de doxorubicina MES-SA/DX5 como una línea de cáncer resistente a los medicamentos antineoplásicos convencionales.

20 Se usó la línea celular HUVEC no diferenciada como línea celular de control sana para la evaluación del efecto/toxicidad de las proteínas de fusión en células no cancerosas.

25 Los resultados obtenidos confirman la posibilidad de vencer la resistencia de las líneas celulares a TRAIL por administración de ciertas proteínas de fusión de la invención a células naturalmente resistentes a TRAIL. Cuando se administraron las proteínas de fusión de la invención en las células sensibles a TRAIL, en algunos casos se observó una clara y fuerte potenciación de la potencia de acción, que se manifiesta en valores de CI_{50} reducidos de la proteína de fusión en comparación con CI_{50} para TRAIL sola. Además, se obtuvo la actividad citotóxica de la proteína de fusión de la invención en las células resistentes al medicamento antineoplásico clásico doxorubicina, y en algunos casos fue más fuerte que la actividad de TRAIL sola.

30 Los valores de CI_{50} por encima de 2000 obtenidos para las líneas de células no cancerosas muestran la ausencia de efectos tóxicos asociados al uso de proteínas de la invención para células sanas, que indica la posible baja toxicidad sistémica de la proteína.

Determinación de la actividad citotóxica de preparaciones de proteína seleccionadas contra el panel extendido de líneas celulares tumorales

35 La Tabla 5 presenta los resultados de las pruebas de actividad citotóxica *in vitro* para proteínas de fusión seleccionadas de la invención contra un amplio panel de células tumorales de diferentes órganos, correspondiente al amplio intervalo de cánceres más comunes.

40 En la Tabla 5, las proteínas que se expresaron originalmente con marca de histidina que fue posteriormente eliminada se designan a) en el Ej. N.º. Las proteínas que se expresaron originalmente sin marca de histidina se designan b) en el Ej. N.º. Los valores de CI_{50} obtenidos confirman la alta actividad citotóxica de la proteína de fusión y así su posible utilidad en el tratamiento de cáncer.

Tabla 4. Actividad citotóxica de proteínas de fusión de la invención
 Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba de MTT, ng/ml)

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba de MTT, ng/ml)											
	MES-SA		MES-SA/Dx5		HCT116		SK-MES-1		A549		MCF10A	
	CI ₅₀	±DE	CI ₅₀	±DE	CI ₅₀	±DE	CI ₅₀	±DE	CI ₅₀	±DE	CI ₅₀	±DE
rhTRAIL114-281	>2000		32,2	2,40	173	31,3	12,2	2,33	>2000		>2000	
Ej. 9 ^{a)}	3,96	1,44	3,250	0,95	3,95	9,95	3,00	2,34	131,10	43,98	1420,5	451,22
Ej. 14 ^{a)}	2000		1738,1	1,47	632,05	26,94	81,27	13,41	2000		2000	
Ej. 7 ^{a)}	2000		6,822	2,83	38,66	11,34	5,80	1,93	2000		2000	
Ej. 1 ^{a)}	7,96	0,72	0,743	0,15	25,23	21,98	0,64	0,12	513,10	38,33	131,90	77,92
Ej. 4 ^{a)}	4,79	0,78	3,69	1,05	14,27	2,48	0,43	0,15	705,15	40,38	>2000	
Ej. 5 ^{a)}	1,03	0,08	0,699	0,06	2,48	2,03	0,54	0,34	9,95	0,88	13,01	2,17

Tabla 5. Análisis de actividad citotóxica de preparaciones de proteína seleccionadas contra un amplio panel de célula tumoral

Línea celular	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	24,90	17,68	10000		10000		10000		10000		10000		2052,00	466,0	10000	
Ej. 14 ^{a)}	3,19	1,68	10000		10000	1642,60	8839		10000		8928,00	543,06	792,70	96,66	10000	
	SW 780		UM-JC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	120,00	42,43	2242	1367	10000		10000		10000		93,10	8,34	10000		10000	
Ej. 14 ^{a)}	93,13	33,76	30,37	3,10	8538	2068	10000		10000		190,80	143,17	10000		10000	
	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	5889	111,0	64,71	31,81	10000		1734	218,5	10000		10000		10000		10000	
Ej. 14 ^{a)}	186,80	76,72	79,60	18,81	6153	808,22	1130	26,16	10000		10000		10000		10000	
Línea celular	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	24,90	17,68	10000		10000		10000		10000		10000		2052,00	466,0	10000	
Ej. 1 ^{a)}	0,87	0,19	852,60	1,06	3650	128,70	832	329,20	23,83	0,54	64,33	22,31	254,00	4,24	980,60	
	SW 780		UM-JC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	120,00	42,43	2242	1367	10000		10000		10000		93,10	8,34	10000		10000	
Ej. 1 ^{a)}	3,78	0,22	7,03	0,13	84350	3,80	230,50	61,50	2116	379	5,58	2,94	1530	137	1436	

(continuación)

	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
Línea celular	5889	111,0	64,71	31,81	10000		1734	218,5	10000		10000		10000		10000	
rhTRAIL 95-281	7,71	0,09	2,57	0,43	633	89,73	4,47	1,11	71,19	8,92	2,40		1339		1357	
Ej. 1 a)																
Línea celular	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	24,90	17,68	10000		10000		10000		10000		10000		2052	466,0	10000	
Ej. 5 a)	12,24	3,65	1600		1600		684,50	17,00	345	11,17	63,64		1600		1056	
	SW 780		UM-JUC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	120,00	42,43	2242	1367	10000		10000		10000		93,10	8,34	10000		10000	
Ej. 5 a)	38,46	1,03	134,80	9,55	1600		1303	2,10	1600		79,25	27,93	1600		1600	
Línea celular	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
Línea celular	5889	111,0	64,71	31,81	10000		1734	218,5	10000		10000		10000		10000	
rhTRAIL 95-281	118,90	28,14	93,90	1,41	1315	389,62	57,44	1,89	510,00	76,37	4,00		1600		1600	
Ej. 5 a)																
Línea celular	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	24,90	17,68	10000		10000		10000		10000		10000		2052	466,0	10000	
Ej. 9 a)	0,013	0,01	264,20	46,95	47,86	12,50	1025	190,10	1,276	0,40	9,81		32,90	27,01	463,90	

(continuación)

Línea celular	SW 780		UM-JUC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	120,00	42,43	2242	1367	10000		10000		10000		93,10	8,34	10000		10000	
Ej. 9 ^{a)}	1,006		0,136	0,07	181,60	44,50	24,42	0,10	2500		0,456	0,64	818,60	130,67	2500	
	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	5889	111,0	64,71	31,81	10000		1734	218,5	10000		10000		10000		10000	
Ej. 9 ^{a)}	0,004	0,01	0,001		9,78	1,31	0,845	1,20	4,46	1,98	0,615	1,00	2500		2500	
Línea celular	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1							
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		29,15	12,66	39,35	8,13						
Ej. 9 ^{b)}	391,00	52,33	3,44		1169		<0,001		3,58	0,81						
Línea celular	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		NCI-H460			
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		29,15	12,66	29,15	12,66	39,35	8,13	5889	111		
Ej. 16 ^{a)}	224,84	268,26	2473	500	99,27	51,24	0,36	0,25	0,007	0,00	5		22,76			
Línea celular	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29		NCI-H460	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		29,15	12,66	29,15	12,66	39,35	8,13	>10000		5889	111
Ej. 6 ^{a)}	422,70		0,014		129,90		0,01		0,0068	0,0043	1,41		69,19	18,79	0,02	

(continuación)

Línea celular	PANC1		PLC/PRF/5		Colo 205		HepG2		BxPc3		SW 620			
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		>9000		24,90	17,68	>10000		64,71	31,81	>10000			
Ej. 6 ^{a)}	2,15	0,79	2,35		0,003		0,062		0,014		398,80	80,89		
	A549		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		PANC1		293		UM-UC-3	
Línea celular	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		>10000		29,15	12,66	39,35	8,13	>10000		>10000		2242	1367
Ej. 1 ^{b)}	346,75	102,18	147,80	3,96	4,677	2,23	3,29	1,07	12,38	4,20	84,50	3,82	7,03	0,13
Línea celular	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29,15	12,66	39,35	8,13	>10000	5889
Ej. 11 ^{a)}	106,66	41,49	11,50	3,42	95,44		5,28	3,50	0,445	0,30	4,99		911,50	282,14
Línea celular	PANC1		PLC/PRF/5											
	media	DE	media	DE										
rhTRAIL 95-281	>10000		>9000											
Ej. 11 ^{a)}	3,07		<0,001											
Línea celular	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		NCI-H460	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29,15	12,66	39,35	8,13	5889	111
Ej. 19 ^{a)}	4,31		<0,001		0,19		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	0,004

(continuación)

Línea celular	HepG2		BxPc3		Línea celular		HCT116		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		64,71	31,81	rhTRAIL 95-281		7557	3454	>10000		29,15	12,66	39,35	8,13
Ej. 19 ^{a)}	0,20		0,013		Ej. ^{a)}		58,86		306,05	7,00	3,492	0,07	9,13	1,31
Línea celular	A549		HCT116		MES-SA		SK-MES-1		Línea celular		HCT116		BxPc3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE			media	DE	media	DE
Línea celular	A549		HCT116		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1					
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE				
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		29,15	12,66	39,35	8,13				
Ej. 17 ^{a)}	233,90		30,33		7,4		1,589		2,9					
Línea celular	A549		HCT116		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1					
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE				
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		29,15	12,66	39,35	8,13				
Ej. 18 ^{a)}	34,28	15,04	11,67	2,39	19,29	4,33	0,264	0,35	0,615					
Línea celular	HCT116		MES-SA		HT29		NCI-H460		PANC1		PLC/PRF/5		Colo 205	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	7557	3454	>10000		>10000		5889	111	>10000		>9000		24,90	17,68
Ej. 5 ^{b)}	0,036	0,01	0,005	0,007	783,50	34,65	0,25	0,25	1,05	0,56	5,54		12,24	3,65
Línea celular	HepG2		BxPc3		OV-CAR-3				Línea celular		DU 145		OV-CAR-3	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		64,71	31,81	963,00	144,25			rhTRAIL 95-281		>10000		963	144,25
Ej. 5 ^{b)}	9,27		0,36	0,44	<0,001	0,001			Ej. 7 ^{a)}		4061	1109	15,14	2,62

(continuación)

Línea celular	MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29		NCI-H460		PANC1		PLC/PRF/5	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		>10000		29,15	12,66	39,3	8,1	>10000		5889	111	>10000		>9000	
Ej. 9 ^{b)}	10,30	4,15	<0,001		0,008		0,02		264,2	46,9	0,87	0,01	0,025	0,035	21,87	3,58
Línea celular	ACHN		SW 780		UM-UC-3		Línea celular		PANC1		PLC/PRF/5		NCI-H460		PANC1	
	media	DE	media	DE	media	DE			media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	>10000		120	42,43	2242	1367	rhTRAIL 95-281		>10000		>9000		5889	111	>10000	
Ej. 9 ^{b)}	4,46	1,98	<0,001		0,14	0,07	Ej. 15 ^{a)}		128,00		3722		15,20		128	
Línea celular	HCT116		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		PC 3		Línea celular		UM-UC-3			
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
rhTRAIL 95-281	7557	3454	>10000		29,15	12,66	39,3	8,13	>10000				rhTRAIL 95-281		2242	1367
Ej. 4 ^{b)}	14,27	2,48	4,79	0,78	3,69	1,05	0,43	0,15	1056	180,9			Ej. 14 ^{a)}	30,37	3,10	

3. Eficacia antitumoral de proteínas de fusión *in vivo* en xenoinjertos

5 Se probó la eficacia antitumoral de preparaciones de proteína en un modelo de ratón de células HCT116, Colo205 y SW620 de cáncer de colon humano, células A549 y NCI-H460-Luc2 de cáncer de pulmón de células no pequeñas humano, células PLC/PRF/5 (CLS) de hepatoma humano, células PANC-1 de carcinoma pancreático humano, células HepG2 de carcinoma de hígado humano, células NCI-H460 de carcinoma de pulmón de células grandes humano y células multirresistentes MES-SA/Dx5 de carcinoma uterino humano.

Células

10 Las células HCT116 y A549 (ATCC CCL-185) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.) mezcladas en la relación de 1:1 con Opti-MEM (Invitrogen, Cat. 22600-134) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM. El día del injerto de los ratones, las células se desprendieron del soporte lavando las células con tripsina (Invitrogen), luego las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4 °C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio de Hanks), se contaron y se diluyeron a la concentración de 25×10^6 células/ml.

15 Las células PLC/PRF/5 (CLS), SW620 y PANC-1 se mantuvieron en DMEM (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM. El día del injerto de los ratones, las células se desprendieron del soporte lavando las células con tripsina (Invitrogen), luego las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4 °C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio de Hanks), se contaron y se diluyeron a la concentración de 25×10^6 células/ml.

20 Las células HepG2 se mantuvieron en MEM (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM. El día del injerto de los ratones, las células se desprendieron del soporte lavando las células con tripsina (Invitrogen), luego las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4 °C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio de Hanks), se contaron y se diluyeron a la concentración de 25×10^6 células/ml.

25 Se mantuvieron NCI-H460-Luc2, NCI-H460 y Colo205 en RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM. El día del injerto de los ratones, las células se desprendieron del soporte lavando las células con tripsina (Invitrogen), luego las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4 °C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio de Hanks), se contaron y se diluyeron a la concentración de 25×10^6 células/ml.

30 Las células MES-SA/Dx5 se mantuvieron en McCoy's (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM. El día del injerto de los ratones, las células se desprendieron del soporte lavando las células con tripsina (Invitrogen), luego las células se centrifugaron a 1300 rpm, 4 °C, 8 min, se suspendieron en tampón HBSS (medio de Hanks), se contaron y se diluyeron a la concentración de 25×10^6 células/ml.

Ratones

35 Se realizó el examen de actividad antitumoral de proteínas de la invención en ratones desnudos CD- (CrI:CD1-*Foxn1*^{nu} 1) de 4-5 semana semanas de edad o 7-9 semanas de edad o en ratones CrI:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} de 4-5 semanas de edad obtenidos de Charles River Germany o ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J de 4-5 semanas de edad obtenidos del Centrum Medycyny Doświadczalnej en Białystok. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicas con acceso libre a comida y agua desmineralizada (a voluntad). Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo según las pautas: "Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Marketing and Education" publicado por la New York Academy of Sciences' Ad Hoc Committee on Animal Research y fueron aprobados por el IV Comité de Ética Local sobre Experimentación en Animales en Varsovia (N.º 71/2009).

El curso y evaluación de los experimentos

45 Se midió el tamaño del tumor usando un compás electrónico, el volumen del tumor se calculó usando la fórmula: $(a^2 \times b)/2$, donde a = diagonal más corta del 25 tumor (mm) y b = diagonal más larga del tumor (mm). La inhibición del crecimiento tumoral se calculó usando la fórmula:

$$\text{ICT} [\%] = (\text{Inhibición del crecimiento tumoral}) = (\text{WT} / \text{WC}) \times 100 - 100 \%$$

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

50 Los resultados experimentales se presentan como un valor medio \pm desviación estándar (DE). Todos los cálculos y gráficos se prepararon usando el software GraphPad Prism 5.0.

Modelo de cáncer de colon humanoratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1

En el día 0, se injertaron ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células HCT116 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark).
 5 Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 60-90 mm³ (día 14), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~70 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 1 (10 mg/kg), Ej. 4 (10 mg/kg), Ej. 5 (10 mg/kg) y Ej. 9 (10 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como comparación. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) diariamente durante diez días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el
 10 tamaño de tumor promedio de ~1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5 y Ej. 9 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 5 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 6 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

 15

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 5 y 6 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1, Ej. 4, Ej. 5 y Ej. 9 causó la inhibición del crecimiento del tumor HCT116, con ICT respectivamente 67,8; 69,8; 84,4 y 66,2 % con respecto al control en el día 27° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 44 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

 20
Ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu}modelo HT116

En el día 0, se injertaron ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células HCT116 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark).
 25 Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 50-78 mm³ (día 8), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~ 63 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 5. (10 mg/kg), Ej. 4. (10 mg/kg), Ej. 9 (10 mg/kg), Ej. 1 (10 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (base Trizma 50 mM, NaCl 150 mM, sacarosa 80 mM, L-arginina 250 mM, glutatión 1 mM, Zn²⁺ 0,1 mM, pH 7,3) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) diariamente durante cinco días, seguido de (después de una pausa de 2 días) otras cinco administraciones diarias. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~ 1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

 30

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 4, Ej. 9, Ej. 1 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 10 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 11 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

 35

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 10 y 11 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 4, Ej. 9 y Ej. 1 causó la inhibición del crecimiento del tumor HCT116, con ICT respectivamente 80 %, 79 %, 66 % y 68 % con respecto al control en el día 27° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 44,3 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

 40
45 Ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}modelo HT116

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células HCT116 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark).
 50 Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 380-430 mm³ (día 14), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~ 400 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 11 (45 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~ 1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

 55

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 11 (45 mg/kg) y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 12 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 13 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- 5 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Fig. 12 y 13 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 causó la inhibición del crecimiento del tumor HCT116, con ICT respectivamente 42 % y 44,5 % con respecto al control en el día 32° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 5,6 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto
10 mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

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

modelo COLO205

- En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5×10^6 células
15 Colo205 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 90\text{-}130 \text{ mm}^3$ (día 13), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 115 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de
20 tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 19 (30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl_2 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo
25 terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

- Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon Colo205
25 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 19 (45 mg/kg) y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 14 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 15 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 14 y 15 muestran que la administración
30 de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 19 causó la inhibición del crecimiento del tumor Colo205, con ICT respectivamente 100 % y 100 % con respecto al control en el día 33° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 18,8 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto
35 mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

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

modelo SW620

- 35 En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5×10^6 células SW620 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 290\text{-}350 \text{ mm}^3$ (día 17), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 320 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de
40 tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 11 (40 mg/kg) y TRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl_2 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo
45 terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

- Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de colon SW620
45 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6, Ej. 11 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 16 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 17 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 16 y 17 muestran que la administración
50 de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 causó la inhibición del crecimiento del tumor SW620, con ICT respectivamente 62 % y 23 con respecto al control en el día 31 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, no se obtuvo efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del -9 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

Las proteínas de fusión probadas no produjeron efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de ratones (es decir, inferior al 10 % del peso corporal del nivel inicial). Esto muestra baja toxicidad sistémica de la proteína.

Modelo de cáncer de pulmón humano

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

En el día 0, se injertaron ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células A549 suspendas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 80-100 mm³ (día 14), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~90 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con la preparación de proteína de fusión de la invención del Ej. 1 (10 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como una comparación. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) cada dos días durante doce días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~ 1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

15 Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:CD1-Foxn1^{nu} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 1 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 7 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 8 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

20 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 7 y 8 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 1 causó la inhibición del crecimiento del tumor A549, con ICT 44,8 % con respecto al control en el día 33° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 16,5 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

Cby.Cg-foxn1(nu)/J

25 En el día 0, se injertaron ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células A549 suspendas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 60-90 mm³ (día 19), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~ 75 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 1 (15 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra agua para inyección como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~ 1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

35 Los resultados experimentales obtenidos en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 1 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 18 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 19 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

40 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 18 y 19 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención Ej. 1 causó la inhibición del crecimiento del tumor A549, con ICT 44,8 % con respecto al control en el día 33° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 16,6 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

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

45 A. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5x10⁶ células NCI-H460 suspendas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de ~ 150-170 mm³ (día 13), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~ 160 mm³ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~ 1000 mm³, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

55 Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 6 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran

en la Fig. 20 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 21 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 20 y 21 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención Ej. 6 causó la inhibición del crecimiento del tumor NCI-H460, con ICT 88,5 % con respecto al control en el día 28° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 17,5 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

B. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7×10^6 células A549 suspendas en una mezcla de 0,2 ml de HBSS:Matrigel en relación 3:1 por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 140-165 \text{ mm}^3$ (día 19), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 150 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 5 (60 mg/kg), Ej. 6 (50 mg/kg), Ej. 11(50 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, L-arginina 100 mM, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 6, Ej. 11 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 22 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 23 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 22 y 23 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención Ej. 5, Ej. 6, y Ej. 11 causó la inhibición del crecimiento del tumor A549, con ICT respectivamente 39,3 %, 39,3 % y 28 % con respecto al control en el día 38° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 5,3 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

C. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7×10^6 células NCI-H460-Luc2 suspendas en 0,1 ml de HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 100-120 \text{ mm}^3$ (día 19), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 110 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 5 (primera administración 40 mg/kg, seguido de 30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) as una comparación contra tampón de formulación (NaH₂PO₄ 19 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón NCI-H460-Luc2 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 5 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 24 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 25 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 24 y 25 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 5 causó la inhibición del crecimiento del tumor NCI-H460-Luc2, con ICT 97,2 % con respecto al control en el día 29 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 76 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

D. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7×10^6 células A549 suspendas en 0,1 ml de mezcla de HBSS:Matrigel por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $100-120 \text{ mm}^3$ (día 17), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 110 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 5 (50 mg/kg), Ej. 1 (50 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra tampón de formulación (NaH₂PO₄ 19 mM, Na₂HPO₄ 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5, Ej. 1 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 26 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 27 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- 5 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 26 y 27 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención del Ej. 5 y Ej. 1 causó la inhibición del crecimiento del tumor A549, con ICT respectivamente 52,5 % y 41,6 % con respecto al control en el día 34 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 21,8 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

Modelo de cáncer de hígado

- 15 Ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}A. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5×10^6 células PLC/PRF/5 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 190-220 \text{ mm}^3$ (día 31), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 200 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 6 (40 mg/kg) y Ej. 11 (50 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) siguiendo el esquema: 4 administraciones cada tres días y 2 administraciones cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

- 25 Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado PLC/PRF/5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6 y Ej. 11 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 28 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 29 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- 30 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 28 y 29 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención Ej. 6 y Ej. 11 causó la inhibición del crecimiento del tumor PLC/PRF/5, con ICT respectivamente 70,6 % y 63,8 % con respecto al control en el día 49 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, el efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales no se obtuvo con respecto al control, con ICT al nivel del -18 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

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

- 35 A. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 5×10^6 células HepG2 suspensas en 0,2 ml de tampón HBSS por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 190-220 \text{ mm}^3$ (día 31), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 200 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 6 (30 mg/kg), Ej. 19 (30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH₂PO₄ 5 mM, Na₂HPO₄ 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

- 45 Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de hígado HepG2 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 6, Ej. 19 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 30 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 31 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

- 50 Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 30 y 31 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención Ej. 6 y Ej. 19 causó la inhibición del crecimiento del tumor HepG2, con ICT respectivamente 82,6 % y 43 % con respecto al control en el día 33° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 12,6 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

Modelo de cáncer de páncreas

- 55 En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7×10^6 células PANC1 suspensas en 0,1 ml de mezcla HBSS:Matrigel 3:1 por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 87-110 \text{ mm}^3$ (día 27), los ratones se aleatorizaron para

obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 95 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con la preparación de proteína de fusión de la invención del Ej. 11 (50 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl_2 0,1 mM, L-arginina 100 mM, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con cáncer de páncreas PANC1 tratados con proteína de fusión de la invención del Ej. 11 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 32 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 33 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 32 y 33 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención Ej. 11 causó la inhibición del crecimiento del tumor PANC1, con ICT 43 % con respecto al control en el día 40° del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 12,0 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

Modelo de sarcoma uterino humano multiresistente En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} por vía subcutánea (sc) en el lado derecho con 7×10^5 células MES-SA/Dx5 suspendas en 0,1 ml de mezcla HBSS:Matrigel 10:1 por medio de una jeringa con una aguja de 0,5 x25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de $\sim 167\text{-}190 \text{ mm}^3$ (día 19), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de $\sim 180 \text{ mm}^3$ y se asignaron a grupos de tratamiento. Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteínas de fusión de la invención del Ej. 6, Ej. 19 (30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH_2PO_4 5 mM, Na_2HPO_4 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl_2 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de $\sim 1000 \text{ mm}^3$, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal. El grupo de control recibió rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} afectados con sarcoma uterino MES-SA/Dx5 tratados con las proteínas de fusión de la invención del Ej. 18, Ej. 6, Ej. 19 y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 34 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Fig. 35 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

Los resultados de experimentos presentados en los gráficos en las Figuras 34 y 35 muestran que la administración de las proteínas de fusión de la invención Ej. 6, Ej. 19 causó la inhibición del crecimiento del tumor MES-SA/Dx5, con ICT respectivamente 99,7 % y 99,7 % con respecto al control en el día 33 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 29 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercen un efecto mucho más fuerte en comparación con rhTRAIL114-281 sola.

Las proteínas de fusión probadas no produjeron efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, inferior al 10 % del peso corporal del nivel inicial). Esto muestra baja toxicidad sistémica de la proteína.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Adamed Sp. z o.o.

Pieczkolan, Jerzy Szczepan

Pawlak, Sebastian Dominik

Łęka, Bartłomiej Maciej

Różga, Piotr Kamil

<120> Proteína de fusión antineoplásica

<130> KP4

<150> PL393578

<151> 05-01-2010

<160> 56

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 173

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

15

<400> 1

```

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala
 1           5           10           15

His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn
 20           25           30

Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser
 35           40           45

Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly
 50           55           60

Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr
 65           70           75           80

Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys
 85           90           95

Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile
 100          105          110

Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu
 115          120          125

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

ES 2 628 377 T3

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

Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 165 170

<210> 2

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 2

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Thr Ser Glu Glu
 1 5 10 15

Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val
 20 25 30

Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
 35 40 45

Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
 50 55 60

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

Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
 85 90 95

Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
 100 105 110

Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
 115 120 125

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
 130 135 140

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

Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
 165 170 175

ES 2 628 377 T3

Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
 180 185 190

Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195

<210> 3

<211> 230

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 3

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala
 1 5 10 15

His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn
 20 25 30

Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser
 35 40 45

Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly
 50 55 60

Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys
 85 90 95

Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile
 100 105 110

Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu
 115 120 125

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

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

Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Gly
 165 170 175

ES 2 628 377 T3

Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Thr Met Pro Phe Leu Phe
180 185 190

Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp Tyr Ser
195 200 205

Tyr Trp Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala
210 215 220

Ser Leu Asn Pro Glu Arg
225 230

<210> 4

<211> 187

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 4

ES 2 628 377 T3

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Arg Lys
 1 5 10 15

Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile
 20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 35 40 45

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

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

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

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

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

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
 130 135 140

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

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

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 180 185

<210> 5

5 <211> 187

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de proteína de fusión

<400> 5

ES 2 628 377 T3

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile
 20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 35 40 45

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

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

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

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

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

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
 130 135 140

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

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

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 180 185

<210> 6

5 <211> 222

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de proteína de fusión

<400> 6

ES 2 628 377 T3

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys
 20 25 30

Ala Ala Cys Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln
 35 40 45

Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala
 50 55 60

Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
 85 90 95

Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
 100 105 110

Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln
 115 120 125

Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
 130 135 140

Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
 145 150 155 160

Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
 165 170 175

Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
 180 185 190

Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
 195 200 205

Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215 220

<210> 7

5 <211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de proteína de fusión

<400> 7

ES 2 628 377 T3

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

<210> 8

<211> 201

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 8

ES 2 628 377 T3

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 20 25 30

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 35 40 45

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 50 55 60

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 65 70 75 80

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 85 90 95

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 100 105 110

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 115 120 125

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 130 135 140

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 145 150 155 160

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 165 170 175

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 180 185 190

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200

<210> 9

<211> 192

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 9

ES 2 628 377 T3

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

<210> 10

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

10

<400> 10

ES 2 628 377 T3

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

<210> 11

<211> 226

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

ES 2 628 377 T3

<400> 11

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

5

<210> 12

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

<400> 12

5

```

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
1           5           10           15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser
20           25           30

Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn Pro Glu Arg Val Val Arg Pro
35           40           45

Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
50           55           60

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
65           70           75           80

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
85           90           95

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
100          105          110

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
115          120          125

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
130          135          140

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
145          150          155          160

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
165          170          175

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

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
195          200          205

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
210          215
    
```

<210> 13

10

<211> 220

ES 2 628 377 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> secuencia de proteína de fusión

<400> 13

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn
 1 5 10 15

Pro Glu Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Arg
 20 25 30

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

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

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

Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 85 90 95

Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 100 105 110

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys
 195 200 205

Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
 210 215 220

10

<210> 14

ES 2 628 377 T3

<211> 181

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

<400> 14

```

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln
          130 135 140

Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val
 145 150 155 160

Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly
          165 170 175

Ala Phe Leu Val Gly
          180
    
```

10

<210> 15

<211> 217

15

<212> PRT

ES 2 628 377 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de proteína de fusión

5

<400> 15

```

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

Ala Gly Pro Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser
 20 25 30

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 35 40 45

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 50 55 60

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 85 90 95

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 100 105 110

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 115 120 125

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 130 135 140

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 145 150 155 160

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 165 170 175

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

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 195 200 205

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215
    
```

10

<210> 16

<211> 281

ES 2 628 377 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

5 <308> GenBank/P50591

<309> 1996-10-01

<313> (1)..(281)

<400> 16

10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 628 377 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 275 280

<210> 17

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GenBank/AAI72307.1

10 <309> 2009-03-16

<313> (333)..(339)

<400> 17

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg
 1 5

15

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<300>

<308> GenBank/AAF72632.1

ES 2 628 377 T3

<309> 2000-05-30

<313> (74)..(98)

<400> 18

5

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
1 5 10 15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
20 25

<210> 19

<211> 18

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GenBank/AAF72632.1

15

<309> 2000-05-30

<313> (197)..(214)

<400> 19

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn
1 5 10 15

20

Pro Glu

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

30

<300>

<301> Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.

<302> Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature

ES 2 628 377 T3

<303> Science (Washington DC)

<304> 279

<305> 5349

<306> 377-380

5 <307> 16-01-1998

<313> (1)..(5)

<400> 20

Cys Asn Gly Arg Cys
1 5

10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> construcción sintética

<300>

20 <308> PDB/1FUL_A

<309> 2009-07-10

<313> (2)..(10)

<400> 21

25

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1 5

<210> 22

<211> 19

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<301> Khachigian LM, Owensby DA, Chesterman CN.

<302> A tyrosinated peptide representing the alternatively spliced exon of the platelet-derived growth factor A-chain binds specifically to cultured cells and interferes with binding of several growth factors.

<303> Journal of Biological Chemistry

<304> 25

5 <305> 267

<306> 1660-1666

<307> 25-01-1992

<300>

10 <301> Khachigian LM, Field SL, Crouch R, Chesterman CN

<302> Platelet-derived growth factor A-chain synthetic peptide inhibits human glioma xenograft proliferation in nude mice.

<303> Anticancer Res

<304> 15

15 <305> 2

<306> 337-41

<307> 1995-04-05

<400> 22

20

Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
1 5 10 15

Lys Pro Thr

<210> 23

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GenBank/AAI67147.1

30 <309> 2008-05-05

<313> (453)..(460)

<400> 23

ES 2 628 377 T3

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu
1 5

<210> 24

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de corte de proteasa

10

<400> 24

Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5

15 <210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia de corte de proteasa

<400> 25

Arg Val Val Arg
1

25

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia artificial de conector estérico

ES 2 628 377 T3

<400> 26

Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys
1 5 10

5 <210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia artificial de conector estérico

<400> 27

Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys
1 5 10

15

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia artificial de conector estérico

25 <400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

30 <210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 628 377 T3

<300>

<308> GenBank/CAA94521.1

<309> 13-06-1996

<313> (122)..(124)

5

<400> 29

Gly Gly Gly Gly
1

10

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<300>

<308> GenBank/CAA94521.1

<309> 13-06-1996

<313> (122)..(126)

20

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

25

<210> 31

<211> 519

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> construcción artificial

<400> 31

ES 2 628 377 T3

cgtaaacgca aaaaaagtcg tgggtggtggt ggtggccgcg ttgcggcaca tattacgggt 60
 acccgtggcc gcagcaacac gctgagctct ccgaattcga aaaatgaaa agcactgggc 120
 cgcaaaatta actcgtggga aagcagtcgt tctggtcaca gctttctgtc gaatctgcac 180
 ctgcgcaatg gtgaactggt gattcatgaa aaaggctttt actatatcta ttctcagacg 240
 tatttttcggt ttcaggaaga aattaaagaa aacacaaaa atgacaaaaa gatggtgcag 300
 tacatttaca aatacaccag ttacccggac ccgattctgc tgatgaaaag cgcccgtaac 360
 tcatgctgga gcaaagacgc tgaatatggc ctgtattcta tttatcaggg tggcatcttc 420
 gaactgaaag aaaacgatcg tatttttggt tcggtgacca acgaacacct gattgatatg 480
 gatcatgaag catcgttttt cggcgcggtt ctggtcggc 519

<210> 32

<211> 597

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

10

<400> 32

cgcaaacgta aaaaaagccg tgggtggtggc ggtggcacca gcgaagaaac cattagcacc 60
 gttcaggaaa aacagcagaa tattagtccg ctggttcgtg aacgtggtcc gcagcgtggt 120
 gcagcacata ttaccggcac ccgtggtcgt agcaataccc tgagcagccc gaatagcaaa 180
 aatgaaaaag cactgggtcg caaaattaat agctgggaaa gcagccgtag cggcatagc 240
 tttctgagca atctgcatct gcgtaatggt gaactggtga ttcataaaaa aggcttttat 300
 tatatttata gccagacctt ttttcgcttt caggaagaaa ttaaagaaaa taccaaaaat 360
 gataaaciaa tgggtgcagta tatctataaa tacaccagct atccgatcc gattctgctg 420
 atgaaaagcg cacgtaatag ctggtggagc aaagatgcag aatatggtct gtatagcatt 480
 tatcaggggtg gcatttttga actgaaagaa aatgatcgca tttttgtgag cgtgaccaat 540
 gaacatctga ttgatatgga tcatgaagcc agcttttttg gtgcatttct ggtgggt 597

15 <210> 33

<211> 690

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<220>

<223> construcción artificial

<400> 33

5

```
cgtaaacgta aaaaaagccg tgggtggtggt ggcggtcgtg ttgcagcaca tattaccggc      60
accctggtgtc gtagcaatac cctgagcagc ccgaatagca aaaatgaaa agcactgggt      120
cgcaaaatta atagctggga aagcagccgt agcggtcata gctttctgag caatctgcat      180
ctgcgtaatg gtgaactggt gattcatgaa aaaggcctttt attatattta tagccagacc      240
tattttcgct ttcaggaaga aattaaaga aatacctaaa atgataaaca aatggtgcag      300
tacatttaca aatataccag ctatccggat ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat      360
agctgttggg gcaaagatgc agaatatggt ctgtatagca tttatcaggg tggcattttt      420
gaactgaaag aaaatgatcg catttttgtg agcgtgacca atgaacatct gattgatatg      480
gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcattt ctggttggtg gcggtggtcc gctgggtctg      540
gcaggtcgtg ttgttcgtac catgccgttt ctgttttgca atgttaatga tgtgtgcaat      600
tttgccagcc gcaatgatta tagctattgg ctgtgcaatt attatagcaa tagctatagc      660
ttttggctgg ctagtctgaa tccggaacgt      690
```

<210> 34

<211> 561

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

15

<400> 34

ES 2 628 377 T3

cgcaaacgta aaaaaagccg tccgctgggt attgccggtg aacgtaaacg caaaaaatct 60
 cgtggtggtg gtggcggtcg tgttgagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120
 accctgagca gcccgatag caaaaatgaa aaagccctgg gtcgcaaat taatagctgg 180
 gaaagcagcc gtagcggca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg 240
 gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctatcttcg ctttcaggaa 300
 gaaattaaag aaaacaccaa aatgataaa caaatggtgc agtatatcta taaatacacc 360
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420
 gcagaatatg gcctgtatag ctttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480
 cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
 tttggtgcat ttctggtggg t 561

<210> 35

<211> 561

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

10

<400> 35

cgtaaacgta aaaaaagccg tgttggttctg ccgctgggta ttgccggtga acgtaaacgc 60
 aaaaaatcac gtggtggtcg tgttgagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120
 accctgagca gcccgatag caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaat taatagctgg 180
 gaaagcagcc gtagcggca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg 240
 gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctatcttcg ctttcaggaa 300
 gaaattaaag aaaataccea aatgataaa caaatggtgc agtacattta caaatatacc 360
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420
 gcagaatatg gtctgtatag ctttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480
 cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
 tttggtgcat ttctggttgg t 561

15

<210> 36

<211> 666

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<220>

<223> construcción artificial

<400> 36

5

```
cgtaaacgta aaaaaagccg tgttggtcgt ccgctgggta ttgcaggtga acgtaaacgt      60
aaaaaaagcc gtggtggtgg ttgtgcagca gcatgtgcag catgtaccag cgaagaaacc     120
attagcaccg ttcaggaaaa acagcagaat attagcccgc tggttcgtga acgtggtccg     180
cagcgtggtg cagcacatat taccggtacc cgtggtcgta gcaataccct gagcagcccg     240
aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgt aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc     300
ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg cgtaatgggtg aactggttat tcatgaaaaa     360
ggtttttatt atatttatag ccagacctat tttcgttttc aggaagaaat taaagaaat     420
accaaaaatg ataaacagat ggttcagtat atttataaat ataccagcta tccggatccg     480
attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc tgttggagca aagatgcaga atatggtctg     540
tatagcattt atcagggtgg tatttttgaa ctgaaagaaa atgatcgtat ttttgttagc     600
gttaccaatg aacatctgat tgatatggat catgaagcaa gcttttttgg tgcatttctg     660
gttggt
```

<210> 37

<211> 505

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

15

<400> 37

ES 2 628 377 T3

tgtaatggtc gttgtccgca gcgtgttgca gcacatatta ccggcaccog tggtcgtagc 60
 aataccctga gcagcccgaa tagcaaaaat gaaaaagccc tgggtcgcaa aattaatagc 120
 tgggaaagca gccgtagcgg tcatagcttt ctgagcaatc tgcactctgog taatggtgaa 180
 ctggtgattc atgaaaaag cttttattat atttatagcc agacctattt tgcctttcag 240
 gaagaaatta aagaaaacac caaaaatgat aaacaaatgg tgcagtatat ctataaatac 300
 accagctatc cggatccgat tctgctgatg aaaagcgcac gtaatagctg ttggagcaaa 360
 gatgcagaat atggcctgta tagcatttat cagggtggca tttttgaact gaaagaaaat 420
 gatcgcattt ttgtgagcgt gaccaatgaa catctgattg atatggatca tgaagccag 480
 cttttttggt gcatttctgg tgggt 505

<210> 38

<211> 600

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

10

<400> 38

tgtgaatgtg gcggtgaatg tttttgtggt ggcggtagca ccagtgaaga aaccattagc 60
 accgttcaag aaaaacagca gaatattagt ccgctgggtc gtgaacgtgg tccgcagcgt 120
 gttgcagcac atattaccgg caccctgggt cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc 180
 aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatc aatagctggg aaagcagccg tagcggcat 240
 agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttc 300
 tactatatct acagccagac ctattttcgc ttccaagaag aaatcaaaga gaacaccaa 360
 aacgacaaac aaatggtgca gtacatctac aaatatacca gctatccgga tccgattctg 420
 ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg tctgtatagc 480
 atttatcagg gtggcatctt tgagctgaaa gaaaatgatc gcatctttgt tagcgtgacc 540
 aacgaacatc tgatcgatat ggatcatgaa gccagctttt ttggtgcatt tctggtgggt 600

15

<210> 39

<211> 576

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<220>

<223> construcción artificial

<400> 39

5

```
tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgaccgct      60
gttgttcgtc cgctgggtct ggcaggtccg cagcgtgttg cagcacatat taccggcacc      120
cgtggtcgtc gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc cctgggtcgt      180
aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg      240
cgtaatggcg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttatt atatttatag ccagacctat      300
tttcgctttc aggaagaaat taaagaaat accaaaaatg ataacaaat ggtgcagtat      360
atctataaat ataccagcta tccgatccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc      420
tgttgagca aagatgccga atatggtctg tatagcattt atcagggtgg catttttgaa      480
ctgaaagaaa atgatcgcac ttttgtgagc gtgaccaatg aacatctgat tgatatggat      540
catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gttggt      576
```

<210> 40

<211> 648

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

15

<400> 40

```
tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgaccgct      60
```

ES 2 628 377 T3

gttggtcgtc cgctgggtct ggcaggcacc agcgaagaaa ccattagcac cgttcaggaa 120
 aaacagcaga atattagtcc gctggttcgt gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat 180
 attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aatgaaaaa 240
 gcaactgggtc gcaaaattaa tagctgggaa agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc 300
 aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg attcatgaaa aaggctttta ttatatttat 360
 agccagacct attttcgctt tcaggaagaa attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacia 420
 atggtgcagt atatctataa atacaccagc tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc 480
 gcacgtaata gctggttgag caaagatgca gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt 540
 ggcatttttg aactgaaaga aatgatcgc atttttgtga gcgtgaccaa tgaacatctg 600
 attgatatgg atcatgaagc cagctttttt ggtgcatttc tgggtgggt 648

<210> 41

<211> 678

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

10

<400> 41

tatggtcgtc gcggtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgtctgaa accgaccggt 60
 gttggtcgtc cgctgggtct ggcaggtggg gttgtgagc cagcatgtgc agcatgtacc 120
 agcgaagaaa ccattagcac cgttcaggaa aaacagcaga atattagccc gctggttcgt 180
 gaacgtggtc cgcagcgtgt tgcagcacat attaccggta cccgtggtcg tagcaatacc 240
 ctgagcagcc cgaatagcaa aatgaaaaa gcaactgggtc gtaaaattaa tagctgggaa 300
 agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtt 360
 attcatgaaa aaggctttta ttatatttat agccagacct attttcgctt tcaggaagaa 420
 attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacag atggttcagt atatttataa atataaccagc 480
 tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctggttgag caaagatgca 540
 gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt ggtatttttg aactgaaaga aatgatcgt 600
 atttttgtta gcgttaccaa tgaacatctg attgatatgg atcatgaagc aagctttttt 660
 ggtgcatttc tgggtgggt 678

15

<210> 42

<211> 651

ES 2 628 377 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> construcción artificial

<400> 42

```
accatgccgt ttctgttttg caatgttaat gatgtgtgca attttgccag ccgcaatgat      60
tatagctatt ggctgtgcaa ttattatagc aatagctata gcttttggct ggcttctctg      120
aatccggaac gtggtgttcg tccgctgggt ctggcaggcg gtggtggtcg tgttgcagca      180
catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa      240
aaagcactgg gtcgcaaaaat taatagctgg gaaagcagcc gtagcgtca tagctttctg      300
agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt      360
tatagccaga cctatthttcg ctttcaggaa gaaattaaag aaaataccaa aatgataaa      420
caaatggtgc agtacattta caaatatacc agctatccgg atccgattct gctgatgaaa      480
agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat gcagaatag gtctgtatag catttatcag      540
ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat      600
ctgattgata tggatcatga agccagcttt tttggtgcat ttctggttgg t                651
```

10

<210> 43

<211> 660

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> construcción artificial

<400> 43

20

ES 2 628 377 T3

tgcaattatt atagcaatag ctatagcttt tggctggcaa gcctgaatcc ggaacgtggt 60
 gttcgtccgc tgggtctggc tgggggtggc ggtcgtggtg cagcacatat taccggcacc 120
 cgtggtcgtgta gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 180
 aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 240
 cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttatt atatttatag ccagacctat 300
 tttcgttttc aggaagaaat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtac 360
 atttacaat ataccagcta tccggatccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc 420
 tgttgagca aagatgcaga atatggtctg tatagcattt atcagggtgg catttttgaa 480
 ctgaaagaaa atgatcgc ttttgtgagc gtgaccaatg aacatctgat tgatatggat 540
 catgaagcca gcttttttg tgcatttctg gttggtggcg gtggtactat gccgtttctg 600
 ttttgcaatg ttaatgatgt gtgcaatgtt gccagccgca atgattatag ctattggctg 660

<210> 44

<211> 543

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

10

<400> 44

ctgggtctgc gtagcctgcg tgaacgtggt gttcgtccgc tgggtctggc aggtccgcag 60
 cgtgttgagcag cacatattac cggcaccogt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 120
 agcaaaaatg aaaaagccct gggctgtaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgggt 180
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggcgaac tggtgattca tgaaaaaggc 240
 ttttattata tttatagcca gacctatgtt cgctttcagc aagaaattaa agaaaaatacc 300
 aaaaatgata aacaaatggt gcagtatatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 360
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgccgaata tggctctgat 420
 agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatttt tgtgagcgtg 480
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtt 540
 ggt 543

15 <210> 45

<211> 651

<212> ADN

ES 2 628 377 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción artificial

5

<400> 45

```
ctgggtctgc gtagcctgcg tgaacgtggt gttcgtccgc tgggtctggc aggtccgggt      60
ggtggttgtg cagcagcatg tgcagcatgt accagcgaag aaaccattag caccgttcag      120
gaaaaacagc agaatattag cccgctgggt cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttgcagca      180
catattaccg gtaccctggg tcgtagcaat accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa      240
aaagcactgg gtcgtaaaat taatagctgg gaaagcagcc gtagcgtca tagctttctg      300
agcaatctgc atctgcgtaa tgggtgaactg gttattcatg aaaaaggttt ttattatatt      360
tatagccaga cctatthttcg ttttcaggaa gaaattaaag aaaataccaa aatgataaa      420
cagatggttc agtatattta taaatatacc agctatccgg atccgattct gctgatgaaa      480
agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat gcagaatag gtctgtatag catttatcag      540
ggtggtatth ttgaactgaa agaaaatgat cgtatthttg ttagcgttac caatgaacat      600
ctgattgata tggatcatga agcaagctth tttggtgcat ttctggttgg t      651
```

10

<210> 46

<211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia artificial

<400> 46

ES 2 628 377 T3

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr
 20 25 30

Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly
 35 40 45

Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn
 50 55 60

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
 65 70 75 80

Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
 85 90 95

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
 100 105 110

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
 115 120 125

Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
 130 135 140

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
 145 150 155 160

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
 165 170 175

Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
 180 185 190

Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
 195 200 205

Leu Val Gly
 210

<210> 47

<211> 200

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<400> 47

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys
 20 25 30

Ala Ala Cys Gly Ser Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 35 40 45

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
 50 55 60

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

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
 85 90 95

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
 100 105 110

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
 115 120 125

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 130 135 140

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
 145 150 155 160

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 165 170 175

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
 180 185 190

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200

5 <210> 48

<211> 192

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia artificial

ES 2 628 377 T3

<400> 48

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ser Gly Gln Arg
 20 25 30

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

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

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

Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 85 90 95

Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 100 105 110

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

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

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

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

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

5 <210> 49

<211> 206

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia artificial

<400> 49

ES 2 628 377 T3

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

<210> 50

<211> 633

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia artificial

10

<400> 50

ES 2 628 377 T3

cgtaaacgta aaaaaagccg tgtggtgctg ccgctgggca ttgCGGgcga acgtaaacgt 60

aaaaaaagcc gtaccagcga agaaaccatt agcaccgtgc aggaaaaaca gcagaacatt 120

agcccgctgg tgcgtgaacg tggcccgcag cgtgtggcgg cgcataattac cggcaccctg 180

ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac agcaaaaacg aaaaagcgtg gggccgtaaa 240

attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc catagctttc tgagcaacct gcatctgctg 300

aacggcgaac tgggtgattca tgaaaaaggc ttttattata tttatagcca gacctatfff 360

cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt 420

tataaatata ccagctatcc ggatccgatt ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc 480

tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat agcatttatc agggcggcat ttttgaactg 540

aaagaaaacg atcgtatfff tgtgagcgtg accaacgaac atctgattga tatggatcat 600

gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg ggc 633

<210> 51

5 <211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia artificial

<400> 51

cgtaaacgta aaaaaagccg tgttgttctg ccgctgggta ttgCCGgtga acgtaaacgc 60

aaaaaatcac gtggtggtgg ttgtgcagca gcatgtgcag cctgtggtag cggtcagcgt 120

gttgcagcac atattaccgg caccctggtg cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc 180

aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatt aacagctggg aaagcagccg tagcgggtcat 240

agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttt 300

tactacatct acagccagac ctatttccgc tttcaagaag agattaaaga aaataccaaa 360

aatgataaac aaatggtgca gtatatattac aaatatacca gctatccgga tccgatcctg 420

ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg cctgtatagc 480

atztatcagg gtggcatctt tgaactgaaa gaaaacgatc gtatfffctg gagcgtgacc 540

aatgaacatc tgatcgatat ggatcatgaa gccagctfff ttggtgcatt tctggtgggt 600

15

<210> 52

<211> 576

<212> ADN

ES 2 628 377 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia artificial

5

<400> 52

```
cgtaaacgta aaaaaagccg tgttggtgccc aaacgcaaaa aatcacgtgg tggtaggttgt      60
gcagcagcat gtgcagcctg tggtagcggg cagcgtggtg cagcacatat taccggcacc      120
cgtggtcgtg gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc      180
aaaattaaca gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg      240
cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttact acatctacag ccagacctat      300
ttccgctttc aagaagagat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtat      360
atttacaaat ataccagcta tccggatccg atcctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc      420
tgttgagca aagatgcaga atatggcctg tatagcattt atcagggtgg catctttgaa      480
ctgaaagaaa acgatcgtat tttcgtgagc gtgaccaatg aacatctgat cgatatggat      540
catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gtgggt      576
```

10

<210> 53

<211> 676

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia artificial

<400> 53

20

ES 2 628 377 T3

tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgaccgt 60
gttgttcgtc cgctgggtat tgccggtgaa ggtgggtggt gtgcagcagc atgtgcagcc 120
tgtggtagcg gtcagcgtgt tgcaacacat attaccggca cccgtggctg tagcaatacc 180
ctgagcagcc cgaatagcaa aatgaaaaa gcaactgggc gcaaatcaa tagctgggaa 240
agcagccgta gcggtcatac ctttctgagc aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg 300
atcatgaaa aaggctttta ttacatttat agccagacct atttccgctt tcaagaagaa 360
attaagaaa ataccaaaa tgataaacia atgggtgcagt atatttacia atataccagc 420
tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctggtggag caaagatgca 480
gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggg gccatttttg aactgaaaga aatgatcgc 540
atthttgtga gcgtgaccia tgaacatctg attgatatgg atcatgaagc cagctthttt 600
ggtgcatthc tgggtgggtta ataactcgag ggtacctgga gcacaagact ggcctcatgg 660
gccttccgct cactgc 676

<210> 54

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector flexible

10

<400> 54

Cys Gly Ser Gly

1

15

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 55

Pro Leu Gly Ile Ala Gly Glu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:

5 - dominio (a) que comprende un fragmento funcional de la secuencia de proteína hTRAIL soluble que empieza con un aminoácido en una posición no inferior a hTRAIL95 y capaz de inducir la señal apoptósica en células de mamífero tras la unión a sus receptores sobre la superficie de las células, u homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con dicho fragmento funcional; y

10 - dominio (b) que constituye una secuencia de péptido efector antiangiogénico que es el inhibidor del receptor de factores de crecimiento y está seleccionado del grupo de fragmentos de factores de crecimiento que consisten en fragmento de VEGF de SEQ. No. 17, fragmento de PDGF de SEQ. No. 22 y fragmento de EGF de SEQ. No. 23;

en la que la secuencia de dominio (b) está unida en el extremo C o extremo N del dominio (a).

2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que el dominio (a) comprende un fragmento de la secuencia de proteína hTRAIL soluble que empieza con un aminoácido a partir del intervalo hTRAIL95 a hTRAIL121, ambos incluidos, y que termina con el aminoácido hTRAIL281.

15 3. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en la que el dominio (a) está seleccionado del grupo que consiste en hTRAIL95-281, hTRAIL119-281, hTRAIL120-281 y hTRAIL121-281.

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

20 5. La proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que la secuencia reconocida por metaloproteasa MMP es SEQ. No. 24, SEQ. No. 55 o SEQ. No. 56, y la secuencia reconocida por urocinasa uPA es SEQ. No. 25.

6. La proteína de fusión según la reivindicación 4 o 5, en la que el dominio (c) es una combinación de secuencias localizadas próximas entre sí reconocidas por metaloproteasa MMP y urocinasa uPA.

25 7. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína entre los dominios (a), (b), (c) y/o (d) comprende además conector estérico flexible de glicina, glicina-serina o cisteína o combinaciones de los mismos.

30 8. La proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que el conector estérico flexible está seleccionado del grupo que consiste en GG, E, GGGCAAACAAC (SEQ. No. 26), GGCAAACAAC (SEQ. No. 27), GGGGG (SEQ. No. 28), GGGG (SEQ. No. 29), GGG (SEQ. No. 30) y GSG (SEQ. No. 54).

9. La proteína de fusión según la reivindicación 1 que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ. No. 1; SEQ. No. 2; SEQ. No. 4; SEQ. No. 5; SEQ. No. 6; SEQ. No. 9; SEQ. No. 10; SEQ. No. 11; SEQ. No. 14; SEQ. No. 15; SEQ. No. 46; SEQ. No. 47; SEQ. No. 48 y SEQ. No. 49.

10. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una proteína recombinante.

35 11. Una composición farmacéutica, que comprende como principio activo la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. La composición farmacéutica según la reivindicación 11, en una forma para administración parenteral.

40 13. La proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas en mamíferos, que incluyen seres humanos.

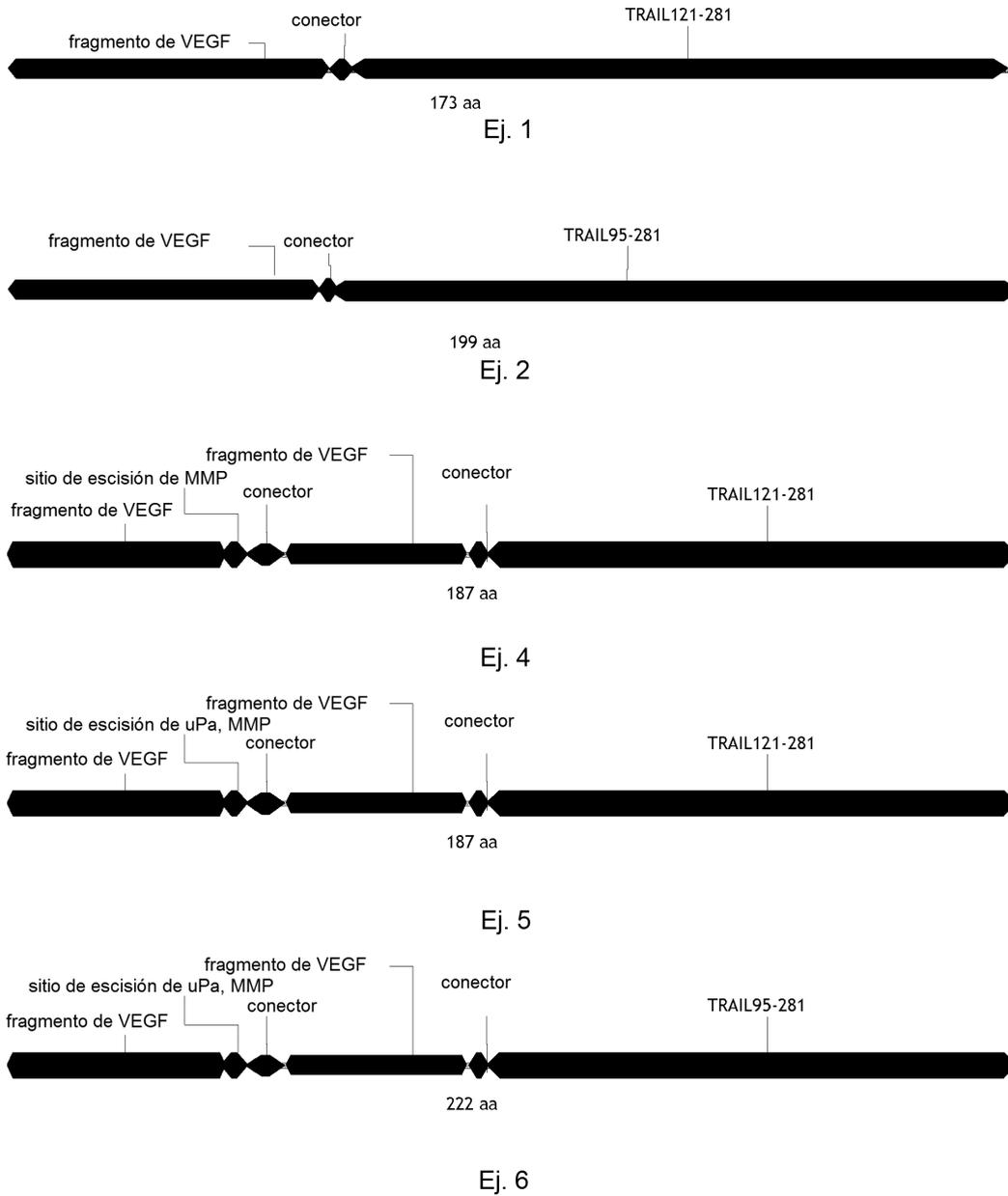
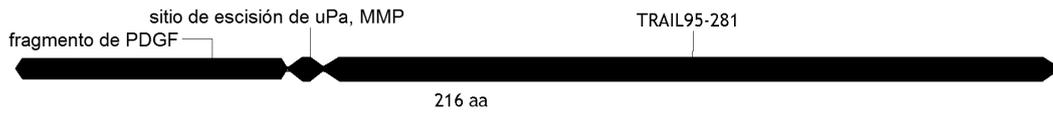


Fig. 1



Ej. 9

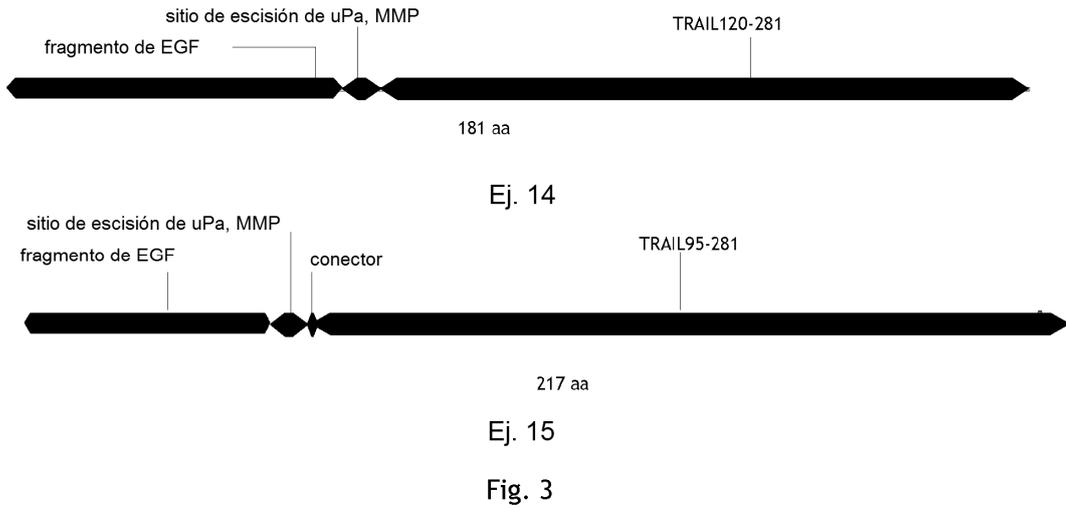


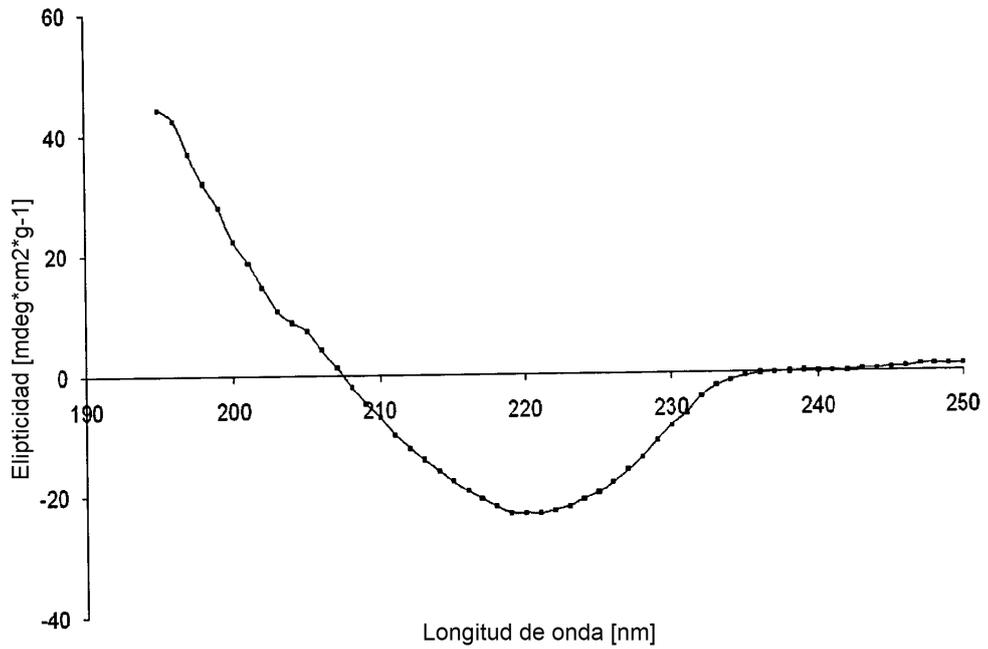
Ej. 10



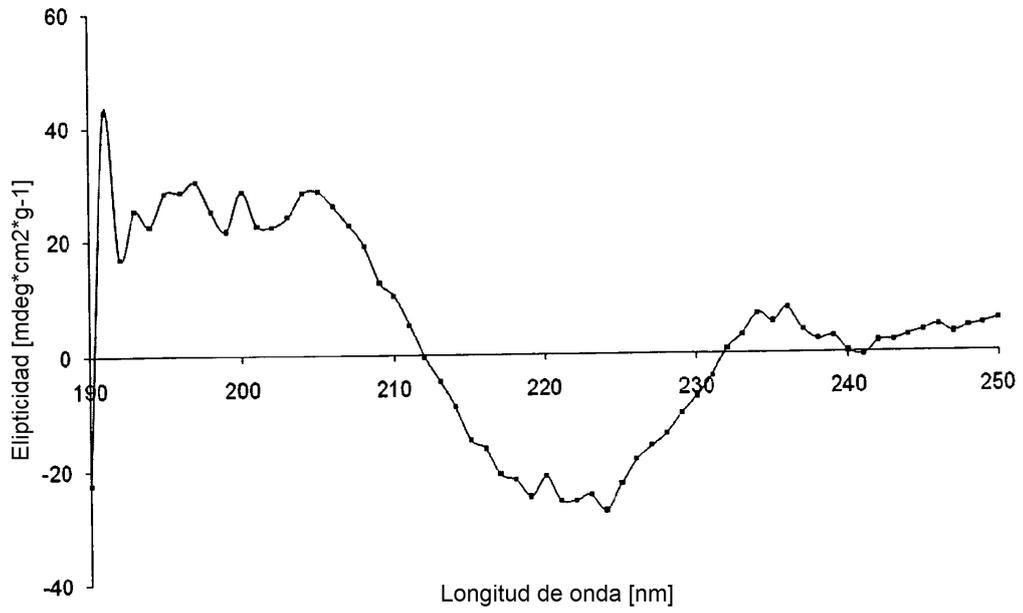
Ej. 11

Fig. 2



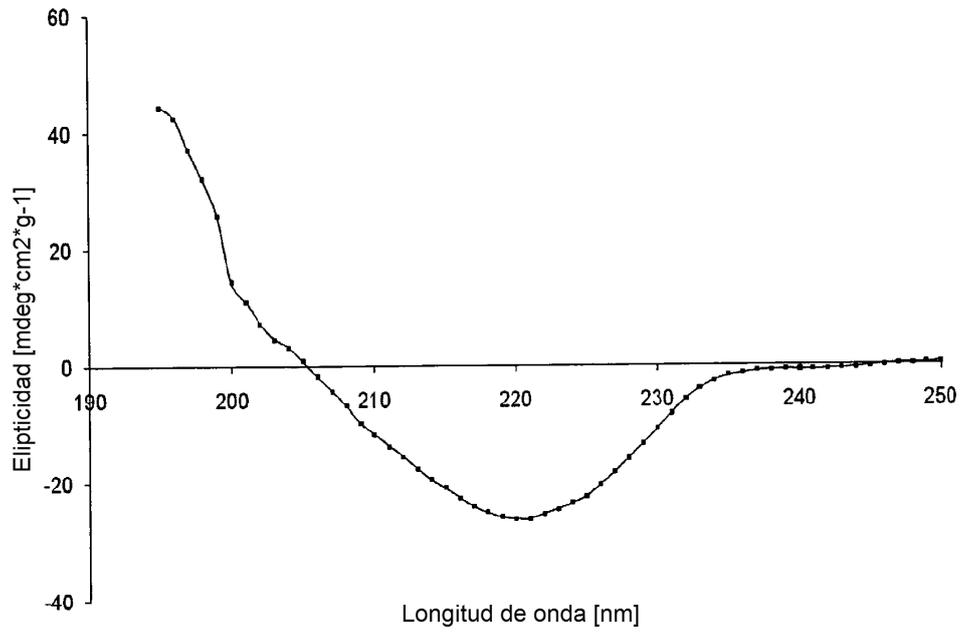


Ej. 1

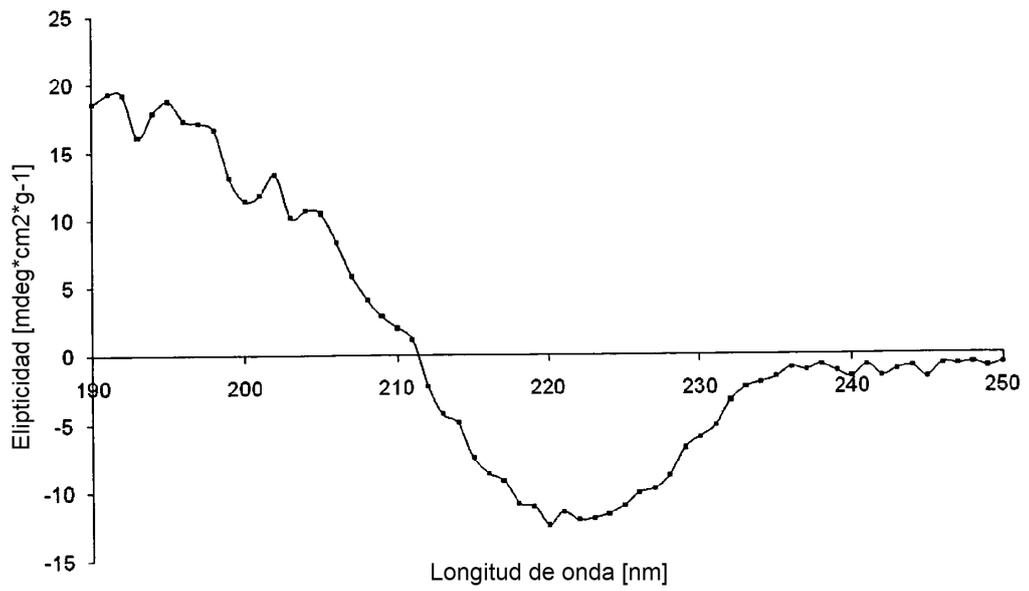


Ej. 4

Fig. 4

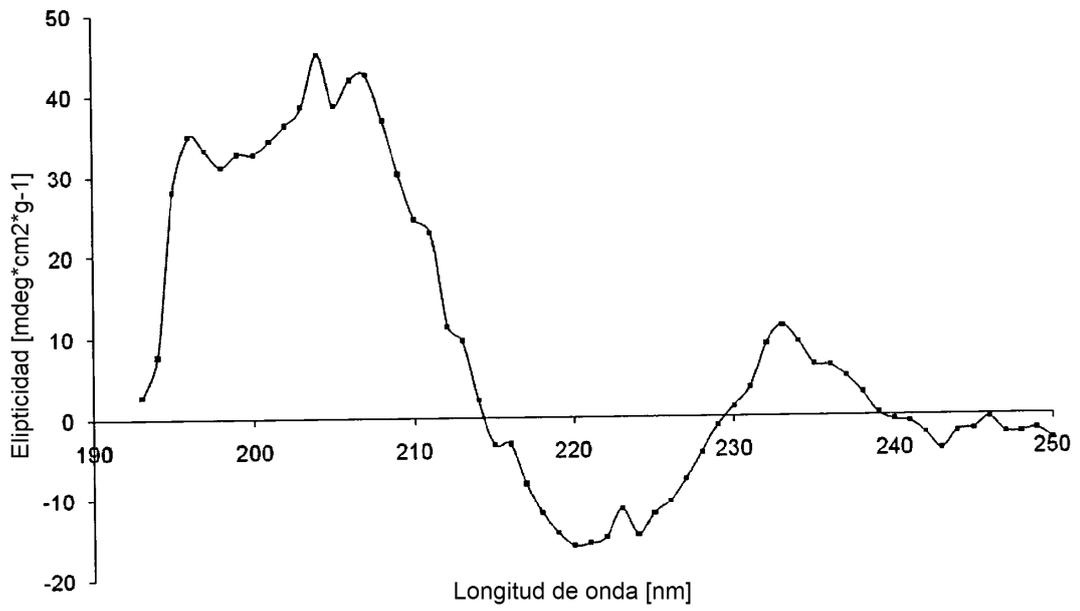


Ej. 5

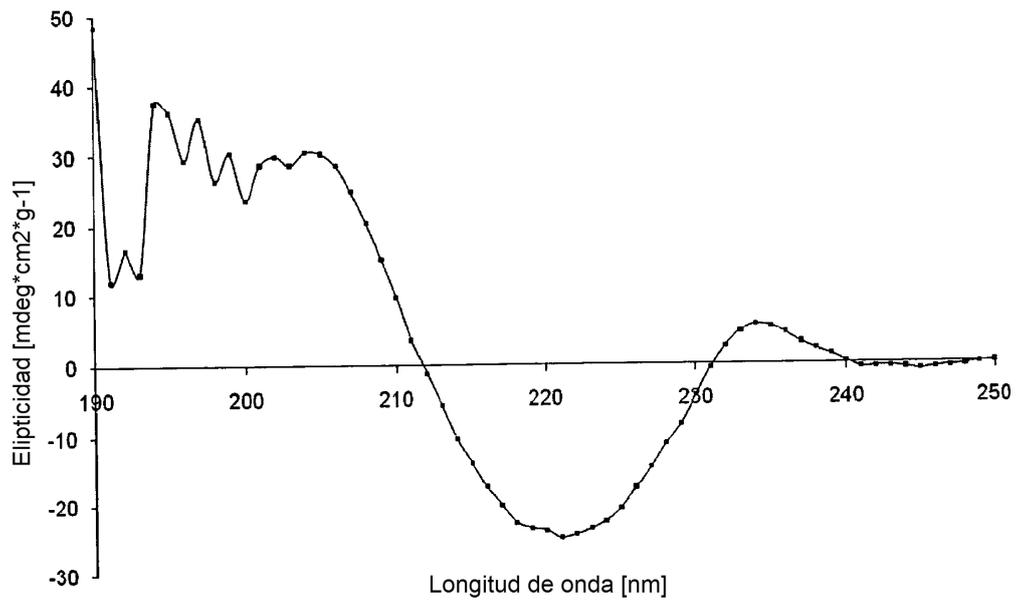


Ej. 9

Fig. 4 continuación



rhTRAIL 114-281



Ej. 14

Fig. 4 continuación

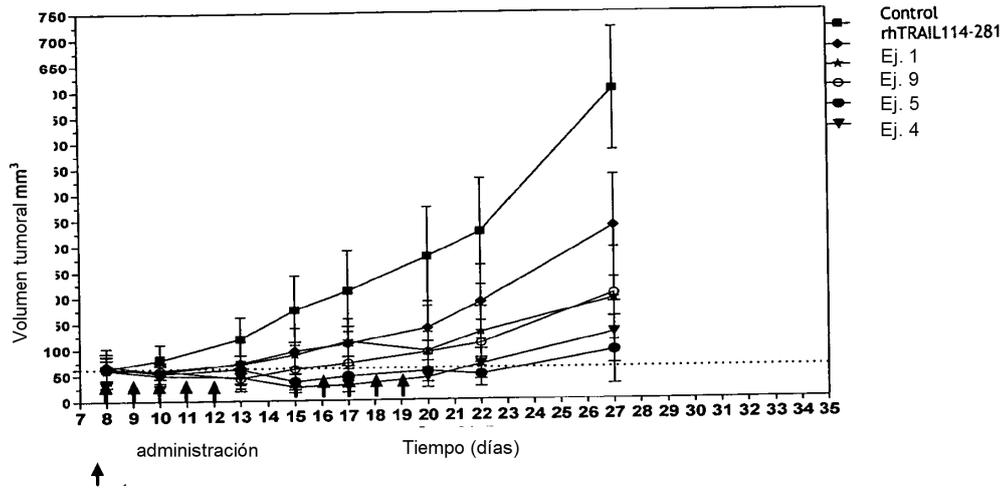


Fig. 5

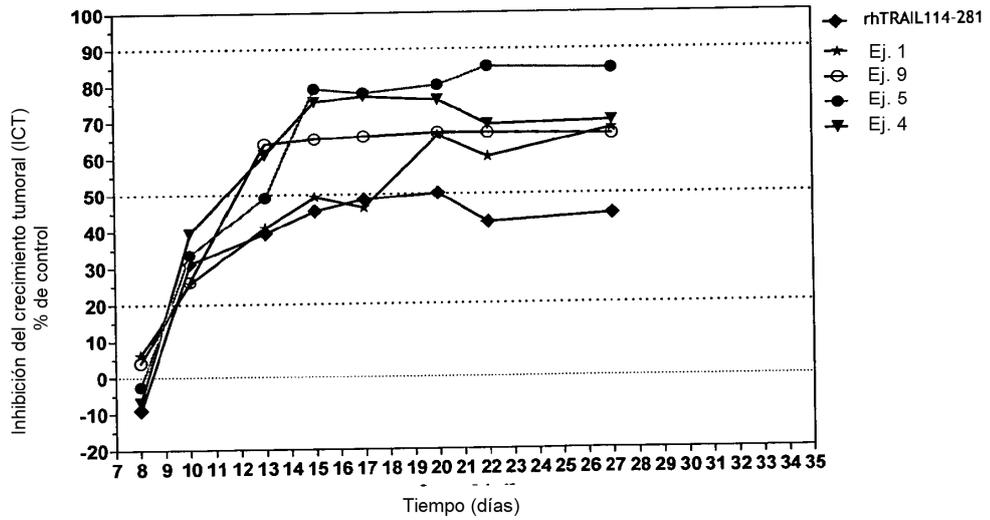


Fig.6

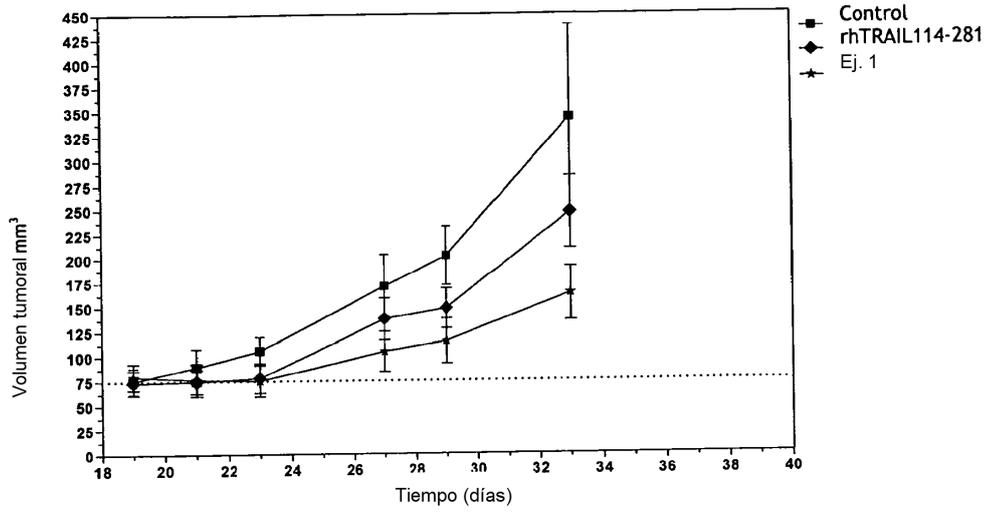


Fig. 7

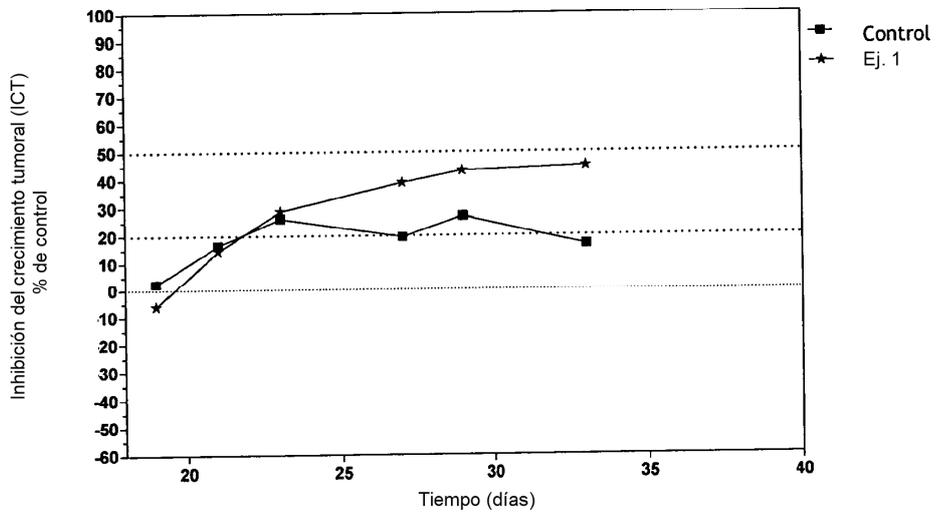


Fig. 8

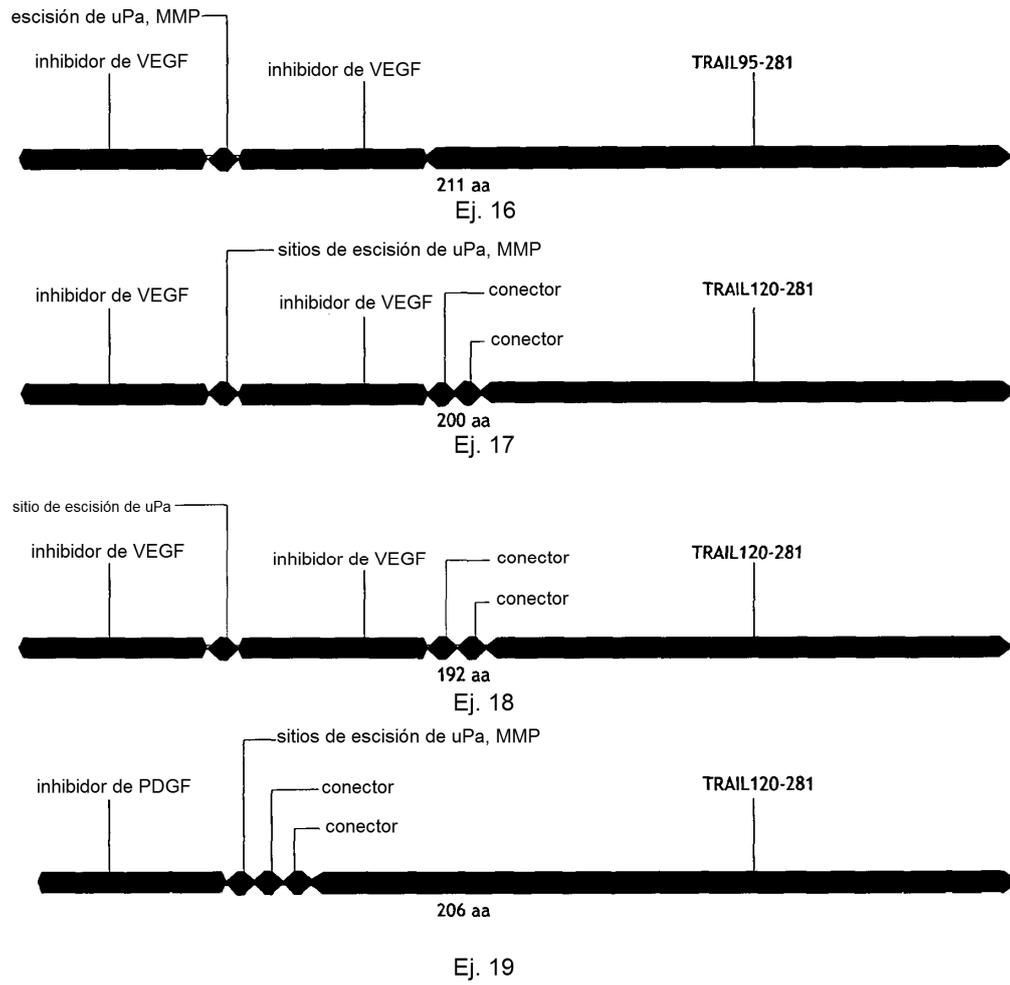


Fig. 9

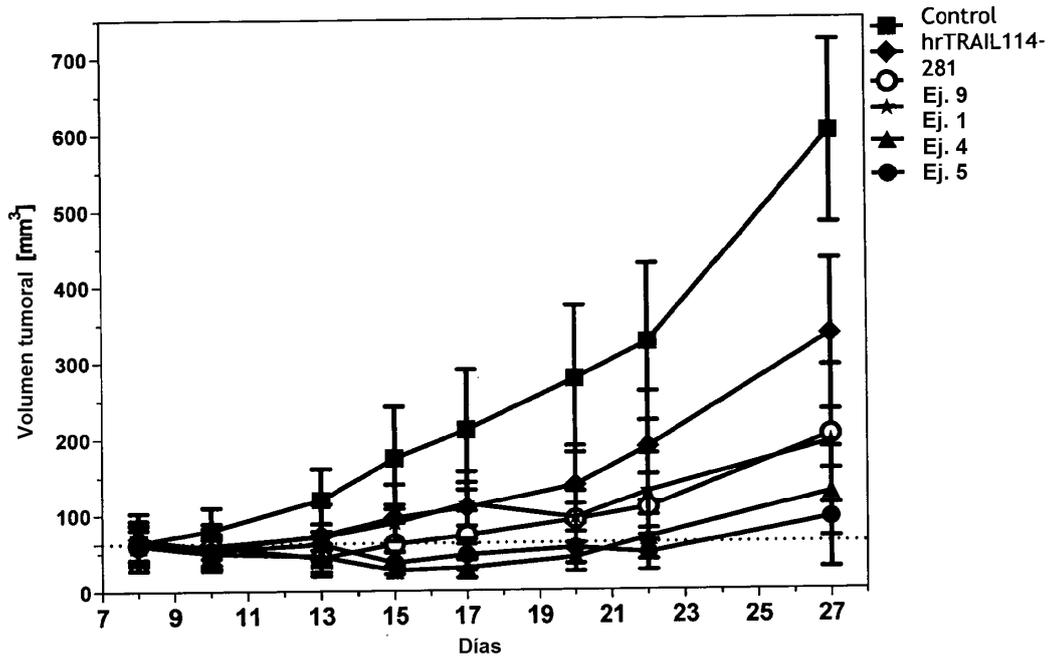


Fig. 10

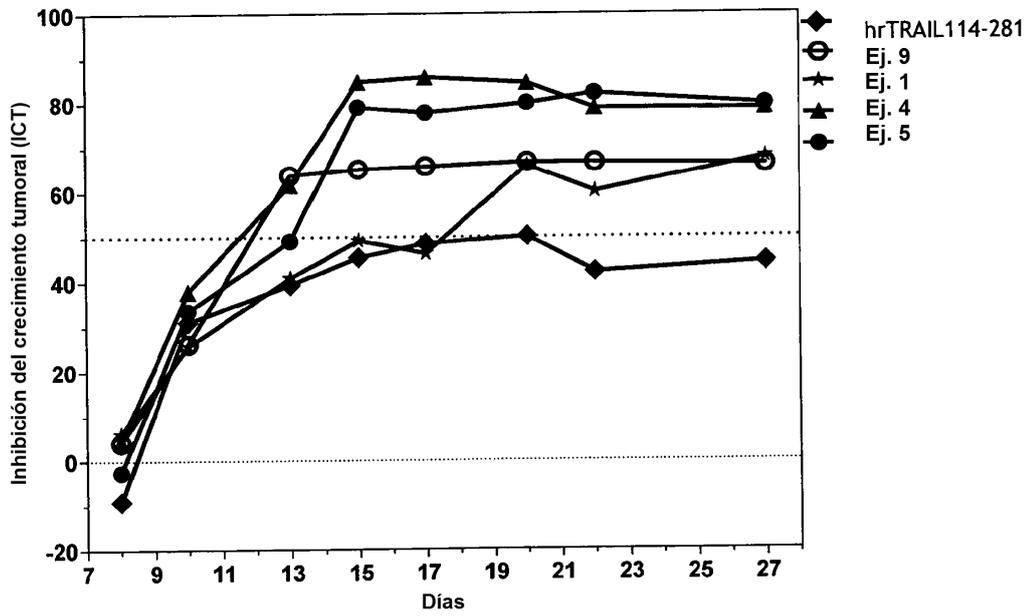


Fig. 11

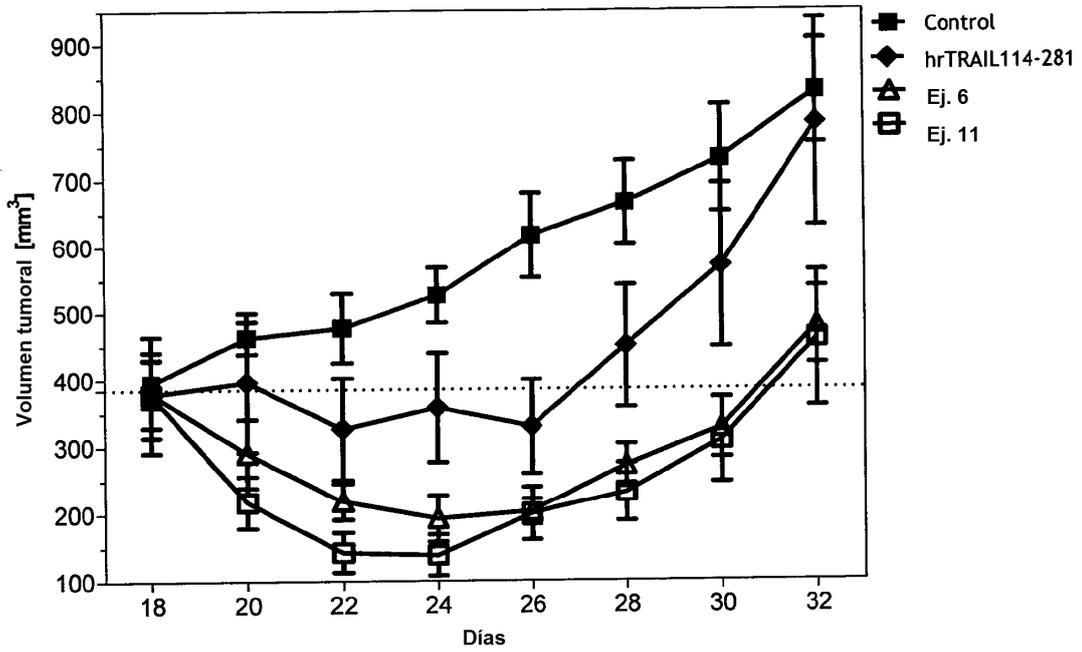


Fig. 12

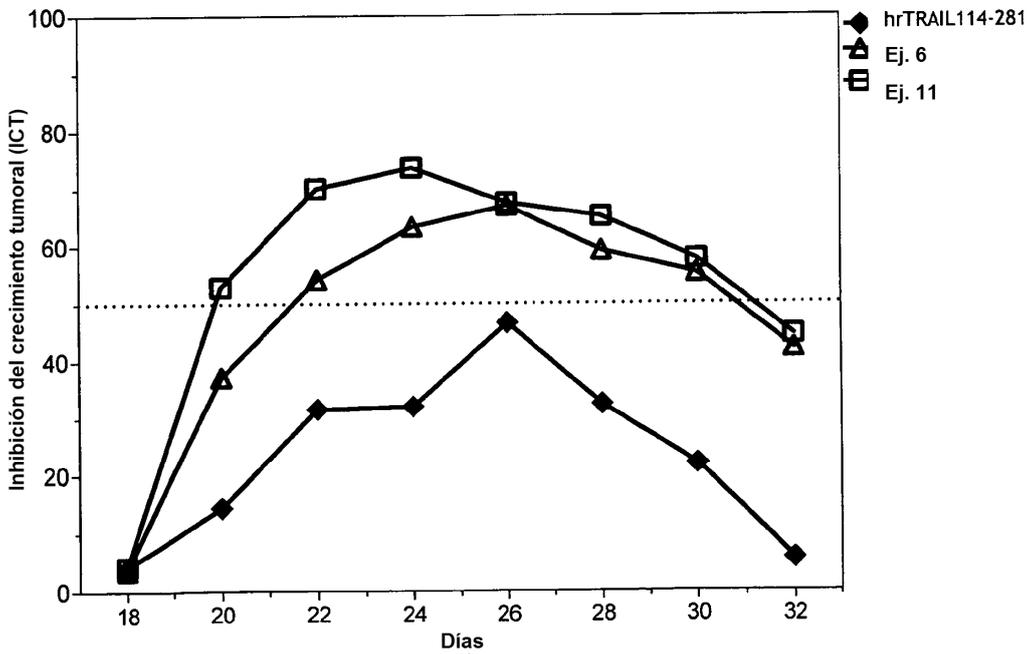


Fig. 13

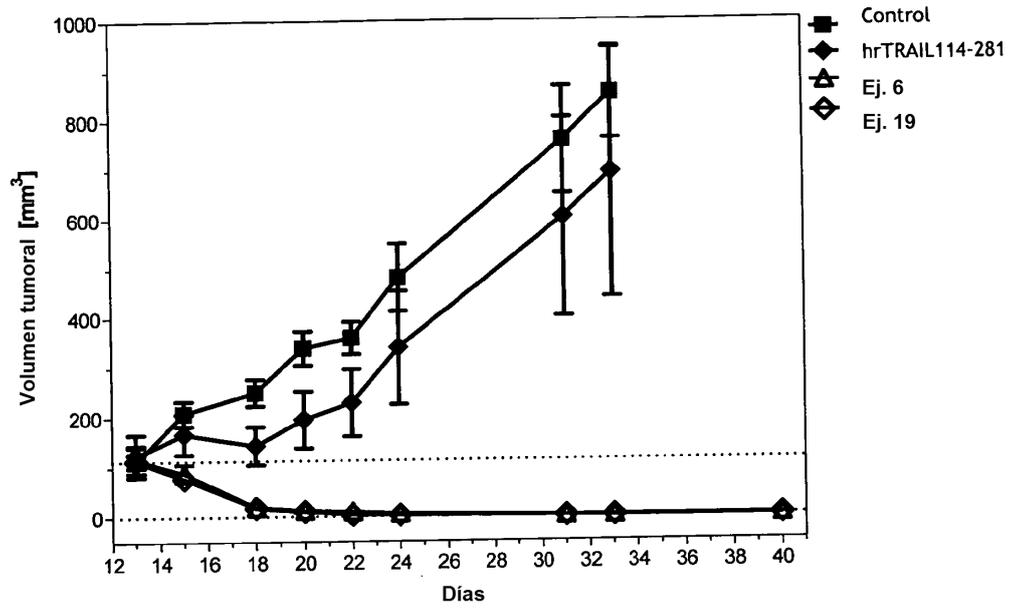


Fig. 14

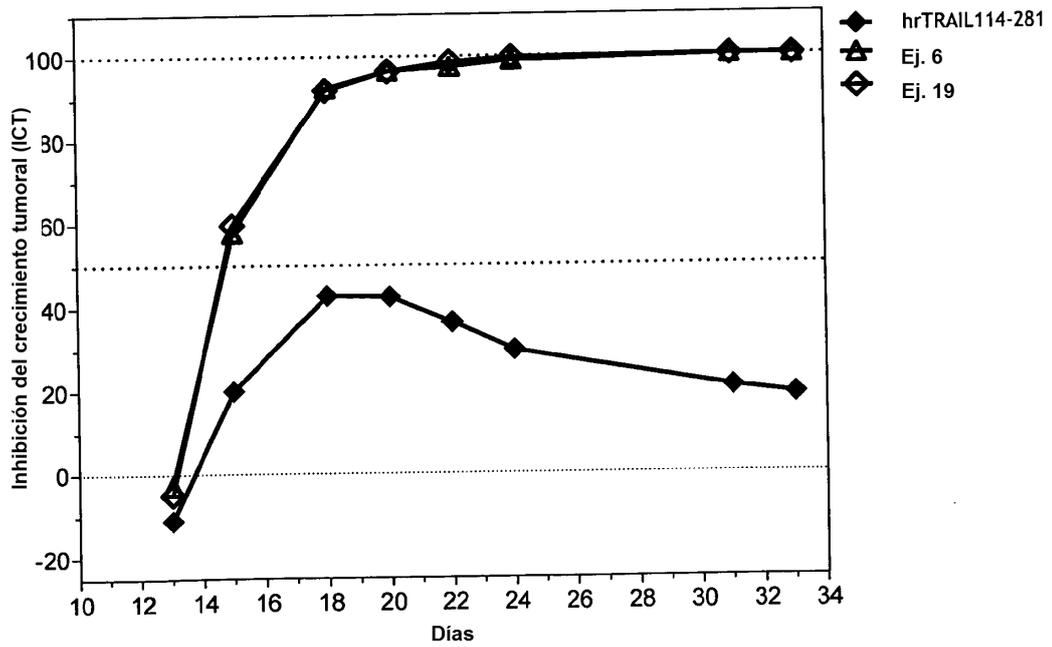


Fig. 15

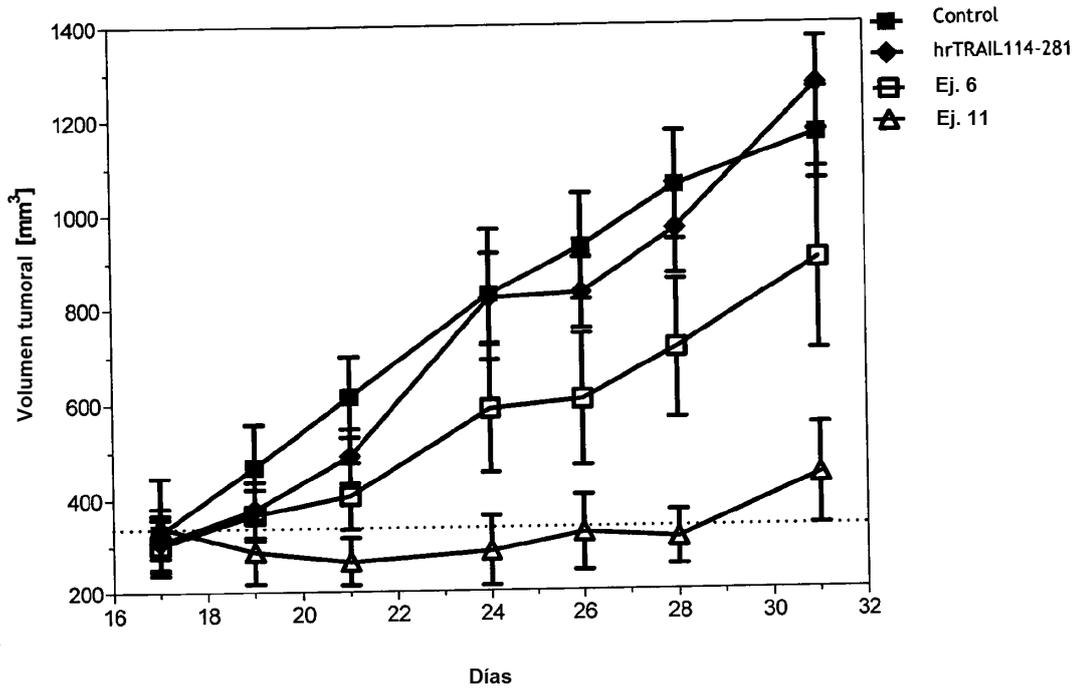


Fig. 16

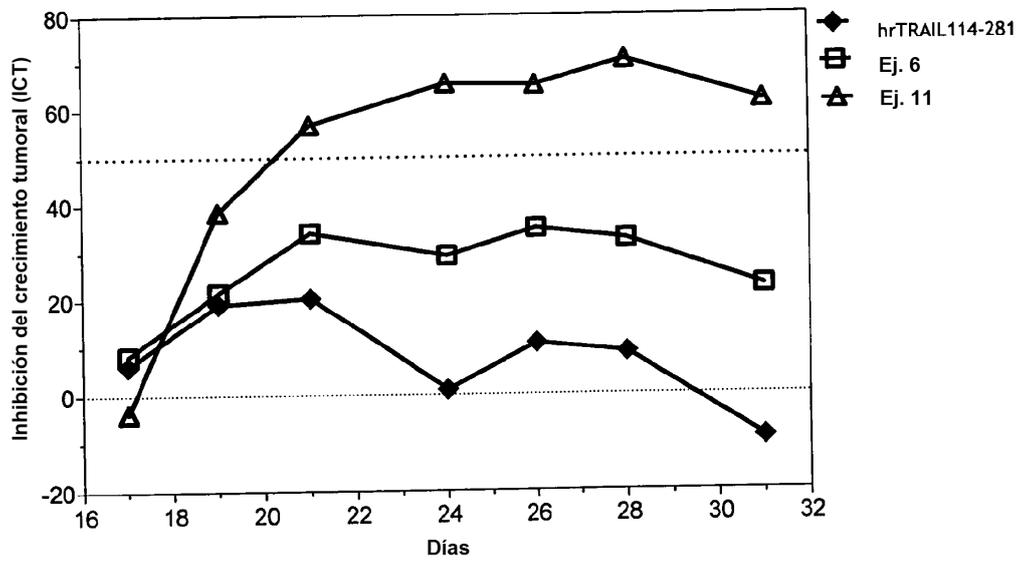


Fig. 17

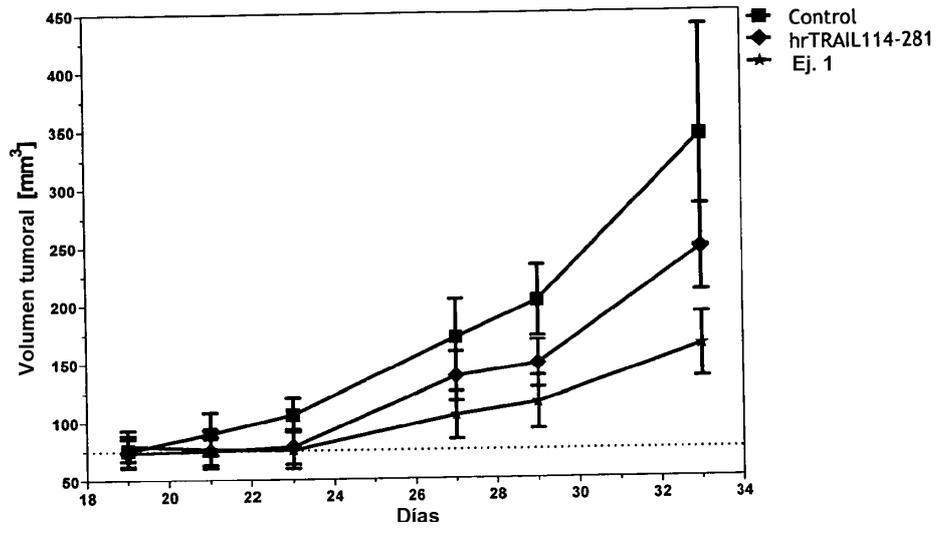


Fig. 18

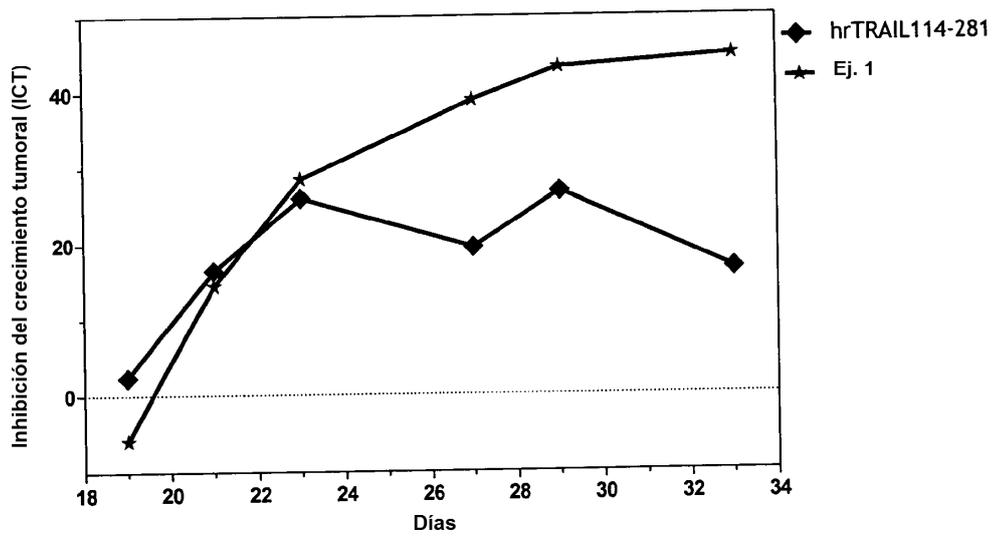


Fig. 19

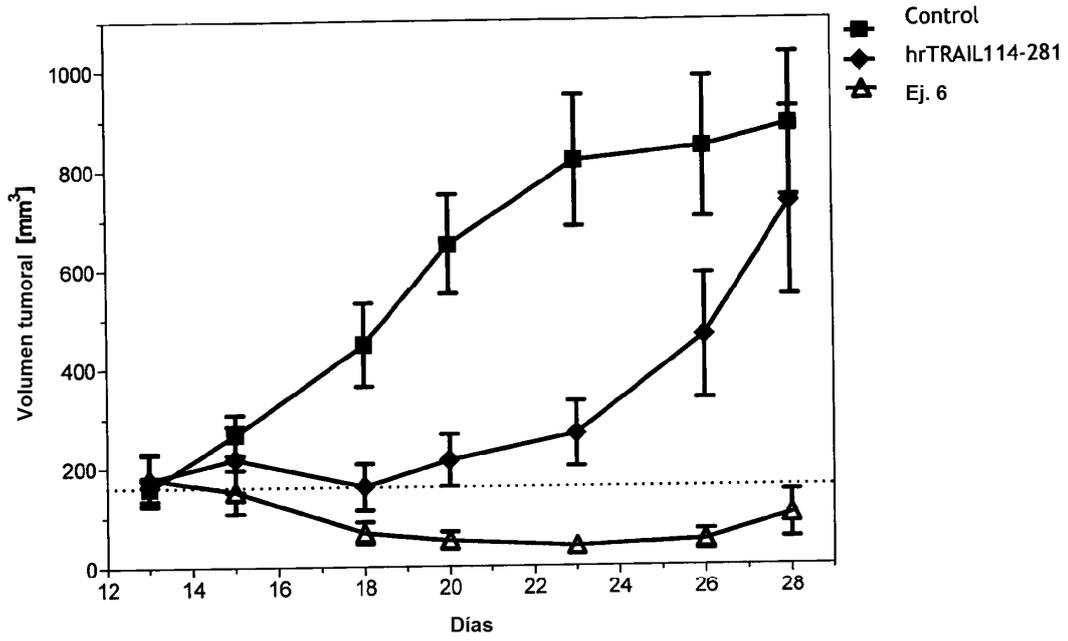


Fig. 20

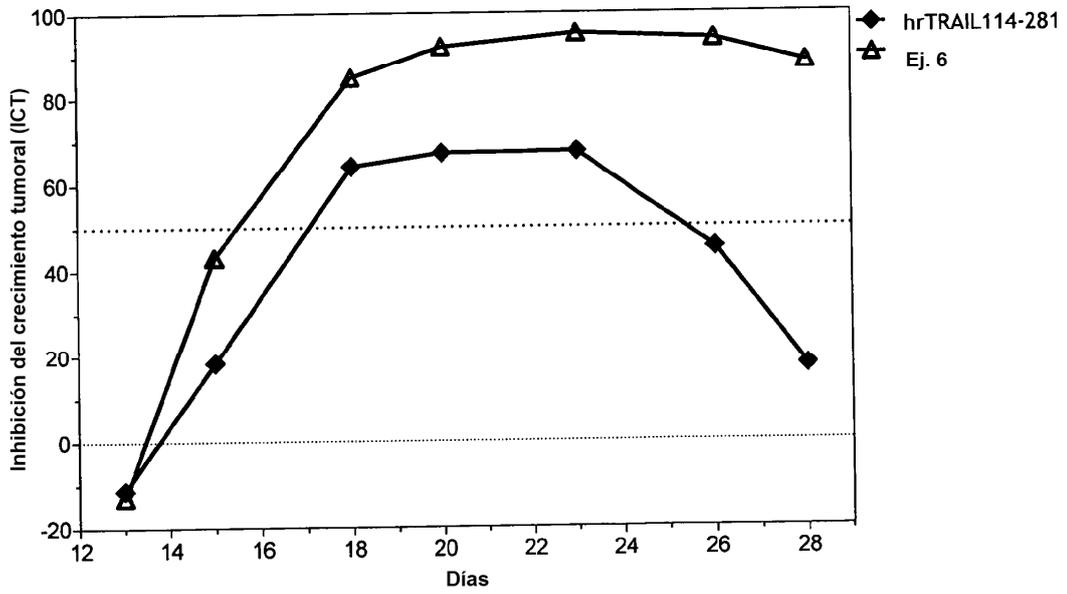


Fig. 21

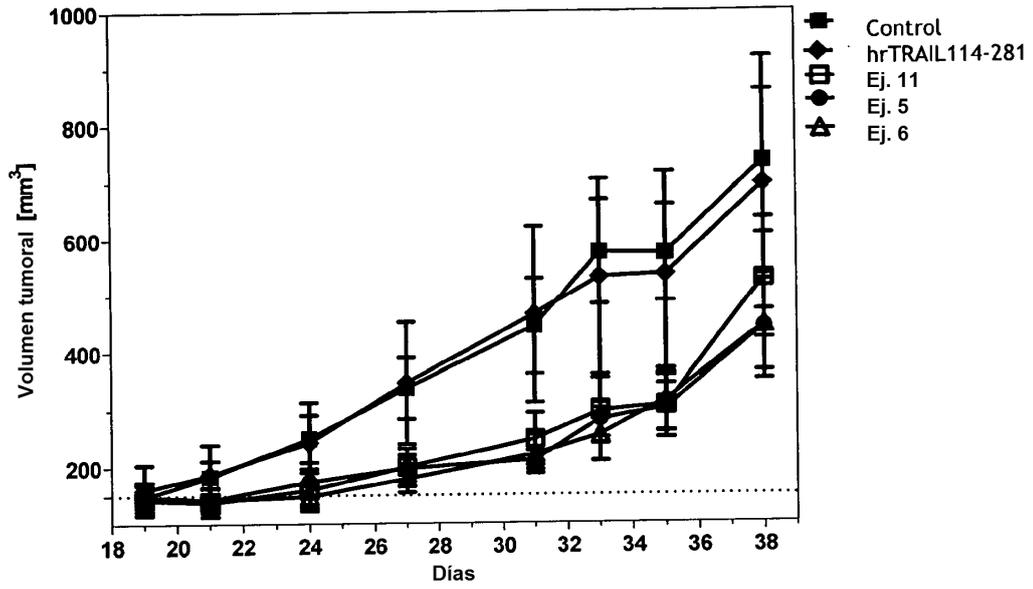


Fig. 22

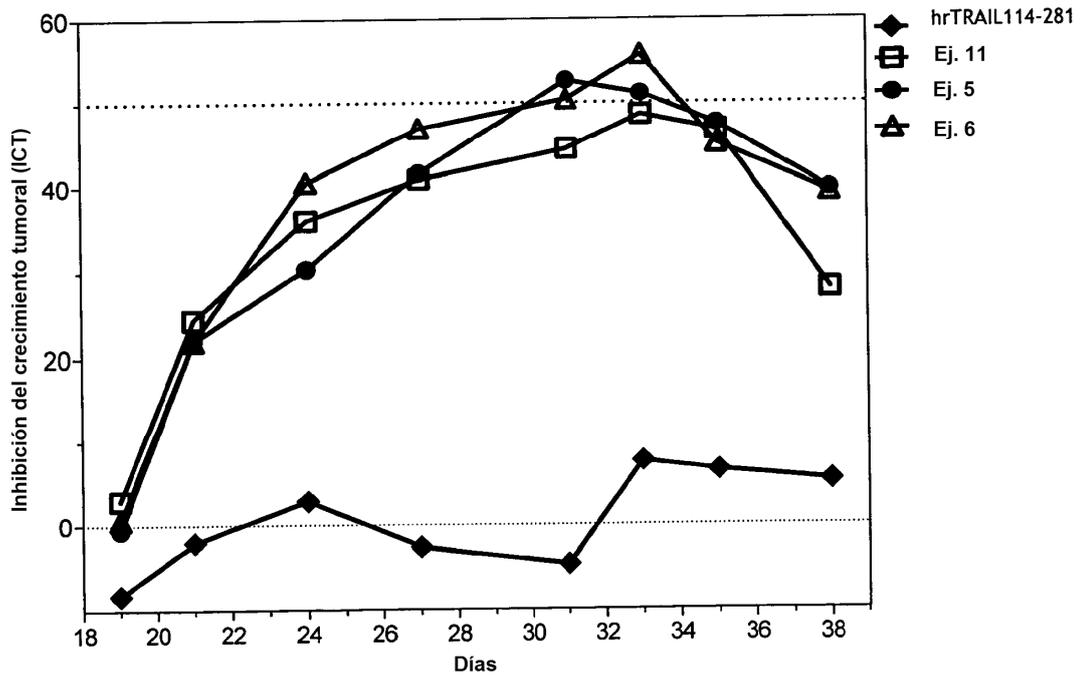


Fig. 23

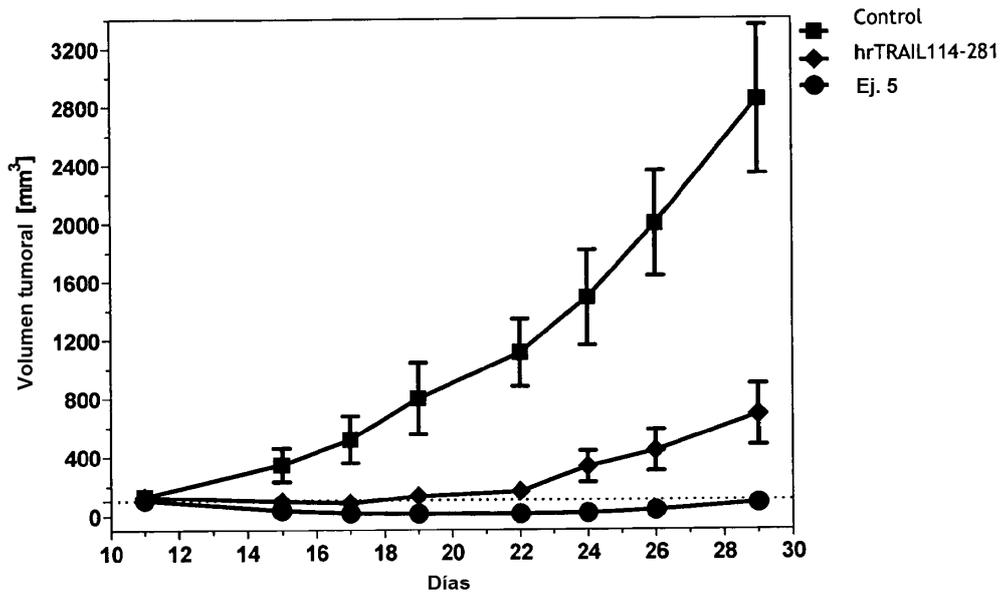


Fig. 24

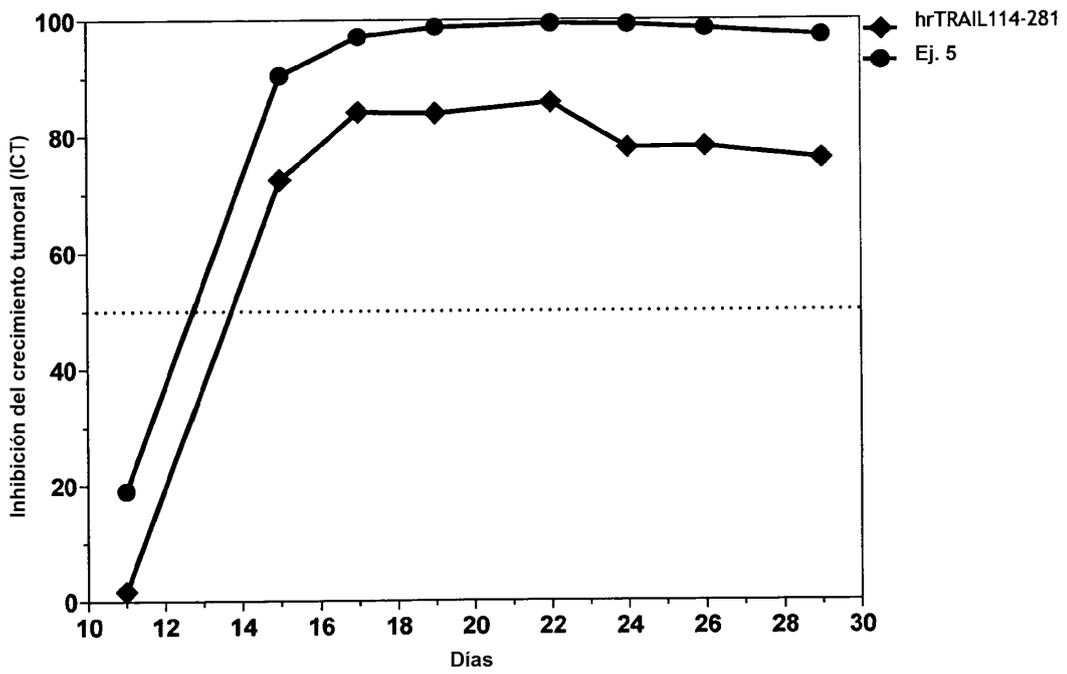


Fig. 25

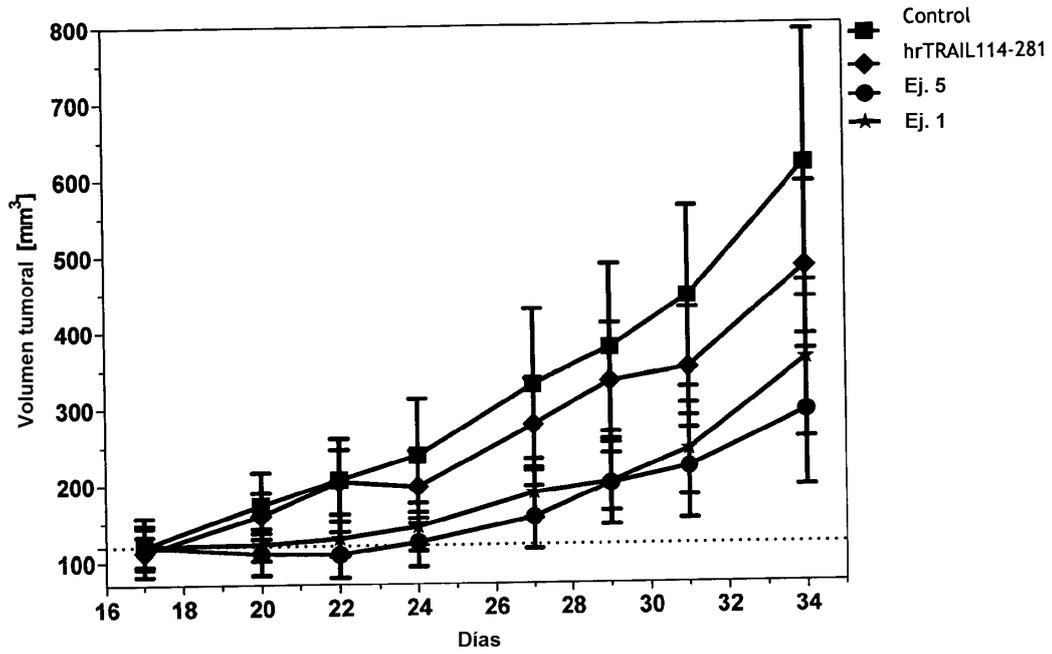


Fig. 26

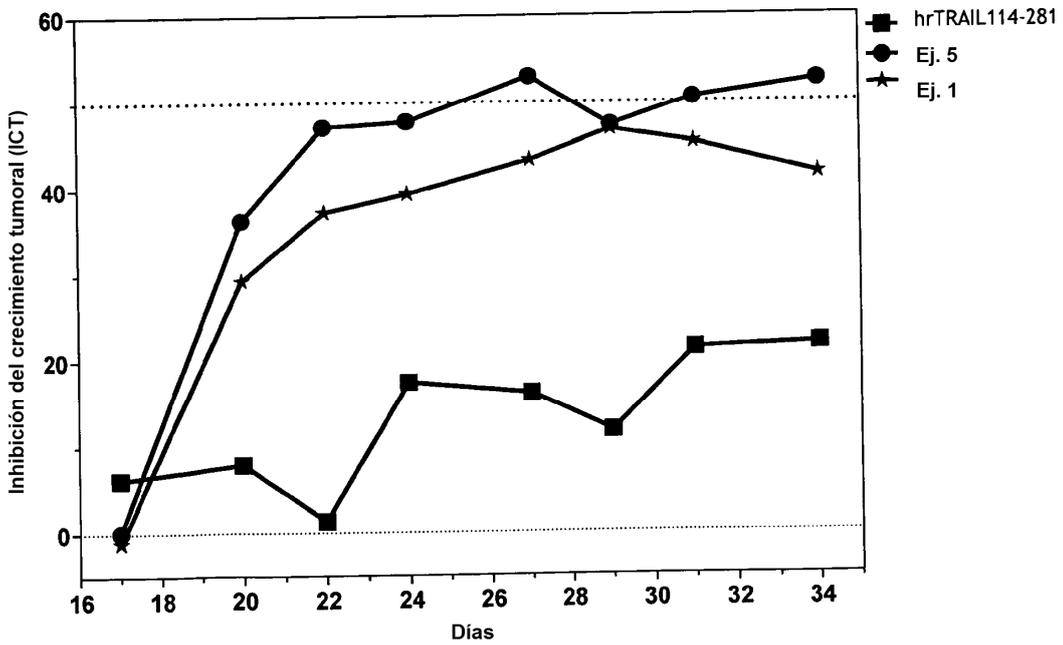


Fig. 27

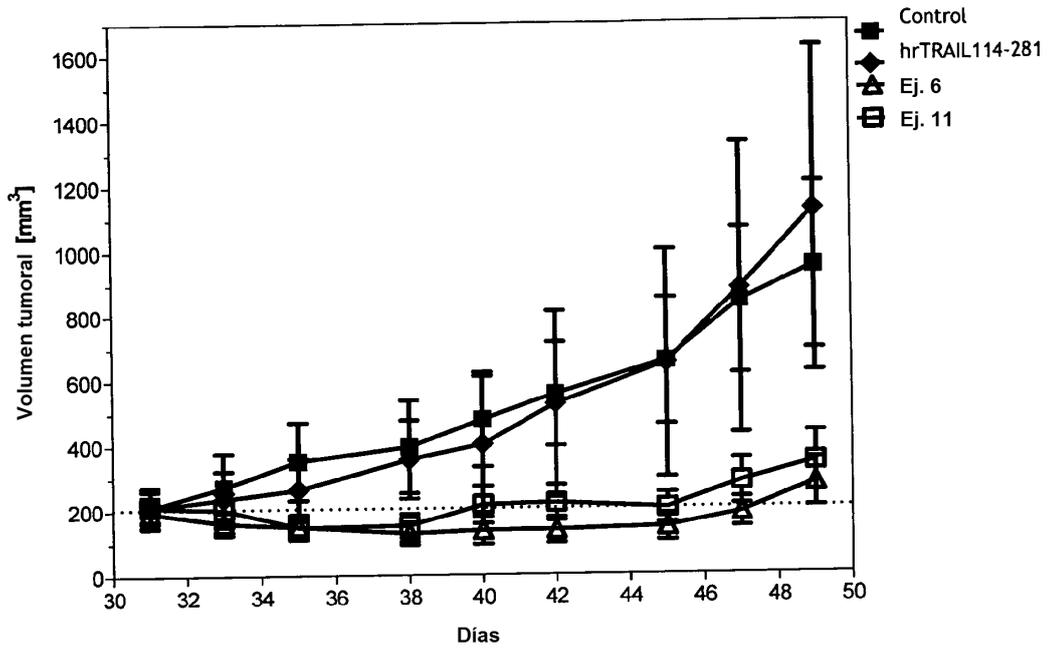


Fig. 28

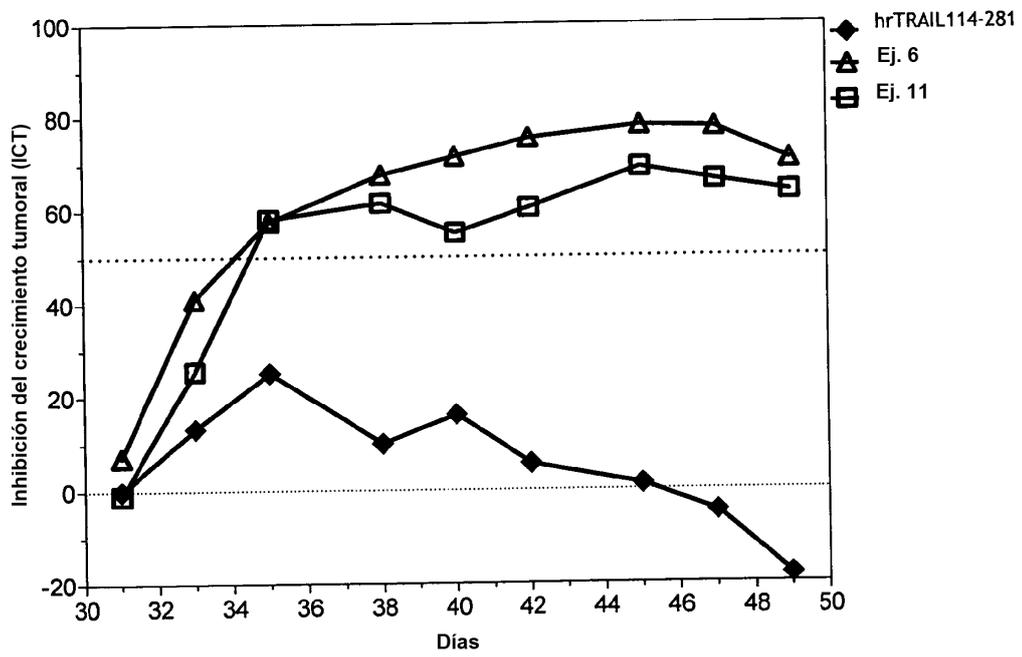


Fig. 29

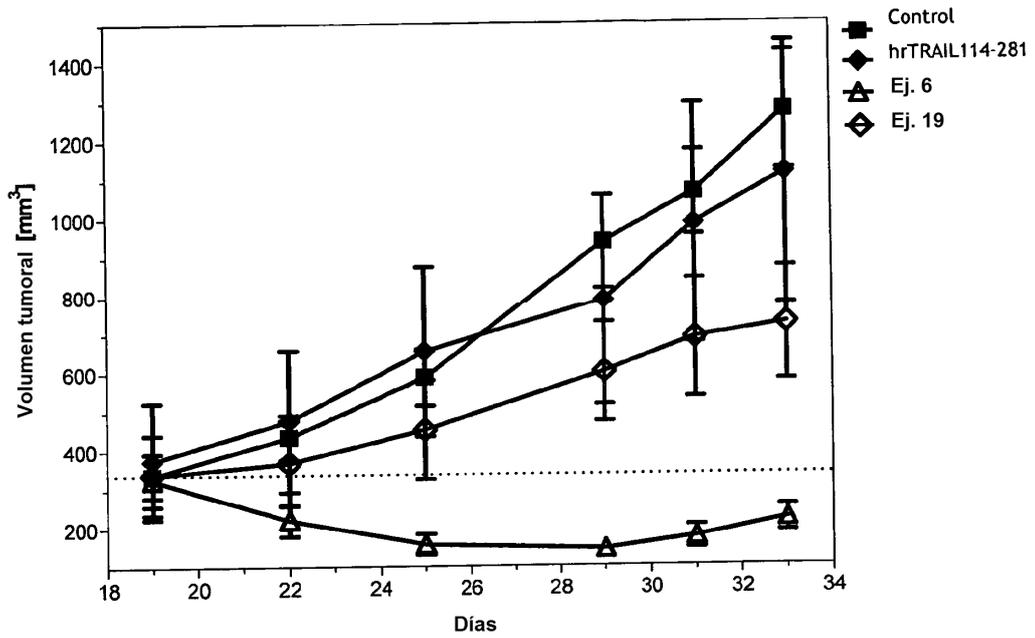


Fig. 30

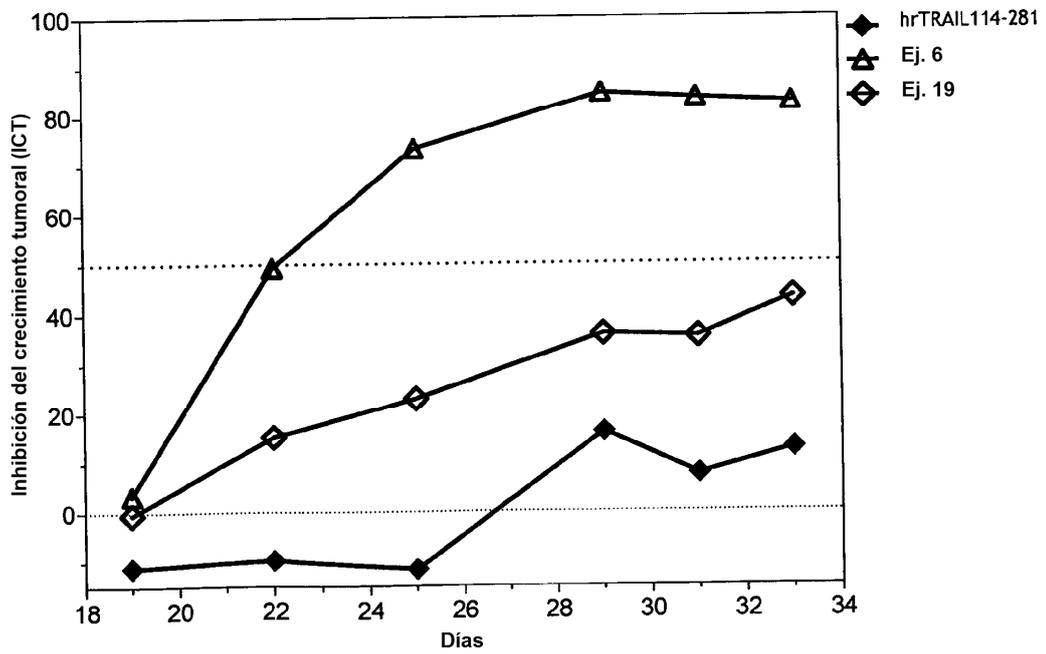


Fig. 31

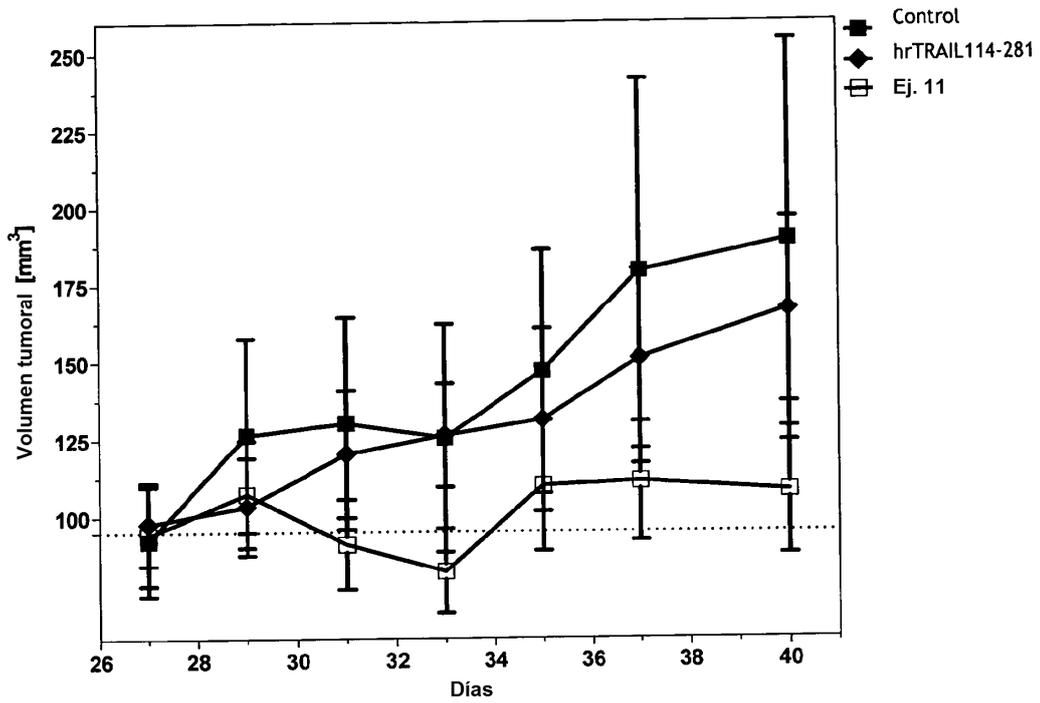


Fig. 32

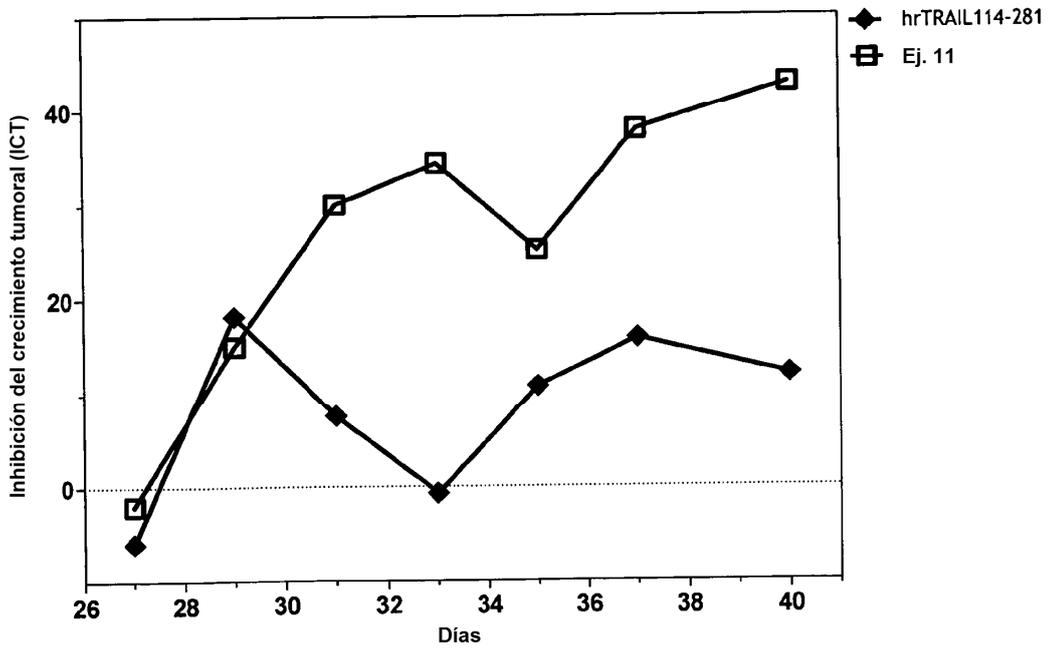


Fig. 33

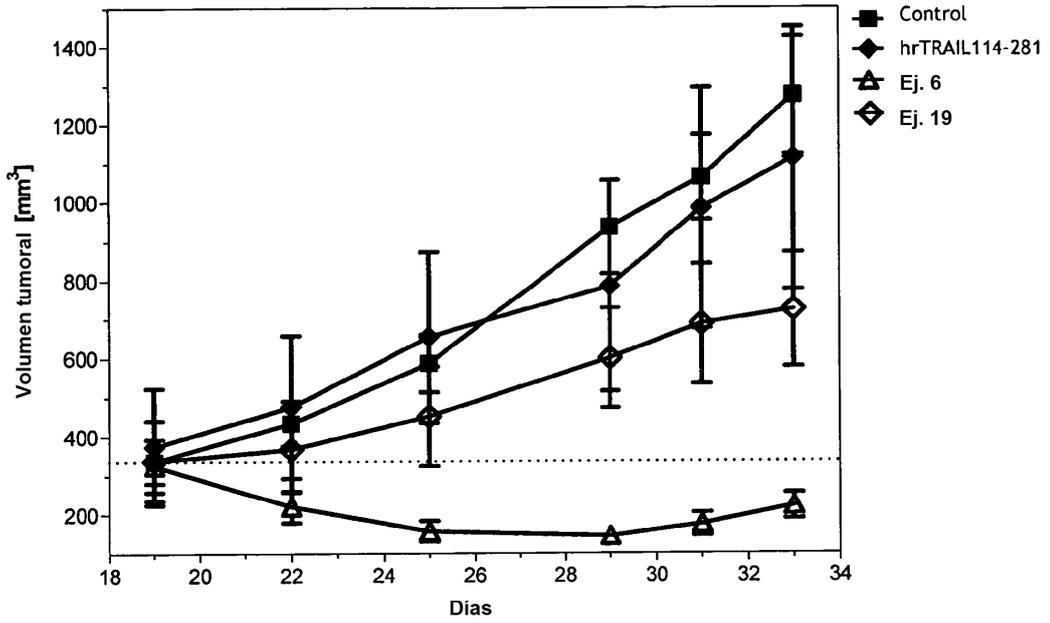


Fig. 34

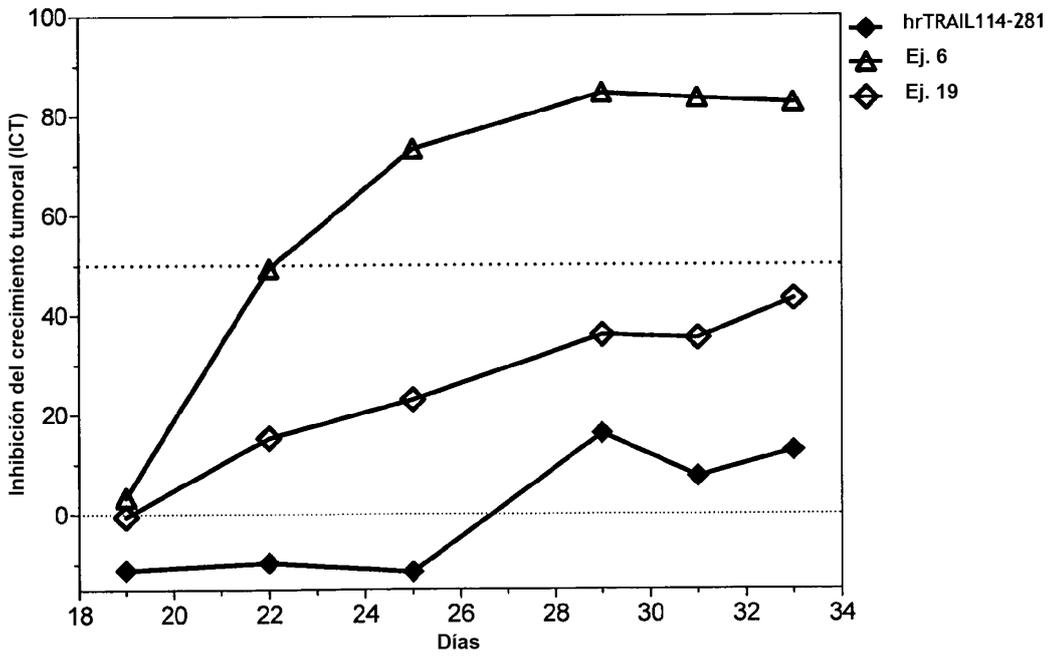


Fig. 35