

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 828**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/525</b>	(2006.01) C12N 9/16	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/005</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/195</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/32</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/435</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/46</b>	(2006.01)	
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)	
<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)	
<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2012 PCT/IB2012/057657**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098755**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2012 E 12824731 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2797950**

54 Título: **Proteína de fusión antineoplásica**

30 Prioridad:

**28.12.2011 PL 39759511**

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

**21.02.2018**

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 2 655 828 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, especialmente proteínas de fusión recombinantes. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden el fragmento de una secuencia de la proteína TRAIL humana soluble y una secuencia de un péptido que forma poros en la membrana celular o mitocondrial, composiciones farmacéuticas que las contienen, y su uso en terapia, especialmente como agentes antineoplásicos.

10 La proteína TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral), un miembro de la familia de las citocinas, 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, secuencia de ADN codificante 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), son miembros de 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 la proteína Bid truncada, que se transloca 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 muestran resistencia 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 cánceres, 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. Ambas formas, TRAIL y 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 preliminares 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. 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.

30 Fragmentos de TRAIL más cortos de 114-281 también son capaces de unirse con los receptores de muerte de membrana e inducir la apoptosis mediante estos receptores, por ejemplo, como se ha informado recientemente en el documento EP 1 688 498 para el mutante circularmente permutado recombinante de 122-281hTRAIL.

35 Sin embargo, en ensayos clínicos adicionales en pacientes, la eficacia real de TRAIL como monoterapia demostró ser baja. También se mostró problemática la resistencia primaria o adquirida a TRAIL por muchas células cancerosas (véase, por ejemplo, el documento WO2007/022214). La resistencia puede ser debida a diversos mecanismos y puede ser específica para un tipo de cáncer y/o dependiente de paciente (Thorburn A, Behbakht K, Ford H. TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. Drug Resist Updat 2008; 11: 17-24). Esta resistencia limita la utilidad de TRAIL como agente antineoplásico. 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.

40 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 describe en el documento WO2009/140469. Sin embargo, una combinación tal necesariamente implica deficiencias muy conocidas de quimioterapia o radioterapia convencionales. El estado de la técnica no dice nada, sin embargo, sobre cualquier dato que sugiera la abolición de la resistencia celular a TRAIL obtenida fusionando la proteína TRAIL con otras proteínas o fragmentos de la misma.

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

5 Se conoce el efecto de la destrucción de células cancerosas y la inhibición de la proliferación tumoral como resultado de la disgregación (discontinuidad) de la membrana celular o membrana mitocondrial. También hay intentos por usar sustancias con efecto citolítico capaces de la disgregación de membranas tanto como una terapia contra el cáncer como una terapia contra el cáncer auxiliar.

10 Se conocen muchos péptidos y proteínas naturales y sintéticos que tienen actividad citolítica. También se describen péptidos citolíticos como péptidos formadores de poros o citolisinas. Las interacciones de péptidos formadores de poros con la superficie de la membrana pueden basarse en interacciones electrostáticas no específicas del péptido positivamente cargado con superficie negativamente cargada de la membrana celular.

15 Estos péptidos son generalmente de carácter catiónico, de manera que son capaces de interacciones electrostáticas con superficies con partículas predominantemente negativamente cargadas. Tras el contacto y la interacción de un péptido citolítico con lípidos sobre la superficie celular, y después de la penetración dentro de la célula con los lípidos sobre la superficie de la membrana mitocondrial, se produce la interrupción de la continuidad de la membrana celular, seguido de la formación de poros transmembranarios de tamaño pequeño, por lo que se produce la fuga del contenido del citoplasma, que incluye iones, fuera de la célula, produciendo el rápido e irreversible desequilibrio de electrolitos en la célula, lisis celular y muerte.

Las interacciones de péptidos formadores de poros con la superficie de la membrana también pueden incluir interacciones con receptores específicos presentes sobre la superficie.

20 Péptidos citolíticos naturales que existen de forma natural de origen bacteriano, de planta o de mamífero capaces de formar poros en la membrana celular se llaman frecuentemente hemolisinas, debido a que producen la lisis de glóbulos rojos y otras células eucariotas. Estas toxinas incluyen cecropina A y B, aureína 1.2, citropina 1.1, defensina (HNP-2), lactoferricina B, taquiplésina, PR-39, citolisinas de *Enterococcus faecalis*, delta hemolisina, toxina diftérica, citolisina de *Vibrio cholerae*, toxina de *Actinia equina*, granulinsina, péptidos líticos de *Streptococcus intermedius*,  
25 péptidos líticos lentivirales, leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, magainina, melitina, linfotoxina, encefalina, paradaxina, perforina (en particular el fragmento del extremo N de la misma), perfringolisina O (PFO/theta-toxina) de *Clostridium perfringens* y estreptolisinas. Su utilidad como medicamentos está limitada por su capacidad para producir hemólisis.

30 Se describen péptidos citolíticos naturales, por ejemplo, en R. Smolarczyk et al., Postępy Hig. Med. Dosw., 2009; 63: 360-368

También se conocen péptidos formadores de poros citolíticos sintéticos. Se diseñan para carecer de propiedades hemolíticas, para ser menos inmunogénicos, o para tener superficies que permiten la alta especificidad de unión a dianas celulares tales como, por ejemplo, receptores de la familia de VEGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular) y los receptores de la familia de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Son  
35 frecuentemente híbridos de fragmentos de péptidos citolíticos naturales, tales como un híbrido de fragmento de cecropina A y fragmento de magainina 2 CA (1-8) MA (1-12) o un híbrido de fragmento de cecropina A y fragmento de melitina CAMEL (CA (1-7) MEL (2-9)). También se conocen péptidos citolíticos sintéticos D-K<sub>4</sub>-L<sub>2</sub>-R<sub>9</sub> y D-K<sub>6</sub>-L<sub>9</sub>, que consisten en los aminoácidos lisina, arginina y leucina, parte de los cuales están en forma de D-aminoácidos. También se conocen péptidos quiméricos sintéticos RGD-4C<sub>D</sub>(KLAKLAK)<sub>2</sub>, que contienen el motivo RGD que se une  
40 con integrina  $\alpha\beta_3$  y un dominio efector compuesto de los D-aminoácidos KLAKLAKKLAKLAK, y PTD-5<sub>D</sub>(KLAKLAK)<sub>2</sub> que contienen el motivo PTD-5 que permite la penetración en las células y un dominio efector compuesto de los D-aminoácidos KLAKLAKKLAKLAK (véase, por ejemplo, R. Smolarczyk et al., Postępy Hig. Med. Dosw., 2009, 63: 360-368). Otros péptidos sintéticos citolíticos muy conocidos se describen, por ejemplo, en Regen et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159: 566-571, 1989.

45 La destrucción de la membrana que se produce después de adherir el péptido a la membrana puede producirse por el mecanismo de "duelas de barril" (modelo de duelas de barril), el mecanismo de una "forma similar a donut" (modelo de poro toroide) o un mecanismo de "alfombra" (véase, por ejemplo, R. Smolarczyk et al., Postępy Hig. Med. Dosw., 2009; 63: 360-368).

50 El mecanismo de "duelas de barril" se observa para péptidos anfipáticos con conformación alfa-helicoidal que tienen una longitud de al menos 23 aminoácidos. Por ejemplo, péptidos que producen la destrucción de la membrana por el mecanismo de "duelas de barril" son gramicidina A, alameticina, perforina, pilosulina, péptidos sintéticos con motivos KLAK repetidos, catelicidina, péptidos aislados de *Entamoeba histolytica*, paraesporinas y cecropinas. Péptidos, que producen la destrucción de la membrana por el "modelo de poros toroidales", incluyen, por ejemplo, melitina y magainina. Por ejemplo, péptidos que producen la destrucción de la membrana por el modelo de "alfombra" son las  
55 cecropinas A y B.

La disgregación de la membrana celular con formación de poros también puede producirse por la interacción de péptidos de una alta carga positiva con componentes de membrana negativamente cargados. Tales propiedades

muestran, entre otras, granulinas, análogos y derivados de melitina, péptidos que comprenden el motivo K(L)xR, taquipesina, bombesina, magainina y viscotoxina.

- 5 La formación de poros en la membrana de la célula diana también puede asociarse a actividad enzimática de péptidos. La actividad enzimática de fosfolipasa A se muestra, por ejemplo, por fosfolipasas con actividad de fosfodiesterasa específica contra fosfatidilcolina y esfingomiélin, hemolisinas y citolisinas que tienen actividad citolítica no específica, o hemolisinas y citolisinas que tienen actividad citolítica contra membranas biológicas que contienen, por ejemplo, colesterol. Este tipo de actividad enzimática que produce la formación de poros en la célula o membrana mitocondrial se presenta por listeriolisina, equinatoxina, fosfolipasa PC-PLC y alfa-toxina de *Clostridium perfringens*.
- 10 También se conocen conjugados y quimeras de péptidos formadores de poros con dominios capaces de dirigirse a células tumorales. Para el direccionamiento, se usan antígenos, restos de hidrato de carbono o receptores de factores de crecimiento, expresados en exceso sobre la superficie de células tumorales. La administración elegida como diana proporciona altos niveles de péptido formador de poros sobre la superficie celular que es necesaria para la actividad citolítica.
- 15 El uso de actinoporinas formadoras de poros elegidas como diana se describe en Panchal RG. et al., Poreforming proteins and their application in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 2002, 3:99-115; Panchal RG: Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1998, 55:247-252 y en Hoskin DW, Ramamoorthy A: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* 2008, 1778:357-87.
- 20 También se sabe que los péptidos y proteínas formadores de poros pueden ser dotados de la capacidad de dirigirse a los antígenos asociados a tumor y receptores por medio de modificación genética apropiada, además de por unión química a los ligandos o anticuerpos adecuados. Tales modificaciones se describen para d-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, equinatoxina II de *Actinia equina*, esticolisina I de *Stichodactyla helianthus* y toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (Soletti RC., Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 2008, 19:517-525; Pederzoli C., Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin-II, a cytolysin from a sea anemone. *Bioconjugate Chem* 1995, 6:166-173, van der Spek JC.: Fusion protein toxins based on diphtheria toxin: Selective targeting of growth factor receptors of eukaryotic cells. *Appl Chimeric Genes Hybrid Proteins Pt B* 2000, 327:239-249).
- 25 También se describe una proteína de fusión que consiste en la toxina I de esticolisina formadora de poros y un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno específico de tumor C2, y su utilidad en el tratamiento en un modelo de línea de células de cáncer de colon (Tejuca M. et al., Construction of an immunotoxin with the pore forming protein St1 and/or C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line, *Int. Immunopharmacol.* 2004, 4:731-744). También se describen varias proteínas de fusión que comprenden toxina diftérica e interleucina-2 o EGF, y su potencial para destruir la célula que expresa en exceso los receptores diana (Murphy JR, van der Spek JC, Targeting diphtheria-toxin to growth-factor receptors, *Semin Cancer Biol* 1995, 6:259-267).
- 30 También se conoce el uso de sitios de escisión reconocidos por proteasas específicas en moléculas de proteínas de fusión que comprenden péptidos citolíticos con el fin de permitir la liberación de proteínas efectoras en el entorno tumoral y, por consiguiente, su internalización en células tumorales. Por ejemplo, Panchal R. et al. (*Nat Biotechnol* 1996, 14:852-856) desvelaron alfa-hemolisinas que comprenden en su secuencia un sitio de escisión reconocido por catepsina B, que se activa por una proteasa presente en el entorno tumoral.
- 35 También se conocen proaerolisinas (PA) modificadas, precursores inactivos de proteínas formadoras de poros citolíticas bacterianas, activadas cuando son escindidas por proteasa de células de cáncer de próstata (PSA) (Williams S.A. et al., *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* (2007) 99 (5): 376-385).
- 40 El documento US5817771B1 desvela conjugados, que incluyen proteínas de fusión, de péptidos citolíticos formadores de poros con un anticuerpo o antígeno como elemento que se une selectivamente sobre una célula tumoral, y conectores que permiten la activación selectiva del péptido citolítico en el entorno tumoral tal como, por ejemplo, sitio de escisión reconocido por enzimas tales como proteasas, en particular proteasas expresadas en exceso específicamente en el entorno tumoral.
- 45 Barua et al. (*Cancer Letters* 293 (2010) 240-253) informaron que las líneas de células de cáncer de próstata resistentes a TRAIL e insensibles al tratamiento con los anticuerpos agonistas del receptor de muerte DR4 y DR5 llegan a ser sensibles a estos anticuerpos después del pretratamiento de estas células con péptido lítico anfipático catiónico sintético KLA que contiene secuencias KLA.
- 50 La presente invención proporciona proteínas de fusión con propiedades contra el cáncer, que contienen un dominio derivado de TRAIL y un dominio de un péptido efector citolítico con propiedades formadoras de poros contra membranas celulares y/o mitocondriales de células de mamífero.
- 55

Cada uno de los dos dominios de la proteína de la invención tiene diferentes funciones. Debido a la presencia de un dominio derivado de hTRAIL, las proteínas según la invención se dirigen selectivamente a células cancerosas, en las

que los elementos de la proteína ejercen sus efectos. En particular, el dominio TRAIL después de la unión con una célula puede ejercer su actividad de desencadenar la apoptosis, y el péptido efector la actividad de formar poros en membrana celular y/o mitocondrial y causar la lisis de la célula cancerosa.

5 La administración de la proteína de la invención en el entorno tumoral permite minimizar la toxicidad y los efectos secundarios contra células sanas en el cuerpo, además de la reducción de la frecuencia de administración de un medicamento. Además, la terapia dirigida con el uso de proteínas según la invención permite evitar el problema de la baja eficiencia de terapias no específicas previamente conocidas basadas en la formación de poros en la membrana celular o mitocondrial con el uso de toxinas de planta o bacterianas, causado por la alta toxicidad y por la necesidad de administrar altas dosis.

10 Resultó que en muchos casos las proteínas de fusión de la invención son más potentes que hTRAIL soluble y sus variantes que incluyen el fragmento de una secuencia.

15 Hasta ahora, los péptidos efectores usados en la proteína de fusión de la invención no han sido usados en medicina como tales debido a la cinética desfavorable, rápida degradación por proteasas no específicas y acumulación en el cuerpo producida por la falta de una secuencia apropiada de activación de vías, que es necesaria 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, que produce semivida prolongada y elevada retención de la proteína en el tumor y su eficiencia potenciada.

20 Proteínas de fusión novedosas también tienen al menos actividad hemolítica reducida o limitada, o incluso sustancialmente eliminada, en comparación con sus péptidos citolíticos naturales individuales.

25 Adicionalmente, en muchos casos, las proteínas de fusión novedosas también vencen la resistencia natural o inducida a TRAIL. Lo más probablemente, el vencer la resistencia es debido a la desestabilización del potencial de membrana celular como resultado de las proteínas de fusión que se unen a lípidos de la membrana celular o mitocondrial y la formación de poros, que produce la fuga de iones divalentes fuera de la célula. Como consecuencia de la unión a los lípidos de la membrana mitocondrial, se produce la liberación de citocromo C, proteína SMAC/Diablo y factor AIF en el citoplasma, que produce la activación de caspasa proapoptósica en la célula afectada. La degradación de las membranas mitocondriales conduce también a la activación de caspasa-9, que produce la inducción de apoptosis.

#### Descripción de las figuras

30 La Fig. 1 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

35 la Fig. 2 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 la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

la Fig. 3 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

40 la Fig. 4 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de pulmón A549 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

la Fig. 5 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr nu afectados con cáncer de pulmón NCI-H460-Luc2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

45 la Fig. 6 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de pulmón NCI-H460-Luc2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

50 la Fig. 7 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de próstata PC3 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

la Fig. 8 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J afectados con cáncer de próstata PC3 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;

- la Fig. 9 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de páncreas PANC-1 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 5 la Fig. 10 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de páncreas PANC-1 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 11 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 10 la Fig. 12 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 13 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon SW620 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 15 la Fig. 14 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon SW620 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 15 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon Colo205 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 20 la Fig. 16 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon Colo205 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 25 la Fig. 17 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con sarcoma uterino MES-SA/Dx5 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 18 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con sarcoma uterino MES-SA/Dx5 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 30 la Fig. 19 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con carcinoma pancreático MIA Paca-2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 20 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con carcinoma pancreático MIA Paca-2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 35 la Fig. 21 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 40 la Fig. 22 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- la Fig. 23 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con carcinoma hepatocelular HepG2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 45 la Fig. 24 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con carcinoma hepatocelular HepG2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281;
- 50 la Fig. 25 presenta los cambios de volumen del tumor (% del estadio inicial) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con hepatoma PLC/PRF/5 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281; y

la Fig. 26 presenta la inhibición del crecimiento tumoral valores (% de ICT) en ratones Crl:SHO-PrkdcscidHrhr afectados con hepatoma PLC/PRF/5 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> en comparación con rhTRAIL114-281.

Descripción detallada de la invención

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

- dominio (a) que es un fragmento funcional de la secuencia de proteína hTRAIL soluble, siendo dicha secuencia de proteína hTRAIL presentada como SEQ. No. 90, fragmento que empieza con un aminoácido en una posición del intervalo hTRAIL95 a hTRAIL121, ambos incluidos, y termina con el aminoácido hTRAIL281 o un homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, preferentemente el 85 % de identidad, en el que dicho fragmento funcional u homólogo del mismo es capaz de inducir la señal apoptósica en células de mamífero tras la unión a sus receptores sobre la superficie de las células, y
- al menos un dominio (b) que es la secuencia de un péptido efector citolítico con una conformación de hélice alfa antipática que forma poros en la membrana celular,

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

15 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.

20 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.

El término "un fragmento soluble funcional de la secuencia de la proteína hTRAIL soluble" debe entenderse como que indica cualquiera de tal fragmento de la proteína 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.

25 También se apreciará por un experto que se conoce en la técnica la existencia de al menos el 70 % o el 85 % 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.

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

Por hTRAIL de secuencia se entiende la secuencia de hTRAIL conocida publicada en la base de datos GenBank con el número de acceso P505591, además de en el documento EP0835305A1 y presentada en el Listado de secuencias de la presente invención como SEQ. No. 90.

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

40 En particular, el dominio (a) puede seleccionarse del grupo que consiste en secuencias correspondientes a hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL115-281, hTRAIL119-281 y hTRAIL121-281. Será evidente para aquellos expertos en la materia que hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL115-281, hTRAIL116-281, hTRAIL119-281 y hTRAIL121-281 representan un fragmento de proteína TRAIL humana que empieza con el aminoácido indicado con el número 95, 114, 115, 116, 119 y 121, respectivamente, y que termina con el último aminoácido 281, en la secuencia conocida de hTRAIL.

En otra realización particular, el dominio (a) es el homólogo de un fragmento funcional de la secuencia de proteína TRAIL 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.

45 En variantes específicas de esta realización, el dominio (a) es el homólogo de un fragmento seleccionado del grupo que consiste en secuencias correspondientes a hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL115-281, hTRAIL116-281, hTRAIL119-281 y hTRAIL121-281.

50 Debe entenderse que el homólogo de un fragmento de TRAIL 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 el fragmento de una secuencia modificada ha preservado la funcionalidad de la secuencia de TRAIL, es decir, la capacidad de unirse a receptores de muerte de la superficie celular e inducir la apoptosis en células de

mamífero. La modificación de la secuencia de aminoácidos puede incluir, por ejemplo, sustitución, delección y/o adición de aminoácidos.

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

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

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

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

También preferentemente, el homólogo de un fragmento de TRAIL 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).

15 Las modificaciones de TRAIL 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, 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, describen la mutación D218H que tiene elevada selectividad hacia DR4, y 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 afinidad reducida 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.

25 Mutaciones adecuadas son una o más mutaciones en las posiciones de hTRAIL nativo seleccionadas del grupo que consiste en los aminoácidos 131, 149, 159, 193, 199, 201, 204, 204, 212, 215, 218 y 251, en particular, mutaciones que implican la sustitución de un aminoácido con un aminoácido básico tal como lisina, histidina o arginina, o un aminoácido ácido tal como ácido glutámico o ácido asparagínico. En particular, pueden mencionarse 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.

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

40 En una realización particular, el dominio (a) que es el homólogo de un 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 et al. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, *Apoptosis.* 2009 Jun;14(6):778-87.

El dominio (a), es decir, el fragmento de TRAIL, es un dominio responsable de la unión de la construcción de la proteína de fusión a receptores de muerte sobre la superficie de una célula. Además, el dominio (a) tras la unión ejercerá su actividad agonista conocida, es decir, la activación de la vía extrínseca de la apoptosis.

45 El dominio (b) de la proteína de fusión de la invención es el dominio de un péptido efector con actividad citolítica contra la célula eucariota.

En realizaciones particulares de la proteína de fusión de la invención, el péptido efector de dominio (b) de la proteína de fusión es un péptido que tiene actividad formadora de poros contra células cancerosas, seleccionado del grupo que consiste en SEQ. No. 34 a SEQ. No. 56, y SEQ. No. 125 a SEQ. No. 132.

50 Para el péptido con actividad citolítica se indica un péptido que tiene la capacidad de formar poros en la membrana celular, y después de la penetración en la célula, también en la membrana mitocondrial, rompiendo así la continuidad de la membrana. Como resultado de la rotura de la membrana, se produce una fuga del contenido del citoplasma, que incluye iones, fuera de la célula, que producen el rápido e irreversible desequilibrio de electrolitos en la célula, y su destrucción (lisis celular).

La capacidad de un péptido para formar poros en la membrana celular o mitocondrial y así producir la lisis celular puede ser determinada por un método de prueba de la permeabilización de membranas celulares conocido para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, midiendo la liberación de la célula de sustancias intracelulares que previamente han sido aplicadas a la célula, por ejemplo de ATP o marcador radiomarcado, o midiendo la captación de un colorante, tal como azul de tripano, que no se produce cuando las células están intactas.

El péptido efector citolítico de la invención puede ser cualquiera de un péptido natural o un péptido sintético.

El péptido efector de dominio (b) de la proteína de fusión de la invención es un péptido formador de poros que posee conformación de hélices alfa anfipáticas que permite interacciones con membranas biológicas.

Secuencias a modo de ejemplo del péptido efector en esta realización se designan SEQ. No. 36 (pilosulina-1), SEQ. No. 37 (pilosulina-5), SEQ. No. 41 (péptido lítico sintético de 14 aminoácidos), SEQ. No. 43 (péptido de 27 aminoácidos FF/CAP-18), SEQ. No. 44 (péptido BAMP-28), SEQ. No. 45 (el análogo de la isoforma C del péptido lítico de *Entamoeba histolytica*), SEQ. No. 46 (el análogo de la isoforma A del péptido lítico de *Entamoeba histolytica*), SEQ. No. 47 (el análogo de la isoforma B del péptido lítico de *Entamoeba histolytica*), SEQ. No. 48 (el fragmento del dominio HA2 de hemaglutinina del virus de la gripe), SEQ. No. 54 (el fragmento activo de perforina humana), SEQ. No. 55 (parasporina-2 de *Bacillus thuringiensis*), SEQ. No. 125 péptido de fusión sintético con motivo KLLK, SEQ. No. 126, y SEQ. No. 127 (análogos de pleurocidina), SEQ. No. 128 péptido sintético con motivo KLLK.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota puede ser un péptido pilosulina-1, que es una molécula catiónica derivada del veneno de la hormiga australiana *Myrmecia pilosula*. La pilosulina 1 es un péptido con alto contenido de lisina y arginina regularmente repetidas en una secuencia. Debido al alto contenido de estos aminoácidos, el péptido tiene una fuerte carga positiva que permite su interacción selectiva con membranas de células cancerosas y la formación de poros mediante el mecanismo de "duelas de barril" (Kourie et al., Am J Physiol Cell Physiol, 278: 1063 - 1087, 2000).

En particular, un péptido efector tal es un péptido de 56 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 36.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra la célula eucariota puede ser el péptido pilosulina-5, responsable de las interacciones iónicas con la membrana celular produciendo la formación de poros, y como consecuencia, la inhibición del crecimiento tumoral. La pilosulina 5 es el péptido que pertenece a la familia de pilosulinas derivada del veneno de la hormiga australiana *Myrmecia pilosula*. Este péptido tiene en su estructura el patrón cíclicamente repetido de aminoácidos lisina, alanina y ácido aspártico, que confiere una carga positiva, que puede potenciar interacciones con la superficie de células tumorales.

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 100 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 37.

Otro péptido efector citolítico de dominio (b) con actividad contra la célula eucariota puede ser un péptido lítico sintético. Péptidos sintéticos de fórmula (KLAKKLA)<sub>n</sub> (donde n es varias repeticiones del motivo) como proteínas anfipáticas y de hélice alfa después de la penetración en la célula se acumulan selectivamente en la membrana mitocondrial negativamente cargada, causando la formación de poros y la desestabilización del potencial electrostático de las mitocondrias, eliminando así selectivamente células de líneas seleccionadas de células cancerosas (Javadpour et al, J Med Chem, 39:3107-13, 1996).

En particular, un péptido efector tal es un péptido de 14 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 41.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad citolítica contra la célula eucariota puede ser otro péptido lítico sintético que disgrega la membrana celular en un modo de tipo detergente (Papo N, Shai Y. New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. Biochemistry. 2003 Aug 12;42(31):9346-54).

En particular, un péptido efector tal es un péptido de 17 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 128.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros es el péptido FF/CAP18 descrito por Isogai E. en "Antimicrobial and Lipopolysaccharide-Binding Activities of C-Terminal Domain of Human CAP18 Peptides to Genus *Leptospira*", The Journal of Applied Research, Vol. 4, No. 1, 2004, 180-185). FF/CAP18 es el análogo de la secuencia del extremo C de 27 aminoácidos de catelicidina humana hCAP18<sub>109-135</sub>, que se modificó por sustitución de 2 restos de aminoácidos con fenilalaninas. FF/CAP18 tiene carácter fuertemente catiónico, elevado en relación con la secuencia nativa debido a modificación incorporada, y se une fuertemente a membranas de células eucariotas. Una vez unida a la superficie de la membrana, FF/CAP18 forma canales y poros iónicos, conduciendo a la desestabilización del equilibrio electrostático de células. Además, después de la penetración dentro de la célula, el análogo se forma en la membrana mitocondrial para formar canales de iones, desestabilizando así el potencial

electrostático de la mitocondria y conduciendo a la liberación de mitocondria a citosol de factores tales como citocromo C, SMAC/Diablo o factor AIF, que inicia el proceso de apoptosis.

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 27 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 43.

- 5 Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros es un péptido BAMP-28 con fuerte carga positiva que pertenece a la familia de las catelicidinas. Este péptido también es el análogo estructural de histatinas humanas, un grupo de 12 péptidos con una masa inferior a 4 kDa producidos por células de las glándulas salivales y que presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas (W. Kamysz et al., *Histatyny - biatka liniowe bogate w histydyne*, *Nowa Stomatologia* 2004). El dominio del extremo N del péptido BAMP-28 está fuertemente positivamente cargado y es responsable de acoplarse a la membrana celular, mientras que la parte del extremo C es responsable de la actividad citotóxica (Hugosson, M., D. et al., 1994). Los péptidos antibacterianos y preseuencias mitocondriales afectan el acoplamiento mitocondrial, respiración e importación de proteínas. *Eur. J. Biochem.* 223:1027-1033). El mecanismo de actividad del péptido BMAP-28 se basa principalmente en la formación de poros en membranas celulares y mitocondriales (A. Risso et al., *BMAP-28, an Antibiotic Peptide of Innate Immunity, Induces Cell Death through Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore*, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Mar. 2002, p. 1926-1935).

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 27 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 44.

- 20 Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros es el análogo de la isoforma A del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* responsable de la acumulación sobre la superficie celular produciendo la formación de poros, que en consecuencia conduce a la inhibición del crecimiento tumoral. Se han identificado tres isoformas A, B y C de los péptidos de *Entamoeba histolytica*, localizados en el citoplasma granular del parásito. Éstos son polipéptidos de 77 aminoácidos estabilizados por tres puentes de sulfuro, que contienen en la estructura secundaria cuatro hélices anfipáticas (Leippe, M et al *EMBO J.* 11, 3501-3506, 1992). Estos péptidos tienen propiedades líticas contra las células eucariotas (Leippe, M. y Müller-Eberhard, H.J. *Toxicology* 87, 5-18, 1994). La tercera hélice en la estructura de estos péptidos tiene una longitud adecuada para la penetración de la membrana celular y la formación de poros. Basándose en las secuencias de aminoácidos que comprenden solo el dominio de tercera hélice de las tres isoformas, se ha construido una serie de péptidos sintéticos análogos (A3, B3 y C3) que tienen actividad formadora de poros y citotóxica contra las líneas de células cancerosas humanas y se caracterizan por baja actividad hemolítica (Andrä et al., *FEBS Letters* 385: 96-100, 1996).

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 24 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 45.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es un análogo de la isoforma B del péptido lítico de *Entamoeba histolytica*.

- 35 En particular, un péptido efector tal es el péptido de 24 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 46.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es un análogo de la isoforma C del péptido lítico de *Entamoeba histolytica*.

- 40 En particular, un péptido efector tal es el péptido de 24 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 47.

- Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es un homólogo de fragmento del extremo N de 20 aminoácidos, el llamado "péptido de fusión", de dominio HA2 de hemaglutinina del virus de la gripe, responsable de la interacción de la cápside viral con la membrana de célula hospedadora (intercalación) que produce la formación de poros en la membrana celular del hospedador. La hemaglutinina (HA) del virus de la gripe es una glucoproteína homotrimérica responsable de la fusión de la cápside viral con la membrana de célula hospedadora. Pueden distinguirse dos dominios en la estructura de la proteína, HA1 responsable de la unión a receptor y H2 responsable de interacciones con la membrana celular. En la estructura de dominio HA2 solo la parte del extremo N (20 aminoácidos), el denominado "péptido de fusión", se intercala directamente en la estructura de la membrana celular (Dürer P et al., *J Biol Chem* 271:13417-13421, 1996). El análisis estructural de los homólogos del péptido de fusión mostraron que su actividad está asociada con el cambio conformacional que conduce a la formación de hélices alfa anfipáticas, que son capaces de la perforación de membranas de endosoma (Takahashi S., *Biochemistry* 29: 6257-6264, 1990). Por tanto, los derivados de "péptido de fusión" pueden usarse como vehículos eficaces de sustancia biológicamente activa que proporciona un "escape" eficiente y rápido de endosomas.

- 55 En particular, un péptido efector tal es el péptido de 12 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 48.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es un péptido que es un fragmento activo de perforina humana. El uso de proteínas de origen humano que son "invisibles" al sistema inmunitario, que incluyen perforina humana, puede resolver el problema de utilidad clínica limitada de quimeras de proteína que contienen toxinas de origen bacteriano, animal o vegetal debido a la fuerte inmunogenicidad generada (Frankel AE. Reducing the immune response to immunotoxin. Clin Cancer Res. 2004 Jan 1;10(1 Pt 1):13-5). El fragmento de 34 aminoácidos del extremo N de perforina humana que forma poros no específicamente en la membrana celular retiene la actividad citotóxica selectiva de la proteína completa (Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. Immunol Today. 1995 Apr;16(4):194-201). Un fragmento de perforina fusionado con un anticuerpo que se dirige a células cancerosas retiene actividad citotóxica selectiva de la proteína completa (Wan L. Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. Protein Expr. Purif. 2006 Aug;48(2):307-13. Epub 2006 Mar 9).

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 33 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 54.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es parasporina-2 de *Bacillus thuringiensis*. La familia de parasporinas comprende 13 toxinas diferentes que pertenecen a los subgrupos PS1, PS2- PS3, PS4 (Ohba M. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Res. 2009 Jan;29(1):427-33). La parasporina-2 ejerce especificidad contra células cancerosas (MOLT-4, Jurkat, HL60, HepG2, CACO-2) y existe en una forma de protoxina de 37 kDa activada cortando por proteinasa K una porción de fragmentos del extremo N y C de, respectivamente, 51 y 36 aminoácidos. La acción clave de la parasporina-2 consiste en la oligomerización dentro de la membrana celular para formar poros que tienen un diámetro de aproximadamente 3 nm, produciendo el aumento de su permeabilidad. Efectos de la actividad de parasporina-2 dependen del tipo de líneas celulares probadas e incluyen la formación de las llamadas "vesículas" o protuberancias producidas por el flujo de salida del citoplasma de las células y su lisis (células HepG2 y NIH-3T3) o formación de estructuras de tipo vacuola que producen el estallido de células (MOLT-4) (Kitada S. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 2006 Sep 8;281(36):26350-60). Además, la actividad de parasporina-2 conduce a la destrucción de la estructura de microtúbulos, enredo de filamentos de actina, fragmentación de mitocondrias y retículo endoplásmico (Akiba T. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. J. Mol. Biol. 2009 Feb 13;386(1):121-33).

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 251 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 55.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es una proteína de fusión que comprende péptido lítico sintético con motivo KLLK y un péptido que es antagonista del receptor de PDGF sobre la superficie celular. La unión de un inhibidor de PDGF sobre la superficie celular permite la localización del péptido lítico a la superficie celular, y adicionalmente la unión afecta la proliferación celular y angiogénesis (Ostman A. et al., PDGF Receptors as Targets in Tumor Treatment, Adv. Cancer Res., 2007;97:247-74).

En particular, un péptido efector tal es el péptido de 39 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 125.

El péptido de fusión presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 125 y una variante de fusión del antagonista de PDGF y péptido lítico sintético de SEQ. No. 125 es novedoso y no ha sido descrito antes.

Otro péptido efector de dominio (b) con actividad formadora de poros contra célula eucariota es una proteína que es análogo de pleurocidina. Las pleurocidinas son proteínas  $\alpha$ -helicoidales catiónicas que interactúan con membrana celular (Cole AM et al., Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. J Biol Chem. 1997 May 2;272(18):12008-13). Los péptidos similares a pleurocidina son activos contra células de carcinoma de mama, que incluyen células de cáncer de mama resistentes a fármaco y de crecimiento lento (Hilchie AL et al., Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. Breast Cancer Res. 2011 Oct 24;13(5):R102).

En particular, tales péptidos efectores son el péptido de 25 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 126 y el péptido de 26 aminoácidos presentado en el listado de secuencias adjunto como SEQ. No. 127.

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. El péptido efector del dominio (b) de la proteína de fusión será capaz de ejercer posiblemente su acción extracelularmente o intracelularmente en paralelo a la actividad del dominio de TRAIL.

En la proteína de fusión según la invención, la actividad antitumoral de TRAIL se potencia por la formación de poros en la membrana celular o mitocondrial que producen la alteración de la carga electrostática de la célula, fuga de

iones del citoplasma o desestabilización del potencial electrostático de mitocondrias y liberación en el citoplasma de factores tales como citocromo C, SMAC/DIABLO o factor AIF, que a su vez activa la apoptosis sinérgica internamente inducida con la señal de la unión de TRAIL a receptores funcionales de series de DR.

5 Las nuevas proteínas de fusión también presentan al menos una actividad hemolítica reducida o limitada, o incluso sustancialmente eliminada, característica de los péptidos citolíticos naturales individuales.

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, por ejemplo, tal como meloproteasa, urocinasa o furina.

Puede seleccionarse secuencias reconocidas por proteasa de:

10 - una secuencia reconocida por metaloproteasa MMP Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro/PLGLAGEP, o fragmento de la misma, que con el último aminoácido de la secuencia a la que está unida forma una secuencia reconocida por metaloproteasa MMP,

- una secuencia reconocida por urocinasa uPA Arg Val Val Arg/RVVR, o fragmento de la misma, que con el último aminoácido de la secuencia a la que está unida forma una secuencia reconocida por urocinasa,

15 y combinaciones de las mismas, o

- una secuencia reconocida por furina Arg Gln Pro Arg/RQPR, Arg Gln Pro Arg Gly/RQPRG, Arg Lys Lys Arg/RKKR) u otras secuencias atípicas reconocidas por furina desveladas por M. Gordon et al., en *Inf. and Immun.*, 1995, 63, N.º 1, p. 82-87, o secuencias nativas reconocidas por furina Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu/RHRQPRGWEQL o HisArgGlnProArgGlyTrpGluGln / HRQPRGWEQ) o fragmento de las mismas, que con el último aminoácido de la secuencia a la que está unida forma una secuencia reconocida por furina.

20

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/o una secuencia reconocida por urocinasa uPA y/o una secuencia reconocida por furina, localizadas próximas entre sí en cualquier orden.

25 Preferentemente, en una de las realizaciones, el dominio (c) es una secuencia reconocida por furina seleccionada de Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly/ RVVRPLGLAG y Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg/PLGLAGRVVR.

Proteasas metaloproteasa MMP, urocinasa uPA y furina 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 acelerada.

30 La activación del péptido efector - dominio (b) funcional después de la internalización de la proteína de fusión en la célula puede producirse no específicamente por una escisión del dominio (a) del dominio (b) de la proteína de fusión de la invención por enzimas lisosómicas (proteasas no específicas).

35 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 como resultado del corte del fragmento de hTRAIL por medio de proteasa expresada en exceso en el entorno tumoral antes de que se produzca la degradación al azar de la proteína de fusión por proteasas no específicas.

Adicionalmente, puede unirse un dominio de transporte (d) al dominio (b) del péptido efector de la proteína de fusión de la invención.

El dominio (d) puede seleccionarse del grupo que consiste en:

40 (d1) secuencia de polihistidina que transporta a través de la membrana celular, que consiste en 6, 7, 8, 9, 10 u 11 restos de histidina (His/H);

y

(d2) secuencia de poliarginina que transporta a través de la membrana celular, que consiste en 6, 7, 8, 9, 10 u 11 restos de arginina (Arg/R),

45 (d3) secuencia de transporte de PD4 (dominio 4 de transducción de proteínas) Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala /YARAAARQARA,

(d4) una secuencia de transporte que consiste en la secuencia de unión a receptor de transferrina Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro /THRPPMWSPWP,

(d5) secuencia de transporte de PD5 (dominio 5 de transducción de proteínas, proteína TAT) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg /YGRKKRRQRRR,

o fragmentos de las mismas, que con el último aminoácido de la secuencia a la que están unida forman secuencias de dominios de transporte (d1) o (d2);

y

- combinaciones de los mismos.

- 5 La combinación de dominios, por ejemplo (d1) y (d2), puede comprender en particular la combinación (d1)/(d2) y (d2)/(d1).

Además, la combinación de dominios, por ejemplo (d1) y (d2), puede incluir dominios localizados próximos entre sí y conectados en un extremo del dominio (b) y/o dominios unidos a diferentes extremos del dominio (b).

- 10 Debe entenderse que, en el caso cuando la proteína de fusión tenga tanto el dominio de transporte (d) unido al dominio (b) como el dominio (c) del sitio de escisión entre los dominios (a) y (b), entonces el dominio (c) está localizado de tal manera que después de la escisión del dominio de transporte de la construcción (d) sigue unido al dominio (b). En otras palabras, si la proteína de fusión contiene tanto el dominio de transporte (d) como el dominio de sitio de escisión (c), entonces el dominio (d) se localiza entre el dominio (b) y el dominio (c), o se localiza en el extremo del dominio (b) opuesto al sitio de unión del dominio (d).

- 15 La invención también comprende una variante, en la que el dominio (d) se localiza entre dos (c) dominios, que es la variante en la que después de la escisión del dominio de transporte de construcción, preferentemente el dominio de translocación, no se une ni al dominio de TRAIL ni al dominio de péptido efector.

- 20 La invención no comprende una variante tal en la que el dominio (d) está localizado entre el dominio (c) y el dominio (a), que es la variante en la que después de la escisión del dominio de transporte de la construcción sigue unida al dominio de TRAIL.

- 25 En otra realización, entre el dominio (a) y el dominio (b) está además localizado el dominio (e) que comprende una secuencia adecuada para la unión de una molécula de PEG a la proteína de fusión (conector de pegilación). Un conector tal puede ser la secuencia conocida Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ASGCGPEG o fragmentos de la misma, que con el último aminoácido de la secuencia a la que está unida forma una secuencia adecuada para la unión de una molécula de PEG. El conector de pegilación también puede seleccionarse del grupo de los siguientes:

Ala Ala Cys Ala Ala/AACAA,

Ser Gly Gly Cys Gly Gly Ser/SGGCGGS, y

Ser Gly Cys Gly Ser/SGCGS,

- 30 o fragmento de los mismos, que con el último aminoácido de la secuencia a la que está unida forma una secuencia adecuada para la unión de una molécula de PEG. Preferentemente, la secuencia del conector de pegilación es Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ ASGCGPEG.

- 35 Aparte de los principales elementos funcionales de la proteína de fusión y el (los) dominio(s) de sitio de escisión, las proteínas de fusión de la invención pueden contener una secuencia/secuencias neutras de un conector estérico flexible. Tales conectores estéricos 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 hospedadoras. En particular, el conector estérico puede ser un conector de glicina, glicina-serina o glicina-cisteína-alanina.

- 40 En particular, el conector estérico puede ser una combinación de restos de glicina y serina tales como Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS o cualquier fragmento de los mismos que actúa de conector estérico, por ejemplo un fragmento Gly Gly Gly Ser/GGGGS, Gly Gly Gly/GGG o Gly Gly Gly Gly/GGGG, Gly Gly Ser Gly Gly, Gly Gly Ser Gly/GGSG, Gly Ser Gly/GSG o Ser Gly Gly/SGG, o combinaciones de los mismos.

- 45 En otra realización, el conector estérico puede ser cualquier combinación de restos de glicina, serina y alanina tal como Ala Ser Gly Gly/ASGG o cualquier fragmento de los mismos que actúa de conector estérico, por ejemplo Ala Ser Gly/ASG. También es posible usar la combinación de conectores estéricos, por ejemplo la secuencia Gly Gly Gly Ser Gly / GGGGS o cualquier fragmento de la misma que actúa de conector estérico, por ejemplo el fragmento Gly Gly Gly/GGG, con otro fragmento que actúa de conector estérico. En un caso tal, el conector estérico puede ser una combinación de restos de glicina, serina y alanina tal como Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gly Gly/GGGASAGG, Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/GGSGGGSGGG, Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGSGGGGGGS o Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGGGS. En otra realización adicional, el conector estérico puede ser una combinación de restos de serina e histidina Ser His His Ser/SHHS o Ser His His Ala Ser/SHHAS.

- 50 En otra realización adicional, el conector estérico también puede seleccionarse de restos de aminoácidos individuales tales como resto de glicina o cisteína individual, en particular uno o dos hasta cuatro restos de glicina o cisteína.

En otra realización, el conector también puede formarse por un fragmento de conectores estéricos descritos anteriormente, que con el aminoácido terminal de la secuencia a la que está unida forma una secuencia de conector estérico.

5 En otra realización, el conector estérico puede promover la formación y estabilización de la estructura del trímero de la proteína de fusión de la invención, aumentando así su semivida en el sistema circulatorio sanguíneo y previniendo la desasociación que puede afectar la actividad de la proteína después de la administración en el sistema circulatorio sanguíneo. En este caso, el conector es una combinación de cisteína y alanina, por ejemplo, un fragmento Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys/ CAAACAAC o Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys / CAACAAAC o fragmentos de los mismos, que es la secuencia de aminoácidos terminal a la que está unido y forma una secuencia de conector estérico que estabiliza la estructura de trímero.

Además, el conector estérico también puede ser útil para la activación del dominio funcional (b), que se produce de una manera no específica. La activación del dominio (b) de una manera no específica puede realizarse cortando el dominio (a) del dominio (b) de la proteína de fusión según la invención debido a la hidrólisis dependiente del pH del conector estérico.

15 Realizaciones particulares de la proteína de fusión de la invención son proteínas de fusión que comprenden un péptido formador de poros seleccionado del grupo de péptidos representados por:

SEQ. No. 36, SEQ. No. 37, SEQ. No. 41, SEQ. No. 43, SEQ. No. 44, SEQ. No. 45, SEQ. No. 46, SEQ. No. 47, SEQ. No. 48, SEQ. No. 54, SEQ. No. 55, SEQ. No. 125, SEQ. No. 126, SEQ. No. 127 y SEQ. No. 128.

20 Una descripción detallada de la estructura de proteínas de fusión representativas mencionadas anteriormente se muestra en los ejemplos presentados más adelante.

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.

25 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.

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.

30 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.

35 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.

40 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 hospedadoras.

45 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.

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

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

50 La invención también desvela un vector de expresión que contiene la secuencia de polinucleótidos, particularmente la secuencia de ADN de la invención, como se ha definido anteriormente.

La invención también desvela una célula hospedadora que comprende un vector de expresión como se ha definido anteriormente.

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 hospedador. 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 hospedadoras para la transfección/transformación, y como resultado se produce una célula hospedadora 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.

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 hospedadoras. Normalmente, los plásmidos se usan como vectores de expresión. Plásmidos adecuados son muy conocidos y están comercialmente disponibles.

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 hospedadora adecuada. La selección de secuencias reguladoras depende del tipo de células hospedadoras 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 terminadora de la transcripción, insertada después de la secuencia codificante. Además, dependiendo de la célula hospedadora 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.

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 fácilmente determinada usando técnicas de autorradiografía, espectrofotometría o bio- y quimio-luminiscencia. Por ejemplo, dependiendo de la célula hospedadora, pueden usarse genes indicadores tales como  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa o proteína verde fluorescente.

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 hospedadoras, además de secuencias que aumentan su solubilidad.

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 hospedadoras muy conocidas, que incluyen células procariotas: bacterianas, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, y líneas celulares eucariotas (insecto, de mamífero, planta).

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.

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. 60; SEQ. No. 61; SEQ. No. 62; SEQ. No. 67; SEQ. No. 68; SEQ. No. 69; SEQ. No. 70; SEQ. No. 71; SEQ. No. 72; SEQ. No. 74; SEQ. No. 75; SEQ. No. 76; SEQ. No. 77; SEQ. No. 78; SEQ. No. 79; SEQ. No. 86; SEQ. No. 87; SEQ. No. 88; SEQ. No. 108; SEQ. No. 109; SEQ. No. 110; SEQ. No. 111; SEQ. No. 112; SEQ. No. 113; SEQ. No. 114, SEQ. No. 115; y SEQ. No. 119; que codifican proteínas de fusión que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos, respectivamente:

SEQ. No. 4; SEQ. No. 5; SEQ. No. 6; SEQ. No. 11; SEQ. No. 12; SEQ. No. 13; SEQ. No. 14; SEQ. No. 15; SEQ. No. 16; SEQ. No. 18; SEQ. No. 19; SEQ. No. 20; SEQ. No. 21; SEQ. No. 22; SEQ. No. 23; SEQ. No. 30; SEQ. No. 31; SEQ. No. 32; SEQ. No. 91; SEQ. No. 92; SEQ. No. 93; SEQ. No. 94; SEQ. No. 95; SEQ. No. 96; SEQ. No. 97, SEQ. No. 98; y SEQ. No. 102.

En una realización preferida, la invención también proporciona un vector de expresión adecuado para la transformación de *E. coli* que comprende la secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo de secuencias de polinucleótidos SEQ. Nos 60-62, 67-72, 74-79, 86-88, 108-115 y 119 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 hospedadoras 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).

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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 el uso de la proteína de fusión de la invención como se ha definido anteriormente para tratar enfermedades de cáncer en mamíferos, que incluyen seres humanos. La invención también proporciona un método de tratamiento de enfermedades neoplásicas/ de cáncer en mamíferos, que incluyen seres humanos, que 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.

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

##### Preparación de un plásmido

Se usó la secuencia de aminoácidos de una 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 sirve 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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, ZnSO<sub>4</sub> 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 la marca His por purificación usando la resina Benzamidine 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).

20 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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, ZnSO<sub>4</sub> 2,5 mM, pH 7,4).

En esta descripción, ejemplos de proteínas originalmente expresadas con la marca de histidina que posteriormente se eliminó se designan con el superíndice a) a continuación del número de ejemplo. Las proteínas que fueron originalmente expresadas sin marca de histidina se designan con el superíndice b) a continuación del número de ejemplo.

Caracterización de proteínas de fusión por electroforesis 2-D

Con el fin de caracterizar adicionalmente las proteínas obtenidas y seleccionar con precisión condiciones cromatográficas, se determinaron puntos isoeléctricos de las proteínas. Para este fin, se usó el método de electroforesis bidimensional (2-D), en dos etapas según el siguiente programa.

## 45 Etapa 1. Isoelectroenfoco de proteínas en un gradiente de pH y condiciones desnaturizantes.

Se precipitaron preparaciones de proteína a concentraciones de 1 - 2 mg/ml mezclando en una relación 1:1 con una disolución de precipitación que contenía 10 % de ácido tricloroacético y 0,07 % de beta-mercaptoetanol en acetona. La mezcla se incubó durante 30 min a -20 °C y luego se centrifugó durante 25 min a 15.000 g y 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó dos veces con acetona fría con 0,07 % de beta-mercaptoetanol. Entonces se evaporaron los residuos de acetona hasta olor no detectable. El sedimento de proteína se suspendió en 250 ml de tampón de rehidratación urea 8 M, 1 % de CHAPS, DTT 15 mM, 0,5 % de anfolito (GE Healthcare) con un perfil de pH 3-11 o 6-11, dependiendo de la tira posteriormente usada. La disolución de proteína se dispuso en una cámara cerámica para isoelectroenfoco, seguido de 13 cm de DryStrip (GE Healthcare) con perfil de pH apropiado (3-11 o 6-11). Se cubrió todo con una capa de aceite mineral. Las cámaras se colocaron en el aparato Ettan IPGphor III, donde se realizó el isoelectroenfoco según el siguiente programa asignado a las dimensiones de la tira y el perfil de pH:

16 h deshidratación a 20 °C.

Enfoque en el campo eléctrico a un gradiente de pH fijo

Tiempo	Voltaje
1 h	500 V
1 h	gradiente 500 - 1000 V
2 h 30 min	gradiente 1000 - 8000 V
30 min	8000 V

Entonces, la tira que contenía las proteínas enfocadas se lavó durante 1 min en agua desionizada, se tiñó con Coomassie Brilliant y luego se decoloró y se archivó como una imagen para marcar la localización de proteínas. La tira decolorada se equilibró 2 x 15 min con un tampón de la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM a pH 8,8, urea 6 M, 1 % de DTT, 2 % de SDS, 30 % de glicerol.

5 Etapa 2. Separación en una segunda dirección por SDS-PAGE.

La tira se colocó sobre 12,5 % de gel de poliácridamida que contenía un único pocillo por tamaño estándar y entonces la separación se realizó en un aparato para SDS-PAGE, a un voltaje de 200 V durante 3 horas. El gel se tiñó con Coomassie Brilliant, luego se archivó con la escala aplicada. Las proteínas se identificaron determinando su peso basándose en el patrón de tamaño, y su IPI se leyó para la escala de 6-11 basándose en las curvas proporcionadas por el fabricante (GE Healthcare) (relación de pH con respecto al % de longitud de la tira desde el extremo marcado como ánodo) o una escala de 3-11 basándose en la curva determinada experimentalmente por medio del kit de calibración de isoelectroenfoco (GE Healthcare).

Ejemplos

Los ejemplos representativos de las proteínas de fusión de la invención se muestran en los siguientes ejemplos.

15 En los ejemplos, las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión se escriben de extremo N a extremo C de la proteína. En los ejemplos, por TRAIL siempre se indica hTRAIL.

Se usan las siguientes designaciones de componentes de secuencias de aminoácidos, en las que a continuación de la designación de tres letras, se da la designación de una letra equivalente.

- 20 CONECTOR1: conector estérico Gly Gly /GG
- CONECTOR2: conector estérico Gly Gly Gly / GGG
- CONECTOR3: conector estérico Gly Ser Gly /GSG
- CONECTOR4: conector estérico Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGS
- CONECTOR5: conector estérico Gly Gly Gly Gly Gly Ser/GGGGGS
- CONECTOR6: conector estérico Gly Gly Ser Gly Gly/GGSGG
- 25 CONECTOR7: conector estérico Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/ GGGSGGG
- CONECTOR8: conector estérico Gly Gly Gly Gly Ser Gly /GGGGSG
- CONECTOR9: conector estérico Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser/ GGGSGGGGGS
- CONECTOR10: conector estérico Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly / GGGGSGGGG
- CONECTOR11: conector estérico Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly/ GSGGGSGGG
- 30 CONECTOR12: conector estérico Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys/ CAACAAAC
- CONECTOR13: conector estérico Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys/ CAAACAAC
- CONECTOR 14: conector estérico Cys/C
- CONECTOR 15: conector estérico Gly/G
- CONECTOR16: conector estérico Ser Gly Gly/SGG
- 35 FURINA: secuencia escindida por furina Arg Lys Lys Arg / RKKR
- FURINA.NAT: secuencia nativa escindida por furina His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln / HRQPRGWEEQ

UROCIN: secuencia escindida por urocinasa Arg Val Val Arg / RVVR

MMP: secuencia escindida por metaloproteasa Pro Leu Gly Leu Ala Gly/ PLGLAG

PEG1: conector de pegilación Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu/ASGCGPE

PEG2: conector de pegilación Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly/ ASGCGPEG

5 TRANS1: secuencia de transporte His His His His His His /HHHHHH

TRANS2: secuencia de transporte Arg Arg Arg Arg Arg Arg /RRRRRRR

TRANS3: secuencia de transporte Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg /RRRRRRRR

TRANS4: secuencia de transporte Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala /YARAAARQARA

TRANS5: secuencia de transporte Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro /THRPPMWSPVWP

10 TRANS6: secuencia de transporte Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg /YGRKKRRQRRR

Ejemplo 4. Proteína de fusión de SEQ. No. 4

La proteína de SEQ. No. 4 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 227 aminoácidos y la masa de 25,7 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL121-281, y el dominio (b) del péptido efector es la pilosulina-1 de 56 aminoácidos (SEQ. No. 36) unida en el extremo N del dominio (a).

15 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el sitio de escisión de urocinasa (RVVR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 36)-UROCIN-MMP-(TRAIL 121-281)

20 La 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. 60, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 4 de la estructura descrita anteriormente se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 60. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN, 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 5. Proteína de fusión de SEQ. No. 5

30 La proteína de fusión de SEQ. No. 5 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 264 aminoácidos y la masa de 29,5 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL95-281 y el dominio (b) del péptido efector es la pilosulina-1 de 56 aminoácidos (SEQ. No. 36), que está unido al extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (CAACAAC), el conector estérico (GGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y el sitio de escisión de urocinasa (RVVR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

35 (TRAIL95-281)-CONECTOR12-CONECTOR2-MMP-UROCIN-(SEQ. No. 36)

La 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. 61, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

40 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 5 de la estructura descrita anteriormente se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 61. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

45

## Ejemplo 6. Proteína de fusión de SEQ. No. 6

La proteína de SEQ. No. 6 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 299 aminoácidos y la masa de 33,2 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL95-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido de 90 aminoácidos pilosulina 5 (SEQ. No. 37) unido en el extremo C del dominio (a).

- 5 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GSG), el conector estérico (CAACAAAC), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el conector estérico (G). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL95-281)-CONECTOR3-CONECTOR12-MMP-UROCIN-CONECTOR15-(SEQ. No. 37)

- 10 La 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. 62, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 6 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 62. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó tanto con marca de histidina (Ej. 6<sup>a</sup>) como sin marca de histidina (Ej. 6<sup>b</sup>).

## Ejemplo 11. Proteína de fusión de SEQ. No. 11

- 20 La proteína de SEQ. No. 11 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 202 aminoácidos y la masa de 23 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y la secuencia de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR10-UROCIN-MMP-TRANS3-(SEQ. No. 41)

- 30 La 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. 67 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 11 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 67. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó tanto con marca de histidina (Ej. 11<sup>a</sup>) como sin marca de histidina (Ej. 11<sup>b</sup>).

## Ejemplo 12. Proteína de fusión de SEQ. No. 12

- 40 La proteína de SEQ. No. 12 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 205 aminoácidos y la masa de 23,2 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GG), la secuencia de conector de pegilación (ASGCGPEG), la secuencia de conector estérico (GGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RVVR) y la secuencia de transporte de poliarginina (RRRRRRRR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

45 (TRAIL 121-281)-CONECTOR1-PEG2-CONECTOR2-MMP-UROCIN-TRANS2-(SEQ. No. 41)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 12 y SEQ. No. 68, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

50 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 12 de la estructura descrita anteriormente se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 68. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 13. Proteína de fusión de SEQ. No. 13

5 La proteína de SEQ. No. 13 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 228 aminoácidos y la masa de 25,9 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 95-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) unido en el extremo C del dominio (a).

10 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGSGGGG), el sitio de escisión de urocinasa (RVVR), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y la secuencia de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL 95-281)-CONECTOR10-UROCIN-MMP-TRANS3-(SEQ. No. 41)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 13 y SEQ. No. 69, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

15 La secuencia de aminoácidos SEQ. No. 13 de la estructura descrita anteriormente se usó como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 69. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito  
20 anteriormente. La proteína se expresó tanto con marca de histidina (Ej. 13<sup>a</sup>) como sin marca de histidina (Ej. 13<sup>b</sup>).

Ejemplo 14. Proteína de fusión de SEQ. No. 14

La proteína de SEQ. No. 14 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 192 aminoácidos y la masa de 22,1 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) unido en el extremo N del dominio (a).

25 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el conector estérico (C), el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Adicionalmente, en el extremo N del péptido efector está unido el dominio de transporte de polihistidina (HHHHHH). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

TRANS1-(SEQ. No. 41)-CONECTOR14-UROCIN-MMP-(TRAIL 121-281)

30 La 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. 70, como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

35 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 14 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 70. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 15. Proteína de fusión de SEQ. No. 15

40 La proteína de SEQ. No. 15 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 23,3 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) está unido en el extremo N del dominio (a).

45 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el conector estérico (C), la secuencia de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR), el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Adicionalmente, la secuencia de transporte de histidina (HHHHHH) está unida en el extremo N del péptido efector. Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

TRANS1-(SEQ. No. 41)-CONECTOR14-TRANS3-UROCIN-MMP-(TRAIL 121-281)

50 La 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. 71 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 15 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 71. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 16. Proteína de fusión de SEQ. No. 16

La proteína de SEQ. No. 16 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 202 aminoácidos y la masa de 23,1 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y la secuencia de transporte de 8-arginina (RRRRRRRR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL 121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN TRANS3-(SEQ. No. 41)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 16 y SEQ. No. 72 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 16 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 72. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó tanto con marca de histidina (Ej. 16<sup>a</sup>) como sin marca de histidina (Ej. 16<sup>b</sup>).

Ejemplo 18. Proteína de fusión de SEQ. No. 18

La proteína de SEQ. No. 18 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 203 aminoácidos y la masa de 23,6 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 116-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido de 27 aminoácidos hCAP-18/LL-37 (SEQ. No. 43) unido en el extremo N del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 43)-UROCIN-MMP-(TRAIL116-281)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 18 y SEQ. No. 74 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 18 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 74. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 19. Proteína de fusión de SEQ. No. 19

La proteína de SEQ. No. 19 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 203 aminoácidos y la masa de 23,3 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 116-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido de 27 aminoácidos BAMP-28 (SEQ. No. 44) unido en el extremo N del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 44)-UROCIN-MMP-(TRAIL116-281)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 19 y SEQ. No. 75 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 19 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 75. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 20. Proteína de fusión de SEQ. No. 20

La proteína de SEQ. No. 20 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 22,8 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el análogo de 24 aminoácidos de la isoforma C del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* (SEQ. No. 45) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGSGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y el sitio de escisión de urocinasa (RWR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR6-MMP-UROCIN-(SEQ. No. 45)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 20 y SEQ. No. 76 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 20 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 76. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 21. Proteína de fusión de SEQ. No. 20

La proteína de SEQ. No. 20 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 22,8 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el análogo de 24 aminoácidos de la isoforma A del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* (SEQ. No. 46) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGSGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y el sitio de escisión de urocinasa (RVVR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR6-MMP-UROCIN-(SEQ. No. 46)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 21 y SEQ. No. 77 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 21 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 77. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 22. Proteína de fusión de SEQ. No. 22

La proteína de SEQ. No. 22 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 22,8 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el análogo de 24 aminoácidos de la isoforma B de un péptido lítico de *Entamoeba histolytica* (SEQ. No. 47) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGSGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y el sitio de escisión de urocinasa (RVVR). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR6-MMP-UROCIN-(SEQ. No. 47)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 22 y SEQ. No. 78 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

5 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 22 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 78. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

10 Ejemplo 23. Proteína de fusión de SEQ. No. 23

La proteína de SEQ. No. 23 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 190 aminoácidos y la masa de 22,1 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el fragmento de 12 aminoácidos del dominio HA2 de la hemaglutinina del virus de la gripe (SEQ. No. 48) unido en el extremo N del dominio (a).

15 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente la secuencia de transporte de 7-arginina (RRRRRRR), el sitio de escisión de urocinasa (RWR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 48)-TRANS2-UROCIN-MMP-(TRAIL121-281)

20 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 23 y SEQ. No. 79 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 23 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 79. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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 de *BL21 (DE3)* o *Tuner (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente. La proteína se expresó tanto con marca de histidina (Ej. 23<sup>a</sup>) como sin marca de histidina (Ej. 23<sup>b</sup>).

Ejemplo 30. Proteína de fusión de SEQ. No. 30

30 La proteína de SEQ. No. 30 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 200 aminoácidos y la masa de 22,5 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el fragmento activo de 33 aminoácidos de perforina humana (SEQ. No. 54) unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) se incorpora la secuencia de conector estérico (GGGGSG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

35 (TRAIL121-281)-CONECTOR8-(SEQ. No. 54)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 30 y SEQ. No. 86 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

40 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 30 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 86. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó con marca de histidina.

45 Ejemplo 31. Proteína de fusión de SEQ. No. 31

La proteína de SEQ. No. 31 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 210 aminoácidos y la masa de 23,5 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el fragmento activo de 33 aminoácidos de perforina humana (SEQ. No. 54) unido en el extremo C del dominio (a).

50 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSG), el sitio de escisión de urocinasa (RVVR), Y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR8-UROCIN-MMP-(SEQ. No. 54)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 31 y SEQ. No. 87 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

5 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 31 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 87. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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)* o *Tuner (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente. La proteína se expresó con marca de histidina.

10 Ejemplo 32. Proteína de fusión de SEQ. No. 32

La proteína de SEQ. No. 32 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 436 aminoácidos y la masa de 48 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 116-281, y el dominio (b) del péptido efector es la parasporina-2 de 251 aminoácidos de *Bacillus thuringiensis* (SEQ. No. 55) unida en el extremo N del dominio (a).

15 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el sitio de escisión de urocinasa (RVVR), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG) y el conector estérico (GSGGGSGGG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 55)-UROGIN-MMP-CONECTOR11-(TRAIL116-281)

20 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 32 y SEQ. No. 88 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 32 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 88. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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)* o *Tuner (DE3)* de *E. coli* de Novagen. La proteína se separó por electroforesis según el procedimiento general descrito anteriormente. La proteína se expresó con marca de histidina.

Ejemplo 34. Proteína de fusión de SEQ. No. 91

30 La proteína de SEQ. No. 91 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 223 aminoácidos y la masa de 25,2 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido de fusión de 39 aminoácidos que comprende el inhibidor de PDGFR y el péptido lítico sintético (SEQ. No. 125), unido en el extremo N del dominio (a).

35 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el sitio de escisión de urocinasa (RVVR) y el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el conector estérico (GG), el conector estérico (CAAACAAC) y el conector estérico (SGG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(SEQ. No. 125)-UROGIN-MMP- CONECTOR1-CONECTOR13-CONECTOR16-(TRAIL121-281)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 91 y SEQ. No. 108 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

40 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 91 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 108. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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.  
45 La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 35. Proteína de fusión de SEQ. No. 92

La proteína de SEQ. No. 92 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 223 aminoácidos y la masa de 25,6 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 95-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de fusión de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41), unido en el extremo N del dominio (a).

50 Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el dominio de transporte de poliarginina (RRRRRRR), el sitio de escisión de furina (RKKR), el conector estérico (GGG) y el conector estérico (CAAACAAC). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

## (SEQ. No. 41)-TRANS2-FURIN-CONECTOR2-CONECTOR13-(TRAIL95-281)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 92 y SEQ. No. 109 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

5 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 92 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 109. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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.

10 La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 36. Proteína de fusión de SEQ. No. 93

15 La proteína de SEQ. No. 93 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 232 aminoácidos y la masa de 26,7 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 95-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de fusión de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41), unido en el extremo N del dominio (a). Adicionalmente, entre el dominio (b) y el dominio (a) están incorporados secuencialmente el dominio de transporte de poliarginina (RRRRRRR), el sitio de escisión de furina (RKKR), el sitio de escisión de furina nativa (HRQPRGWEEQ), el conector estérico (GGG) y el conector estérico (CAAACAAC). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

## (SEQ. No. 41)-TRANS2-FURIN-FURN.NAT-CONECTOR2-CONECTOR13- (TRAIL95-281)

20 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 93 y SEQ. No. 110 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 93 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 110. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 37. Proteína de fusión de SEQ. No. 94

30 La proteína de SEQ. No. 94 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 207 aminoácidos y la masa de 23 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de fusión de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41), unido en el extremo C del dominio (a).

35 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR), el dominio de transporte (YARAAARQARA) y el conector estérico (GG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

## (TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-TRANS4-CONECTOR1-(SEQ. No. 41)

40 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 94 y SEQ. No. 111 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

45 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 94 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 111. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 38. Proteína de fusión de SEQ. No. 95

50 La proteína de SEQ. No. 95 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 218 aminoácidos y la masa de 24,4 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el análogo de pleurocidina de 25 aminoácidos (SEQ. No. 126), unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR), el

dominio de transporte (YARAAARQARA) y el conector estérico (GG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-TRANS4-CONECTOR1-(SEQ. No. 126)

5 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 95 y SEQ. No. 112 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

10 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 95 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 112. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 39. Proteína de fusión de SEQ. No. 96

15 La proteína de SEQ. No. 96 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 219 aminoácidos y la masa de 24,5 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el análogo de pleurocidina de 26 aminoácidos (SEQ. No. 127), unido en el extremo C del dominio (a).

20 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RWR), el dominio de transporte (YARAAARQARA) y el conector estérico (GG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-TRANS4-CONECTOR1-(SEQ. No. 127)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 96 y SEQ. No. 113 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

25 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 96 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 113. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 40. Proteína de fusión de SEQ. No. 97

La proteína de SEQ. No. 97 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 212 aminoácidos y la masa de 23,9 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 17 aminoácidos (SEQ. No. 128), unido en el extremo C del dominio (a).

35 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RVVR), el dominio de transporte (THRPPMWSPWP) y el conector estérico (GGG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-TRANS5-CONECTOR2-(SEQ. No. 127)

40 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 97 y SEQ. No. 114 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

45 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 97 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 114. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 41. Proteína de fusión de SEQ. No. 98

50 La proteína de SEQ. No. 98 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 207 aminoácidos y la masa de 23,3 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y el dominio (b) del péptido efector es el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41), unido en el extremo C del dominio (a).

Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), el sitio de escisión de urocinasa (RVVR), el dominio de transporte (YGRKKRRQRRR) y el conector estérico (GG). Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

5 (TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-TRANS6-CONECTOR1-(SEQ. No. 41)

La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 98 y SEQ. No. 115 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

10 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 98 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 115. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

15 Ejemplo 45. Proteína de fusión de SEQ. No. 102

La proteína de SEQ. No. 102 es una proteína de fusión que tiene la longitud de 234 aminoácidos y la masa de 26,2 kDa, en la que el dominio (a) es la secuencia de TRAIL 121-281, y dos dominios (b) del péptido efector son el péptido de melitina de 25 aminoácidos (SEQ. No. 132) y el péptido lítico sintético de 14 aminoácidos (SEQ. No. 41), unidos secuencialmente en el extremo C del dominio (a).

20 Adicionalmente, entre el dominio (a) y el dominio (b) están incorporados secuencialmente el conector estérico (GGGGSGGGG), el sitio de escisión de metaloproteasa (PLGLAG), y el sitio de escisión de urocinasa (RVVR) y el conector estérico (GG). Adicionalmente, se incorpora un conector estérico (GGGS) entre dos dominios efectores.

Así, la estructura de la proteína de fusión de la invención es del siguiente modo:

(TRAIL121-281)-CONECTOR10-MMP-UROCIN-CONECTOR1-(SEQ.No,132)-CONECTOR4-(SEQ.No. 41)

25 La secuencia de aminoácidos y la secuencia codificante de ADN que comprende codones optimizados para la expresión en *E. coli* son, respectivamente, SEQ. No. 102 y SEQ. No. 119 como se muestra en el Listado de secuencias adjunto.

30 Se usó la secuencia de aminoácidos SEQ. No. 102 de la estructura descrita anteriormente como molde para generar su secuencia de ADN codificante SEQ. No. 119. Se generó un plásmido que contenía la secuencia codificante de ADN 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. La proteína se expresó sin marca de histidina.

Ejemplo 51. Examen de actividad antitumoral de las proteínas de fusión

35 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 del dicroísmo circular: determinación de la composición de estructuras secundarias de las proteínas obtenidas

40 Se determinó la calidad de las preparaciones de proteínas de fusión en términos de su estructura por dicroísmo circular para las proteínas de fusión de E. 23, Ej. 11 y Ej. 13.

45 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.

#### Diálisis

50 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, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, sacarosa 80 mM, DTT 5 mM en bolsas de diálisis (Sigma-Aldrich) con el corte 12 kDa. La diálisis se realizó contra un exceso de 100 veces (v/v) de tampón con respecto a 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. Se determinó la concentración de proteína en las muestras así obtenidas por el método de Bradford.

5 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.

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.

10 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 $\alpha$	hoja $\beta$	Desplazamiento	Trastorno
Ej. 23	0,149	3,7%	42,0%	21,1%	33,2%
Ej. 11	0,079	25,1%	22,7%	21,2%	30,9%
Ej. 13	0,047	15,0%	32,2%	20,6%	32,2%
hTRAIL*		1,94%	50,97%	7,74%	39,35%
hTRAIL	0,389	4,9%	33,7%	23,1%	38,3%
* valor obtenido basándose en la estructura cristalina 1D4V					
** valores obtenidos basándose en las estructuras cristalinas 1IKQ, 1 R4Q, 1ABR, 3PX8					

15 La molécula de control (rhTRAIL114-281) muestra el espectro de CD característico de las proteínas con predominantemente estructuras de tipo hoja  $\beta$  (mínimo de elipticidad bruscamente delineado a la longitud de onda de 220 nm). Esto confirma el cálculo de los componentes de estructura secundaria, que sugiere un número marginal de elementos de hélice  $\alpha$ .

20 El resultado obtenido también está de acuerdo con los datos de la estructura cristalina de la proteína hTRAIL, y es característico de la proteína de fusión de la invención del Ej. 23, en el que los elementos beta constituyen el 42 % de de su estructura. Para las proteínas del Ej. 11 y Ej. 13, se observó contenido de hélice alfa más alto (mínimo adicional del espectro a la longitud de onda 208 nm). Esto es debido a la presencia en las construcciones de motivos KLAKLAK que tienen un fuerte carácter anfipático y forman estructuras de tipo alfa-helicoidal. Desafortunadamente, debido a la baja estabilidad de las proteínas del Ej. 23, Ej. 11 y Ej. 13 en el tampón para las mediciones de CD y bajas concentraciones de preparaciones analizadas, sus espectros se caracterizan por un alto nivel de ruido y con baja resolución. Por tanto, pueden no reflejar completamente la actual situación, y solo sugieren el resultado.

25 2. Pruebas en líneas celulares *in vitro*

Líneas celulares

30 Se obtuvieron líneas celulares de ATCC y CLS, y luego se propagaron y depositaron en el Adamed's Laboratory of Biology Cell Line Bank. Durante el experimento, las células fueron rutinariamente comprobadas para la presencia de Mycoplasma por la técnica de PCR usando el kit Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlín, Alemania). Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar: 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> (en el caso de DMEM - 10 % de CO<sub>2</sub>) y 85 % de humedad relativa. Se cultivaron líneas celulares particulares en medios apropiados como se recomendó por ATCC.

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

ES 2 655 828 T3

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	número de células por pocillo (miles)
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
MDA-MB-435s ATCC N.º HTB-129	<i>cáncer de mama humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
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
SK-OV-3 ATCC N.º HTB-77	<i>cáncer de ovario humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
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 1 ATCC N.º HTB-46	<i>cáncer de riñón humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5
CAKI 2 ATCC N.º HTB-47	<i>cáncer de riñón humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5
NCI- H69AR ATCC N.º CRL-11351	<i>cáncer de pulmón de células pequeñas humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10
HT144 ATCC N.º HTB-63	<i>células de melanoma humanas</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	7
NCI-H460 ATCC N.º HTB-177	<i>cáncer de pulmón humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	2,5
A549 ATCC N.º CCL-185	<i>cáncer de pulmón humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	2,5
MES-SA ATCC N.º CRL-1976	<i>sarcoma uterino humano</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3,5

Línea celular	Tipo de cáncer	Medio	número de células por pocillo (miles)
MES-SA/Dx5 ATCC N.º CRL-1977	<i>sarcoma uterino humano multirresistente</i>	McCoy's + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4
MES-SA/Mx2 ATCC N.º CRL-2274	<i>sarcoma uterino humano</i>	Waymouth's MB 752/1 + McCoy's (1 : 1) + 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	5
HCT-116 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 + 5 % de plasma de caballo + 0.5 µg/ml de hidrocortisona + 10 µg/ml de insulina + 20 ng/ml de factor de crecimiento EGF	5
Panc-1 CLS 330228	<i>cáncer pancreático humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
Panc03.27 ATCC N.º CRL-2549	<i>cáncer pancreático humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
PLC/PRF/5 CLS 330315	<i>hepatoma hepático humano</i>	DMEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	5
LNCaP ATCC N.º CRL-1740	<i>cáncer de próstata humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	4,5
SK-Hep-1 CLS300334	<i>hepatoma hepático humano</i>	RPMI + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	10
A498 CLS 300113	<i>cáncer de riñón humano</i>	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3
HT1080 ATCC N.º CCL-121	Fibrosarcoma humano	MEM + 10 % de FBS + penicilina + estreptomycin	3
HUV-EC-C ATCC N.º CRL-1730	células endoteliales de la vena umbilical humana	M199 + 20 % de FBS + penicilina + 0,05 mg/ml de ECGS + 0,1 mg/ml de heparina + penicilina + estreptomycin	8,5

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

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 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).

Se diluyó medio de cultivo celular a una densidad definida ( $10^4$  -  $10^5$  células por 100  $\mu$ l). Entonces se aplicaron 100  $\mu$ l 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  $CO_2$ , dependiendo del medio usado, y luego a las células (en 100  $\mu$ l de medio) se añadieron adicionalmente 100  $\mu$ l 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 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  $CO_2$ . Entonces se eliminó el medio con disolución de MTT, y los cristales de formazano se disolvieron añadiendo 100  $\mu$ l de DMSO. Después de agitar, la absorbancia se midió a 570 nm (filtro de referencia 690 nm).

Prueba de citotoxicidad de EZ4U

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 del método 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  $Cl_{50}$  (como un promedio de dos experimentos independientes) usando el software GraphPad Prism 5. Las células de control se incubaron con el disolvente solo.

Los resultados de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se resumen como valores de  $Cl_{50}$  (ng/ml), que se corresponde con la 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. 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  $Cl_{50}$  de 2000 ng/ml. Las proteínas de fusión con un valor de  $Cl_{50}$  por encima de 2000 se consideraron inactivas.

Las células seleccionadas para esta prueba incluyeron líneas celulares tumorales que son naturalmente resistentes a la proteína TRAIL (el criterio de resistencia natural a TRAIL:  $Cl_{50}$  para la proteína TRAIL > 2000), además de 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.

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.

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 a las células sensibles a TRAIL, en algunos casos se observó una clara y fuerte potenciación de la potencia de acción, que se manifestó en valores de  $Cl_{50}$  reducidos de la proteína de fusión en comparación con  $Cl_{50}$  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.

Los valores de  $Cl_{50}$  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

La Tabla 4 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.

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.

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

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)													
	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1			
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE		
rhTRAIL95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29,15	12,66	39,35	8,13		
Ej. 11 <sup>a</sup>	115,5	60,1	6,81	4,13	103,02	18,07	7,3	1,67	1,46	0,46	1,93	0,37		
Ej. 13 <sup>a</sup>	909,35	169,21	112		750,5	156,27	110,85	9,69			29,04	0,65		
Ej. 6 <sup>a</sup>	915,2		205,8		995,7		126,1							
Ej. 23 <sup>a</sup>	1054,7	406,3	1054,7	406,3	245,45	25,67			48,06	1,75	22,1	0,18		
	NCI-H460													
rhTRAIL95-281	5889	111												
Ej. 6 <sup>a</sup>	96,85													

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

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)													
	COLO 205		DU 145		MDA-MB-231		PC 3		SW 620		SW 780			
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE		
rhTRAIL95-281														
Ej. 11 <sup>a</sup>	0,42	0,57	4,74	0,104	12,54	0,74	948	42,43	735,25	45,89	0,79	0,41		
	UM-UC-3		HT 29		293		ACHN		CAKI 2		BxPC3			
TRAIL 95-281	2242	1367	>10000		>10000		>10000		>10000		64,71	31,81		
Ej. 11 <sup>a</sup>	0,64	0,04	4185,5	981	1152	77,78	4,86	1,06	25,42	3,22	0,43	0,114		
	HepG2		HT 144		NCI-H460		LNCaP		OV-CAR-3		JURKAT A3			
rhTRAIL 95-281	>10000		1730	218,5	5889	111	2052	466	963,00	144,25	>10000			
Ej. 11 <sup>a</sup>	5,63	0,45	0,26	0,065	1,8	0,34	408,15	11,8	0,114	0,07	0,29	0,24		
	PLC/PRF/5		PANC-1		NCI-H460									
rhTRAIL95-281	>9000		>10000		5889	111								
Ej. 11 <sup>a</sup>	436,8		142,25	56,78										

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

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)											
	A549		MCF10A		HCT116		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1	
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE
TRAIL 95-281	>2000		>2000		>2000		>2000		27,59	13,34	100,7	26,4
Ej. 6 <sup>o</sup>	915		996		206		126		56,2		53,3	
Ej. 23 <sup>o</sup>	550		1342		245	26	99		48,1	1,8	22,11	0,18
Ej. 16 <sup>o</sup>	10,96	2,14	4,71	1,26	1,5	0,19	0,08	0,07	0,0001		0,06	0,03
Ej. 11 <sup>o</sup>	89,2	11,1			13,73	1,34						
Ej. 13 <sup>o</sup>	405											

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

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)											
	SW620		Panc-1		PLC/PRF/5		HT-29		Caki-1		SK-HEP-1	
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE
TRAIL 95-281	>2000		>2000		>2000		>2000		13,42		>2000	
Ej. 11 <sup>o</sup>	325	24	10,87	1,8	46,4	20	893		11,57		75,1	11,3
Ej. 16 <sup>o</sup>	1688	917	0,68	0,93	2,89	2,02	1063	480	3,29	1,44	4,27	2,36
Ej. 13 <sup>o</sup>	4,42		26		5,8							
	Caki-2		SK-OV-3		BxPC-3		HT-144		OV-CAR-3		HT-1080	
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE
TRAIL 95-281	>2000		>2000		60,6	22,8	1134	375	963	144	>2000	
Ej. 16 <sup>o</sup>	3,54	0,52	161,2	1,8	0,55	0,12	0,13	0,05	0,12		1025	395
	MES-SAMx2		Colo205		MCF-7		MDA-MB-231		MDA-MB-B-435S		ACHN	
	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE	Cl <sub>50</sub>	±DE
TRAIL 95-281	38,95	6,14	59,02	21,16	>2000		>2000		>2000		>2000	
Ej. 16 <sup>o</sup>	0,0001		0,48	0,65	1,74	0,51	1,71	1,19	0,86	1,08	0,38	0,32

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

Proteína	Incubación continua de preparaciones con células durante 72 h (prueba MTT, ng/ml)											
	NCI-H460		HepG2		Panc03.27		A498		HUV-EC-C			
	CI <sub>50</sub>	±DE	CI <sub>50</sub>	±DE	CI <sub>50</sub>	±DE	CI <sub>50</sub>	±DE	CI <sub>50</sub>	±DE	CI <sub>50</sub>	±DE
TRAIL 95-281	438	77	>2000		315		1611	103	>2000			
Ej. 16 <sup>b</sup>	0,47	0,22	11,27	1,3	11,3	0,4	0,06	0,07	>2000			
Ej. 13 <sup>b</sup>	6,78		13									
Ej. 11 <sup>b</sup>					42,1	17,4	2,6	0,15				

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

- 5 Se probó la actividad antitumoral de preparaciones de proteína en un modelo de ratón de cáncer de colon humano Colo 205 y HCT-116, cáncer de pulmón humano A549 y NCI-H460-Luc, cáncer de próstata humano PC-3, cáncer de páncreas humano Panc-1 y MIA PaCa-2, cáncer de hígado humano PCL/PRF/5 y HepG2 y sarcoma uterino multirresistente humano MES-SA.Dx5.

#### Células

- 10 Las células de cáncer de pulmón humano A549 y NCI-H460-Luc2 y cáncer de próstata humano PC3 se mantuvieron en medio RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM.

Las células de cáncer de colon humano Colo 205 se mantuvieron en medio RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) (opcionalmente mezclado en la relación de 1:1 con Opto-MEM (Invitrogen, Cat. N.º 22600-134) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM.

- 15 Las células de cáncer de páncreas humano PANC-1, cáncer de hígado humano PLC/PRF/5, cáncer de páncreas MIA PaCa-2 y cáncer de colon humano SW-620 se mantuvieron en medio DMEM (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM.

Las células de cáncer de colon humano HCT-116 se mantuvieron en medio de McCoy (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM.

- 20 Las células de sarcoma uterino multirresistente humano MES-SA.Dx5 se mantuvieron en medio de McCoy (HyClone, Logan, UT, EE.UU.) complementado con 10 % de suero de ternero fetal y glutamina 2 mM, y clorhidrato de doxorubicina 1 µM (Sigma, Cat. N.º D1515-10MG). Tres días antes de implantación de las células, las células se cultivaron en medio sin doxorubicina.

- 25 Las células de cáncer de hígado humano HepG2 se mantuvieron en medio 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).

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).

- 30 Ratones

Se realizó el examen de actividad antitumoral de proteínas de la invención en ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J de 4-6 semanas de edad (modelo de cáncer de pulmón) o 9-10 semanas de edad (modelo de cáncer de próstata) obtenidos del Centrum Medycyny Doświadczalnej en Białystok, ratones CrI:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>h</sup> hembra de 4-5 semanas de edad obtenidos de Charles River Alemania. 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).

- 35

El curso y evaluación de los experimentos

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 tumor (mm) y b = diagonal más larga del tumor (mm). La inhibición del crecimiento tumoral se calculó usando la fórmula:

$$5 \quad \text{ICT [\%]} = (\text{Inhibición del crecimiento tumoral}) = (\text{WT} / \text{WC}) \times 100 - 100 \%$$

en la que WT es el volumen promedio del tumor en el grupo de tratamiento, y WC es el volumen promedio del tumor en el grupo de control.

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

10 Modelo de cáncer de pulmón c

## Experimento A.

15 En el día 0, se injertaron ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $5 \times 10^6$  células A549 suspensas en 0,1 ml de la mezcla HBSS:Matrigel 4:1 usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 19 día del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 75 \text{ mm}^3$  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. 11<sup>a</sup> (15 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación y agua para inyecciones como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días. En el 35 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

20 Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 1 y Fig. 2 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281.

25 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 1 y 2 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causaron la inhibición del crecimiento tumoral de A549, con ICT del 28 % con respecto al control en el 35 día del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor del crecimiento de las células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 0 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercieron un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

30 Experimento B. En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $7 \times 10^6$  células A549 suspensas en 0,1 ml de la mezcla HBSS:Matrigel 3:1 usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 17 día del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 100\text{-}120 \text{ mm}^3$  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. 11<sup>a</sup> (40 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días. En el 34 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 3 y Fig. 4 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención de Ej. 11<sup>a</sup> y comparativamente rhTRAIL114-281.

40 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 3 y 4 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral de A549, con ICT del 45 % con respecto al control en el día 34 de experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la 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, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

## 45 Experimento C.

50 En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $5 \times 10^6$  células NCI-H460-Luc2 suspensas en 0,1 ml de tampón HBSS usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 11 día del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 100\text{-}120 \text{ mm}^3$  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. 11<sup>a</sup> (40 mg/kg y 30 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días (en caso de proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup>

primero administración a una dosis 40 mg/kg y luego a 30 mg/kg. En el 29 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

5 Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 5 y Fig. 6 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281.

10 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 5 y 6 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral NCI-H460-Luc2, con ICT del 93 % con respecto al control en el 29 día de experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la referencia comparativa, se obtuvo un efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 76 %. Así, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

#### Modelo de cáncer de próstata

15 En el día 0, se injertaron ratones Cby.Cg-foxn1(nu)/J por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $5 \times 10^6$  células PC3 suspensas en 0,18 ml de tampón HBSS y 0,02 ml de Matrigel usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 29 día del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 90 \text{ mm}^3$  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. 11<sup>a</sup> (15 mg/kg) y 0,9 % de NaCl como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) una vez al día durante 6 días. En el 60 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 7 y Fig. 8 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup>.

25 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 7 y 8 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral PC3, con ICT del 33 % con respecto al control en el día 60 de experimento.

30 La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

#### Modelo de cáncer de páncreas

##### Experimento A en células PANC-1

35 En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $5 \times 10^6$  células PANC-1 suspensas en 0,1 ml de la mezcla HBSS:Matrigel 3:1 usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 31 día del experimento, 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. 11<sup>a</sup> (40 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días. En el 42 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 9 y Fig. 10 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281.

45 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 9 y 10 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral PANC-1, con ICT del 32,6 % con respecto al control en el 42 día de experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 26 %. Así, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

50 La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

Experimento B en células MIA PaCa-2

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en la región del flanco derecho con 5x10<sup>6</sup> células MIA PaCa-2 suspensas en 0,1 ml de mezcla 3:1 de tampón HBSS:Matrigel usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 60-398 mm<sup>3</sup> (día 20), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~170 mm<sup>3</sup> 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. 16<sup>b</sup> (50 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (50 mg/kg) como una comparación y compuesto de referencia gemcitabina (Gemzar, Eli Lilly) (50 mg/kg). Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días, la gemcitabina se aplicó por vía intraperitoneal (*i.p.*) en el mismo programa. El grupo de control recibió el tampón de formulación.

Cuando un grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~1000 mm<sup>3</sup>, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> afectados con carcinoma pancreático MIA PaCa-2 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281 y gemcitabina se muestran en la Fig. 19 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Figura 20 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

Los resultados del experimento presentados en las Figuras 19 y 20 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral de MIA PaCa-2, con ICT del 93 % con respecto al control en el 61<sup>o</sup> día del experimento. Para rhTRAIL114-281 y gemcitabina como referencias comparativas, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 68 % y 42,6 %, respectivamente. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercieron un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola y la quimioterapia convencional.

Modelo de cáncer de colonExperimento A en células HCT116

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con 5x10<sup>6</sup> células HCT116 suspensas en 0,1 ml de tampón HBSS usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el día 18 del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~400 mm<sup>3</sup> 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. 11<sup>a</sup> (35 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (20 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 95 mM, NaCl 200 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, sacarosa 80 mM, pH 8,0) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) 6 veces una vez al día cada dos días. En el 32 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 11 y Fig. 12 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control en ratones tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281.

Los resultados experimentales presentados en la Fig. 11 y 12 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral HCT116, con ICT del 33,5 % con respecto al control en el día 32 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibidor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 5,6 %. Así, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

Experimento A1 en células HCT116

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en la región del flanco derecho con 5x10<sup>6</sup> células HCT116 suspensas en 0,1 ml de la mezcla 3:1 de tampón HBSS:Matrigel usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 71-432 mm<sup>3</sup> (día 13), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~180 mm<sup>3</sup> 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. 16<sup>b</sup> (90 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (65 mg/kg) como una comparación. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días. El grupo de control recibió tampón de formulación.

Cuando un grupo experimental alcanzó el tamaño de tumor promedio de ~1000 mm<sup>3</sup>, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

Los resultados experimentales obtenidos en ratones CrLSHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> afectados con cáncer de colon HCT116 tratados con proteínas de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 21 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Figura 22 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

- 5 Los resultados de experimentos presentados en las Figuras 21 y 22 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral HCT116, con ICT del 65,8 % con respecto al control en el 24° día del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 37,9 %. Así, las proteínas de fusión de la invención ejercieron un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

10

#### Experimento B en células SW620

- 15 En el día 0, se injertaron ratones CrI:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con 5x10<sup>6</sup> células SW620 suspensas en 0,1 ml de la mezcla HBSS:Matrigel 3:1 usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 17 día del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~320 mm<sup>3</sup> 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. 16<sup>a</sup> (20 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días. En el día 31 del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

20

Los resultados experimentales en ratones CrI:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> afectados con SW620 tratados con la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> y comparativamente con rhTRAIL114-281 se muestran en la Fig. 13 y Fig. 14 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

- 25 Los resultados experimentales presentados en la Fig. 13 y 14 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento del tumor SW620, con ICT igual al 25 % en comparación con el control en el día 31 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la 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 ejercieron un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

30

La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

#### Experimento C en células Colo205

- 35 En el día 0, se injertaron ratones CrI:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con 5x10<sup>6</sup> células Colo205 suspensas en 0,1 ml de tampón HBSS usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el día 13 del experimento, los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de ~115 mm<sup>3</sup> y se asignaron a grupos de tratamiento.

40

Los grupos de tratamiento se administraron con las preparaciones de proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> (30 mg/kg), y rhTRAIL114-281 (30 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (i.v.) 6 veces una vez al día cada dos días. En el 33 día del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

- 45 Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 15 y Fig. 16 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como el porcentaje de control.

50

Los resultados experimentales presentados en la Fig. 15 y 16 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral Colo205, con ICT igual al 80 % con respecto al control en el día 33 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la 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 ejercieron un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

55

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

55

Modelo de sarcoma uterino multiresistente

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en el lado derecho con  $7 \times 10^6$  células MES-SA/Dx5 suspensas en 0,1 ml de la mezcla HBSS:Matrigel 10:1 usando jeringa con una aguja 0,5 x 25 mm (Bogmark). En el 19 día del experimento, 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 la preparación de proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> (30 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (10 mg/kg) como una comparación contra el tampón de formulación (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 19 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 81 mM, NaCl 50 mM, glutatión 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM, 10 % de glicerol, pH 7,4) como control. Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) 6 veces una vez al día cada dos días. En el día 35 del experimento, los ratones se sacrificaron por rotura de la médula espinal.

Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 17 y Fig. 18 como un diagrama de cambios del volumen del tumor e inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

Los resultados experimentales presentados en la Fig. 17 y 18 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 11<sup>a</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral MES-SA/Dx5, con ICT igual al 81 % con respecto al control en el día 35 del experimento. Para rhTRAIL114-281 usada como la 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, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola.

La proteína de fusión probada no produjo efectos secundarios significativos manifestados por una disminución en el peso corporal de los ratones (es decir, menos del 10 % del peso corporal inicial). Esto muestra la baja toxicidad sistémica de la proteína de la invención.

Modelo de cáncer de hígadoExperimento A en células HepG2

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en la región del flanco derecho con  $7 \times 10^6$  células HepG2 suspensas en 0,1 ml de la mezcla 3:1 de tampón HBSS:Matrigel usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de  $64\text{-}529 \text{ mm}^3$  (día 25), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 230 \text{ mm}^3$  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. 16<sup>b</sup> (80 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (50 mg/kg) como una comparación y compuesto de referencia 5-FU (5-fluorouracilo, Sigma-Aldrich) (20 mg/kg). Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días, 5-FU se aplicó por vía intraperitoneal (*i.p.*). El grupo de control recibió tampón de formulación.

Cuando el grupo terapéutico alcanzó el tamaño de tumor promedio de  $\sim 1000 \text{ mm}^3$ , los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Fig. 23 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Figura 24 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

Los resultados del experimento presentados en las Figuras 23 y 24 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>b</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral HepG2, con ICT del 94,6 % con respecto al control en el 42° día del experimento. Para rhTRAIL114-281 como referencia comparativa, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 23,2 %. El compuesto de referencia, 5-FU, no mostró ninguna eficacia contra tumores HepG2. Así, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola y la quimioterapia convencional.

Experimento B en células PLC/PRF/5

En el día 0, se injertaron ratones Crl:SHO-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup> por vía subcutánea (s.c.) en la región del flanco derecho con  $7 \times 10^6$  células PLC/PRF/5 suspensas en 0,1 ml de la mezcla 3:1 de tampón HBSS:Matrigel usando jeringa con una aguja de 0,5 x 25 mm (Bogmark). Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de  $72\text{-}536 \text{ mm}^3$  (día 29), los ratones se aleatorizaron para obtener el tamaño promedio de tumores en el grupo de  $\sim 205 \text{ mm}^3$  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. 16<sup>b</sup> (50 mg/kg) y rhTRAIL114-281 (50 mg/kg) como una comparación y compuesto de referencia 5-FU (5-fluorouracilo, Sigma-Aldrich) (30 mg/kg). Las preparaciones se administraron por vía intravenosa (*i.v.*) seis veces cada dos días, excepto 5-FU, que se aplicó por vía intraperitoneal (*i.p.*) en el programa (q1dx5)x2. El grupo de control recibió el tampón de formulación.

Cuando un grupo experimental alcanzó el tamaño de tumor promedio de  $\sim 1000 \text{ mm}^3$ , los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Fig. 25 como un diagrama de cambios del volumen del tumor y en la Figura 26 que muestra la inhibición del crecimiento tumoral (% de ICT) como un porcentaje de control.

Los resultados del experimento presentados en las Figuras 25 y 26 muestran que la administración de la proteína de fusión de la invención del Ej. 16<sup>o</sup> causó la inhibición del crecimiento tumoral PLC/PRF/5, con ICT del 53 % con respecto al control en el 43<sup>o</sup> día del experimento. Para rhTRAIL114-281 y 5-FU como referencias comparativas, se obtuvo un ligero efecto inhibitor sobre el crecimiento de células tumorales con respecto al control, con ICT al nivel del 25,2 % y 32,2 %, respectivamente. Así, la proteína de fusión de la invención ejerció un efecto mucho más fuerte en comparación con TRAIL sola y la quimioterapia convencional.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> ADAMED  
 PIECZYKOLAN Jerzy Szczepan  
 PAWLAK Sebastian Dominik  
 ZEREK Bartłomiej Maciej  
 RÓZGA Piotr Kamil
- 15 <120> PROTEÍNA DE FUSIÓN ANTINEOPLÁSICA
- <130> P070 02 PL
- <160> 132
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 4  
 <211> 227
- 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Péptido de fusión
- 30 <400> 4

ES 2 655 828 T3

Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val  
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu  
 20 25 30

Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys  
 35 40 45

Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu  
 50 55 60

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

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys  
 85 90 95

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

Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr  
 115 120 125

Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu  
 130 135 140

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

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

Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly  
 180 185 190

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

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

Leu Val Gly  
 225

5 <210> 5  
 <211> 264

ES 2 655 828 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Péptido de fusión

<400> 5

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile  
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln 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

ES 2 655 828 T3

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 Cys Ala Ala Cys Ala  
 180 185 190  
 Ala Ala Cys Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg  
 195 200 205  
 Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val  
 210 215 220  
 Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu  
 225 230 235 240  
 Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys  
 245 250 255  
 Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln  
 260

<210> 6

5 <211> 299

<212> PRT

ES 2 655 828 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

5

<400> 6

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile  
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln 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

ES 2 655 828 T3

165

170

175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Ser Gly Cys Ala  
 180 185 190

Ala Cys Ala Ala Ala Cys Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg  
 195 200 205

Gly Lys Leu Ser Cys Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ile Ile Leu Ile Leu  
 210 215 220

Ala Ile Val His Ser Pro Asn Met Glu Val Lys Ala Leu Ala Asp Pro  
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Ala Phe Gly Glu Ala Asn Ala Phe Gly Glu Ala Asp Ala  
 245 250 255

Phe Ala Glu Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Met Lys Lys Ala Ile Lys  
 260 265 270

Glu Ile Leu Asp Cys Val Ile Glu Lys Gly Tyr Asp Lys Leu Ala Ala  
 275 280 285

Lys Leu Lys Lys Val Ile Gln Gln Leu Trp Glu  
 290 295

<210> 11

<211> 202

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 11

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His

ES 2 655 828 T3

35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Val Val Arg Pro Leu  
165 170 175

Gly Leu Ala Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys  
180 185 190

Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
195 200

<210> 12

<211> 205

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 12

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu



ES 2 655 828 T3

<400> 13

Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile  
1 5 10 15

Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln 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 Gly Gly Gly Gly Ser  
180 185 190

Gly Gly Gly Gly Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Arg  
195 200 205

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala  
210 215 220

Lys Leu Ala Lys  
225

ES 2 655 828 T3

<210> 14

<211> 192

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 14

10

His His His His His His Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala  
 1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Cys Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala 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

ES 2 655 828 T3

<210> 15

<211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 15

His His His His His His Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala  
1 5 10 15

Lys Leu Ala Lys Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Val Val  
20 25 30

Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly 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

ES 2 655 828 T3

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

<210> 16

<211> 202

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 16

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

ES 2 655 828 T3

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
165 170 175

Arg Val Val Arg Lys Leu Ala Lys  
180 185 190

Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
195 200

<210> 18

<211> 203

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 18

Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Phe Phe Lys Arg Ile Val  
1 5 10 15

Gln Arg Ile Phe Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val Arg Val Val Arg Pro  
20 25 30

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

ES 2 655 828 T3

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

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

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

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

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met  
 115 120 125

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu  
 130 135 140

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

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

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

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 195 200

<210> 19

<211> 203

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 19

Gly Gly Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg Ala Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

ES 2 655 828 T3

Tyr Gly Pro Ile Ile Val Pro Ile Ile Arg Ile Arg Val Val Arg Pro  
 20 25 30

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

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

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

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

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

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met  
 115 120 125

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu  
 130 135 140

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

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

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

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 195 200

<210> 20

<211> 200

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 20

ES 2 655 828 T3

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 130 135 140

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg  
 165 170 175

Gly Leu Val Glu Thr Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ile Asp Lys  
 180 185 190

Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Gly  
 195 200

<210> 21

5 <211> 200

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 655 828 T3

<223> Péptido de fusión

<400> 21

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
130 135 140

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

5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg  
165 170 175

Gly Phe Ile Ala Thr Leu Thr Lys Val Leu Asp Phe Gly Ile Asp Lys  
180 185 190

Leu Ile Gln Leu Ile Glu Asp Lys  
195 200

<210> 22

<211> 200

ES 2 655 828 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Péptido de fusión

<400> 22

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

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

ES 2 655 828 T3

130 135 140

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg  
 165 170 175

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

Leu Val Lys Leu Ile Glu Asn His  
 195 200

<210> 23

<211> 190

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 23

Gly Leu Leu Glu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Glu Gly Arg Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp

ES 2 655 828 T3

			100						105						110
Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro
		115					120					125			
Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala
	130					135					140				
Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys
145					150					155					160
Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp
				165					170					175	
Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly		
			180					185					190		

<210> 29

<211> 224

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 29

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







ES 2 655 828 T3

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 32

5

Asp Val Ile Arg Glu Tyr Leu Met Phe Asn Glu Leu Ser Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Glu Ser Val Arg Ser Arg Phe Ser Ser Ile Tyr Gly Thr  
20 25 30

Asn Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Asn Glu Thr Tyr Phe Asn Ala Val  
35 40 45

Lys Pro Pro Ile Thr Ala Gln Tyr Gly Tyr Tyr Cys Tyr Lys Asn Val  
50 55 60

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

Ile Leu Ala Gln Asp Thr Leu Thr Asn Asn Thr Asn Glu Pro Phe Thr  
85 90 95

Thr Thr Ile Thr Ile Thr Gly Ser Phe Thr Asn Thr Ser Thr Val Thr  
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Thr Gly Phe Lys Phe Thr Ser Lys Leu Ser Ile Lys  
115 120 125

Lys Val Phe Glu Ile Gly Gly Glu Val Ser Phe Ser Thr Thr Ile Gly  
130 135 140

Thr Ser Glu Thr Thr Thr Glu Thr Ile Thr Val Ser Lys Ser Val Thr  
145 150 155 160

Val Thr Val Pro Ala Gln Ser Arg Arg Thr Ile Gln Leu Thr Ala Lys  
165 170 175

ES 2 655 828 T3

Ile Ala Lys Glu Ser Ala Asp Phe Ser Ala Pro Ile Thr Val Asp Gly  
 180 185 190

Tyr Phe Gly Ala Asn Phe Pro Lys Arg Val Gly Pro Gly Gly His Tyr  
 195 200 205

Phe Trp Phe Asn Pro Ala Arg Asp Val Leu Asn Thr Thr Ser Gly Thr  
 210 215 220

Leu Arg Gly Thr Val Thr Asn Val Ser Ser Phe Asp Phe Gln Thr Ile  
 225 230 235 240

Val Gln Pro Ala Arg Ser Leu Leu Asp Glu Gln Arg Val Val Arg Pro  
 245 250 255

Leu Gly Leu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Arg  
 260 265 270

Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser  
 275 280 285

Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg  
 290 295 300

Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser  
 305 310 315 320

Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe  
 325 330 335

Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys  
 340 345 350

Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr  
 355 360 365

Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser  
 370 375 380

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





ES 2 655 828 T3

Met Arg Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly Glu  
50 55 60

Thr Ala Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg Leu Cys Ile Pro Ser Thr  
65 70 75 80

Gly Pro Leu

<210> 35

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

10

<300>

<301> Papo N, Shahar M, Eisenbach L, Shai Y.

<302> A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice.

<303> J. Biol. Chem.

15 <304> 278

<305> 3

<306> 21018-23

<307> 06-06-2003

20 <400> 35

Lys Leu Leu Leu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Leu Arg Leu Leu Lys  
1 5 10 15

<210> 36

25 <211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> efector

ES 2 655 828 T3

<300>

<308> Swiss-Prot/Q07932.1

<309> 11-01-2011

<313> (57)..(112)

5

<400> 36

```
Gly Leu Gly Ser Val Phe Gly Arg Leu Ala Arg Ile Leu Gly Arg Val
 1                               5 10 15
Ile Pro Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Pro Lys Val Ala Lys Val Leu
 20 25 30
Pro Lys Val Met Lys Glu Ala Ile Pro Met Ala Val Glu Met Ala Lys
 35 40 45
Ser Gln Glu Glu Gln Gln Pro Gln
 50 55
```

10

<210> 37

<211> 90

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> efector

<300>

20

<308> GenBank/BAF95069.1

<309> 04-08-2008

<313> (2)..(91)

<400> 37

25

ES 2 655 828 T3

Lys Leu Ser Cys Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ile Ile Leu Ile Leu Ala  
1 5 10 15

Ile Val His Ser Pro Asn Met Glu Val Lys Ala Leu Ala Asp Pro Glu  
20 25 30

Ala Asp Ala Phe Gly Glu Ala Asn Ala Phe Gly Glu Ala Asp Ala Phe  
35 40 45

Ala Glu Ala Asn Ala Asp Val Lys Gly Met Lys Lys Ala Ile Lys Glu  
50 55 60

Ile Leu Asp Cys Val Ile Glu Lys Gly Tyr Asp Lys Leu Ala Ala Lys  
65 70 75 80

Leu Lys Lys Val Ile Gln Gln Leu Trp Glu  
85 90

<210> 38

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

10

<300>

<308> GenBank/AAA63538.1

<309> 07-03-1995

<313> (24)..(40)

15

<400> 38

Lys Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Ile Cys Tyr Arg Arg Cys  
1 5 10 15

Arg

20 <210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

5

<300>

<301> Liu S, Yang H, Wan L, Cai HW, Li SF, Li YP, Cheng JQ, Lu XF.

<302> Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery

10

<303> Acta Pharmacol. Sin.

<304> 32

<305> 1

<306> 79-88

<307> 01-01-2011

15

<400> 39

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser Gly Gly Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp  
20 25 30

Ala Val Gly His Leu Met  
35

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> efector

<300>

<308> Swiss-Prot/P11006.1

30

<309> 30-11-2010

<313> (83)..(105)

ES 2 655 828 T3

<400> 40

Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Lys Lys Phe Gly Lys Ala Phe  
1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Met Asn Ser  
20

<210> 41

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> efector

<300>

<301> avadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML

<302> De novo antimicrobial Peptides with low mammalian cell toxicity

15 <303> J. Med. Chem.

<304> 39

<305> 16

<306> 3107-13

<307> 02-08-1996

20

<400> 41

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
1 5 10

25 <210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> efector

<300>

<301> M., Velasco, M., J., Diaz-Guerra, P., Diaz-Achirica, D., Andreu, L., Rivas y L., Bosca,  
<302> Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase  
expression  
<303> The Journal of Immunology  
5 <304> 158  
<305> 9  
<306> 4437-4443  
<307> 13-09-1997  
10 <400> 42  
  
Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val  
1 5 10 15  
  
Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser  
20 25  
  
<210> 43  
15 <211> 27  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
20 <223> efector  
  
<300>  
<301> Isogai E.  
25 <302> Antimicrobial and Lipopolysaccharide-Binding Activities of C-Terminal Domain of Human CAP18  
Peptides to Genus Leptospira  
<303> The Journal of Applied Research  
<304> 4  
<305> 1  
<306> 180-185  
30 <307> 01-12- 2004  
  
<400> 43

ES 2 655 828 T3

Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Phe Phe Lys Arg Ile Val  
1 5 10 15

Gln Arg Ile Phe Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val  
20 25

<210> 44

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

10

<300>

<301> Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macr? F, Skerlavaj B, Zanetti M, Gennaro R, Bernardi P.

<302> MAP-28, an antibiotic oepide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore.

15

<303> Mol. Cell. Biol.

<304> 22

<305> 6

<306> 1926-35

<307> 03-2002

20

<400> 44

Gly Gly Leu Arg Ser Leu Gly Arg Lys Ile Leu Arg Ala Trp Lys Lys  
1 5 10 15

Tyr Gly Pro Ile Ile Val Pro Ile Ile Arg Ile  
20 25

25

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> efector

<300>

<301> Andrä J, Berninghausen O, Wülfken J, Leippe M.

<302> Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity.

<303> FEBS Lett.

5

<304> 385

<305> 12

<306> 96-100

<307> 29-04-1996

10

<400> 45

Gly Leu Val Glu Thr Leu Thr Lys Ile Val Ser Tyr Gly Ile Asp Lys  
1 5 10 15

Leu Ile Glu Lys Ile Leu Glu Gly  
20

<210> 46

15

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> efector

<300>

<301> Andrä J, Berninghausen O, Wülfken J, Leippe M.

<302> Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity.

25

<303> FEBS Lett.

<304> 385

<305> 1

<306> 96-100

<307> 29-04-1996

30

<400> 46



<300>

<301> Ines Neundorf, Robert Rennert, Jan Hoyer, Franziska Schramm, Kristin Löbner Igor Kitanovic y Stefan Wölfl

5 <302> Fusion of a Short HA2-Derived Peptide Sequence to Cell-Penetrating Peptides Improves Cytosolic Uptake, but Enhances Cytotoxic Activity.

<303> Pharmaceuticals

<304> 2

<305> 2

<306> 49-65

10 <307> 2009

<400> 48

Gly Leu Leu Glu Ala Leu Ala Glu Leu Leu Glu Gly  
 1 5 10

15

<210> 49

<211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> efector

<300>

25 <308> GenBank/AAP15462.1

<309> 27-04-2003

<313> (1)..(247)

<400> 49

30

Trp Asp Gly Lys Ile Asp Gly Thr Gly Thr His Ala Met Ile Val Thr  
 1 5 10 15

Gln Gly Val Ser Ile Leu Glu Asn Asp Met Ser Lys Asn Glu Pro Glu  
 20 25 30

Ser Val Arg Lys Asn Leu Glu Ile Leu Lys Asp Asn Met His Glu Leu  
 35 40 45

ES 2 655 828 T3

Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Pro Asp Tyr Asp Lys Asn Ala Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Tyr Gln Asp His Phe Trp Asp Pro Asp Thr Asn Asn Asn Phe Ser Lys  
 65 70 75 80

Asp Asn Ser Trp Tyr Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Asp Thr Gly Glu Ser  
 85 90 95

Gln Ile Arg Lys Phe Ser Ala Leu Ala Arg Tyr Glu Trp Gln Arg Gly  
 100 105 110

Asn Tyr Lys Gln Ala Thr Phe Tyr Leu Gly Glu Ala Met His Tyr Phe  
 115 120 125

Gly Asp Ile Asp Thr Pro Tyr His Pro Ala Asn Val Thr Ala Val Asp  
 130 135 140

Ser Ala Gly His Val Lys Phe Glu Thr Phe Ala Glu Glu Arg Lys Glu  
 145 150 155 160

Gln Tyr Lys Ile Asn Thr Val Gly Cys Lys Thr Asn Glu Asp Phe Tyr  
 165 170 175

Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Asp Phe Asn Ala Trp Ser Lys Glu Tyr  
 180 185 190

Ala Arg Gly Phe Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ser His Ala  
 195 200 205

Ser Met Ser His Ser Trp Asp Asp Trp Asp Tyr Ala Ala Lys Val Thr  
 210 215 220

Leu Ala Asn Ser Gln Lys Gly Thr Ala Gly Tyr Ile Tyr Arg Phe Leu  
 225 230 235 240

His Asp Val Ser Glu Gly Asn  
 245

<210> 50

<211> 468

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 655 828 T3

<223> efector

<300>

<308> GenBank/AAS85208.1

5

<309> 26-08-2008

<313> (57)..(524)

<400> 50

His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys  
1 5 10 15

Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro  
20 25 30

Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys  
35 40 45

Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala  
50 55 60

Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu  
65 70 75 80

Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu  
85 90 95

Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile  
100 105 110

Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr  
115 120 125

Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val  
130 135 140

Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln  
145 150 155 160

Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu

10

ES 2 655 828 T3

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

ES 2 655 828 T3

Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn  
385 390 395 400

Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly  
405 410 415

Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala  
420 425 430

Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val  
435 440 445

Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr  
450 455 460

Ser Asn Ser Val  
465

<210> 51

<211> 289

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

10

<300>

<308> genbank/ABG57041.1

<309> 06-05-2011

<313> (5)..(292)

15

<400> 51

ES 2 655 828 T3

Lys Phe Lys Lys Val Val Leu Gly Met Cys Leu Thr Ala Ser Val Leu  
1 5 10 15

Val Phe Pro Val Thr Ile Lys Ala Ser Ala Cys Cys Asp Glu Tyr Leu  
20 25 30

Lys Pro Pro Ala Ala Pro His Asp Ile Asp Ser Lys Leu Pro His Lys  
35 40 45

Leu Ser Trp Ser Ala Asp Asn Pro Thr Asn Thr Asp Val Asn Thr His  
50 55 60

ES 2 655 828 T3

Tyr Trp Leu Phe Lys Gln Ala Glu Lys Ile Leu Ala Lys Asp Val Asp  
65 70 75 80

His Met Arg Ala Asn Leu Met Asn Glu Leu Lys Asn Phe Asp Lys Gln  
85 90 95

Ile Ala Gln Gly Ile Tyr Asp Ala Asp His Lys Asn Pro Tyr Tyr Asp  
100 105 110

Thr Ser Thr Phe Leu Ser His Phe Tyr Asn Pro Asp Lys Asp Asn Thr  
115 120 125

Tyr Leu Pro Gly Phe Ala Asn Ala Lys Ile Thr Gly Ala Lys Tyr Phe  
130 135 140

Asn Gln Ser Val Ala Asp Tyr Arg Glu Gly Lys Phe Asp Thr Ala Phe  
145 150 155 160

Tyr Lys Leu Gly Leu Ala Ile His Tyr Tyr Thr Asp Ile Ser Gln Pro  
165 170 175

Met His Ala Asn Asn Phe Thr Ala Ile Ser Tyr Pro Pro Gly Tyr His  
180 185 190

Cys Ala Tyr Glu Asn Tyr Val Asp Thr Ile Lys His Asn Tyr Gln Ala  
195 200 205

Thr Glu Asp Met Val Val Gln Arg Phe Cys Ser Asn Asp Val Lys Glu  
210 215 220

Trp Leu Tyr Glu Asn Ala Lys Arg Ala Lys Ala Asp Tyr Pro Lys Ile  
225 230 235 240

Val Asn Ala Lys Thr Lys Lys Ser Tyr Leu Val Gly Asn Ser Glu Trp  
245 250 255

Lys Lys Asp Thr Val Glu Pro Thr Gly Ala Arg Leu Arg Asp Ser Gln  
260 265 270

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

Gly

<210> 52

5 <211> 179

<212> PRT

ES 2 655 828 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

5

<300>

<308> PDB/1KD6\_A

<309> 10-07-2009

<313> (1)..(179)

10

<400> 52

Ser Ala Asp Val Ala Gly Ala Val Ile Asp Gly Ala Ser Leu Ser Phe  
1 5 10 15

Asp Ile Leu Lys Thr Val Leu Glu Ala Leu Gly Asn Val Lys Arg Lys  
20 25 30

Ile Ala Val Gly Val Asp Asn Glu Ser Gly Lys Thr Trp Thr Ala Leu  
35 40 45

Asn Thr Tyr Phe Arg Ser Gly Thr Ser Asp Ile Val Leu Pro His Lys  
50 55 60

Val Pro His Gly Lys Ala Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Asp Arg Gly  
65 70 75 80

Pro Val Ala Thr Gly Ala Val Gly Val Leu Ala Tyr Leu Met Ser Asp  
85 90 95

Gly Asn Thr Leu Ala Val Leu Phe Ser Val Pro Tyr Asp Tyr Asn Trp  
100 105 110

Tyr Ser Asn Trp Trp Asn Val Arg Ile Tyr Lys Gly Lys Arg Arg Ala  
115 120 125

ES 2 655 828 T3

Asp Gln Arg Met Tyr Glu Glu Leu Tyr Tyr Asn Leu Ser Pro Phe Arg  
130 135 140

Gly Asp Asn Gly Trp His Thr Arg Asn Leu Gly Tyr Gly Leu Lys Ser  
145 150 155 160

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

Thr Lys Ala

<210> 53

<211> 46

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

10

<300>

<308> Swiss-Prot/P01538.2

<309> 31-05-2011

<313> (27)..(72)

15

<400> 53

Lys Ser Cys Cys Pro Asn Thr Thr Gly Arg Asn Ile Tyr Asn Ala Cys  
1 5 10 15

Arg Leu Thr Gly Ala Pro Arg Pro Thr Cys Ala Lys Leu Ser Gly Cys  
20 25 30

Lys Ile Ile Ser Gly Ser Thr Cys Pro Ser Asp Tyr Pro Lys  
35 40 45

20 <210> 54

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 655 828 T3

<220>

<223> efector

<300>

5 <308> GenBank/CAA31612.1

<309> 07-10-2008

<313> (21)..(53)

<400> 54

10

Ala Pro Cys His Thr Ala Ala Arg Ser Glu Cys Lys Arg Ser His Lys  
1 5 10 15

Phe Val Pro Gly Ala Trp Leu Ala Gly Glu Gly Val Asp Val Thr Ser  
20 25 30

Leu

<210> 55

<211> 251

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> efector

20

<300>

<308> PDB/2ZTB\_A

<309> 27-03-2009

<313> (2)..(251)

25

<400> 55

ES 2 655 828 T3

Asp Val Ile Arg Glu Tyr Leu Met Phe Asn Glu Leu Ser Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Glu Ser Val Arg Ser Arg Phe Ser Ser Ile Tyr Gly Thr  
 20 25 30

Asn Pro Asp Gly Ile Ala Leu Asn Asn Glu Thr Tyr Phe Asn Ala Val  
 35 40 45

Lys Pro Pro Ile Thr Ala Gln Tyr Gly Tyr Tyr Cys Tyr Lys Asn Val  
 50 55 60

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

Ile Leu Ala Gln Asp Thr Leu Thr Asn Asn Thr Asn Glu Pro Phe Thr  
 85 90 95

Thr Thr Ile Thr Ile Thr Gly Ser Phe Thr Asn Thr Ser Thr Val Thr  
 100 105 110

Ser Ser Thr Thr Thr Gly Phe Lys Phe Thr Ser Lys Leu Ser Ile Lys  
 115 120 125

Lys Val Phe Glu Ile Gly Gly Glu Val Ser Phe Ser Thr Thr Ile Gly  
 130 135 140

Thr Ser Glu Thr Thr Thr Glu Thr Ile Thr Val Ser Lys Ser Val Thr  
 145 150 155 160

Val Thr Val Pro Ala Gln Ser Arg Arg Thr Ile Gln Leu Thr Ala Lys  
 165 170 175

Ile Ala Lys Glu Ser Ala Asp Phe Ser Ala Pro Ile Thr Val Asp Gly  
 180 185 190

Tyr Phe Gly Ala Asn Phe Pro Lys Arg Val Gly Pro Gly Gly His Tyr  
 195 200 205

Phe Trp Phe Asn Pro Ala Arg Asp Val Leu Asn Thr Thr Ser Gly Thr  
 210 215 220

Leu Arg Gly Thr Val Thr Asn Val Ser Ser Phe Asp Phe Gln Thr Ile  
 225 230 235 240

Val Gln Pro Ala Arg Ser Leu Leu Asp Glu Gln  
 245 250

ES 2 655 828 T3

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> efector

<300>

10 <302> SELECTIVE ANTICANCER CHIMERIC PEPTIDE

<310> WO2010064207

<311> 03-12-2009

<312> 10-06-2010

15

<400> 56

Tyr Lys Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile Gly Gly Gly Lys  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Lys  
20 25 30

<210> 60

20

<211> 681

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Péptido de fusión

<400> 60

ES 2 655 828 T3

```

ggctctgggta gcgtttttgg tcgtctggca cgtattctgg gtcgtgttat tccgaaagtt      60
gcaaaaaaac tgggtccgaa agtggcctaaa gttctgccga aagttatgaa agaagcaatt      120
ccgatggcag ttgaaatggc aaaaagccaa gaagaacagc agccgcagcg tgttgttcgt      180
ccgctggggtc tggcaggtcg tgttgacagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat      240
accctgagca gcccgaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaaat caatagctgg      300
gaaagcagcc gtagcgggtca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg      360
gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctattttcg cttcaagaa      420
gagattaaag aaaataccaa aatgataaa caaatgggtgc agtacattta caaatatacc      480
agctatccgg acccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat      540
gcagaatatg gtctgtatag cttttatcag ggtggcatct ttgagctgaa agaaaatgat      600
cgcatctttg ttagcgtgac caacgaacat ctgatcgata tggatcatga agccagcttt      660
tttgggtgcat ttctggtggg t                                             681

```

<210> 61

<211> 792

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 61

ES 2 655 828 T3

accagcgaag aaaccattag caccgttcaa gaaaaacagc agaatattag tccgctggtt 60  
 cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120  
 accctgagca gcccgaatag caaaaatgaa aaagccctgg gtcgcaaaat taacagctgg 180  
 gaaagcagcc gtagcggcca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg 240  
 gtgattcacg agaaaggctt ctattatatac tatagccaga cctattttcg cttcaagaa 300  
 gaaattaaag aaaacaccaa aatgataaa caaatgggtgc agtatattta caaatatacc 360  
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420  
 gcagaatatg gcctgtatag catctatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaacgat 480  
 cgcatctttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcacga agccagcttt 540  
 tttggtgcat ttctggttgg ttgtgcagca tgtgcagccg catgtggtgg tggccgctg 600  
 ggtctggcag gtcgtgttgt tcgtggtctg ggtagcgttt ttggtcgtct ggcacgtatt 660  
 ctgggtcgtg ttattccgaa agttgcaaaa aactgggtc cgaaagtggc caaagtctg 720  
 ccgaaagtta tgaaagaagc aattccgatg gccgttgaaa tggcaaaaag ccaagaagaa 780  
 cagcagccgc ag 792

<210> 62

<211> 897

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 62

accagcgaag aaaccattag caccgttcaa gaaaaacagc agaatattag tccgctggtt 60  
 cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120  
 accctgagca gcccgaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaaat caatagctgg 180  
 gaaagcagcc gtagcggcca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg 240  
 gtgattcatg aaaaaggctt ctactatatac tatagccaga cctattttcg cttcaagaa 300  
 gaaatcaaag aaaataccaa aatgataaa caaatgggtgc agtatattta caaatatacc 360  
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420  
 gcagaatatg gtctgtatag catttatcag ggtggcatct ttgagctgaa agaaaatgat 480

ES 2 655 828 T3

cgcatctttg ttagcgtgac caacgaacat ctgatcgata tggatcatga agccagcttt 540  
 tttgggtgcat ttctgggttg tggtagcggg tgtgcagcat gtgcagccgc atgtccgctg 600  
 ggtctggcag gtcgtggttgc tcgtggtaaa ctgagctgtc tgagcctggc actggcaatt 660  
 attctgattc tggcaattgt tcatagcccg aatatggaag ttaaagcact ggcagatccg 720  
 gaagcagatg catttgggtga agcaaatgcc tttggcgaag ccgatgcggt tgccgaagcc 780  
 aatgcagatg ttaaaggtat gaaaaaagcc attaaagaaa ttctggattg cgtgatcgag 840  
 aaaggctatg ataaactggc agccaaactg aaaaaagtta ttcagcagct gtgggaa 897

<210> 67

<211> 606

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 67

cgtgttgacag cacatattac cggcaccctg gtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60  
 agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggg 120  
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tgggtattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatctt cgctttcaag aagaaattaa agaaaaaccc 240  
 aaaaatgata acaaatggg gacgtatatt tacaatatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat 360  
 agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatctt tgtgagcgtg 420  
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt 480  
 ggtgggtggtg gcggtagcgg tgggtgggtg cgtgttgttc gtccgctggg tctggcaggt 540  
 cgtcgtcgtc gccgtcgtcg gcgtaaaactg gcaaaaactgg ccaaaaaact ggcgaaactg 600  
 gctaaa 606

15

<210> 68

<211> 615

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 655 828 T3

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 68

5

```
cggtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca atacctgag cagcccgaat      60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggg      120
catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tgggtgattca tgaaaaaggc      180
ttttattata tttatagcca gacctatfff cgctttcaag aagaaattaa agaaaacacc      240
aaaaatgata aacaaatggg gcagtatatc tacaatatata ccagctatcc ggatccgatt      300
ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat      360
agcattttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatfff tgtgagcgtg      420
accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt      480
gggtgggtgg caagcgggtg tggccgggaa ggtgggtggg gtccgctggg tctggcaggt      540
cgtgttgttc gtcgtcgtcg tcgccgtcgc cgtaaactgg caaaactggc caaaaaactg      600
gcgaaactgg ctaaa                                             615
```

<210> 69

<211> 684

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

15

<400> 69

ES 2 655 828 T3

accagcgaag aaaccattag caccgttcag gaaaaacagc agaatattag tccgctggtt 60  
 cgtagaacgtg gtccgcagcg tgttcagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120  
 accctgagca gcccgaatag caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaaat taatagctgg 180  
 gaaagcagcc gtagcgggtca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggggaactg 240  
 gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctattttcg ctttcaggaa 300  
 gaaattaaag aaaataccaa aatgataaa caaatgggtc agtatatcta taaatacacc 360  
 agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420  
 gcagaatatg gtctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480  
 cgcatTTTTg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540  
 tttgggtcat ttctggttgg tgggtggggc ggtagcgggtg gtgggtggcg tgttgttcgt 600  
 ccgctgggtc tggcaggtcg tcgtcgtcgt agacgtcgtc gtaaactggc aaaactggcc 660  
 aaaaaactgg cgaaactggc taaa 684

<210> 70

5 <211> 576

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido de fusión

<400> 70

catcatcatc accatcacia actggcaaaa ctggcaciaa aactggcgaa actggctaaa 60  
 tgtcgtgttg ttcgtccgct gggctctggca ggtcgtgttg cagcacatat taccggcacc 120  
 cgtggctgta gcaataccct gagcagcccc aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 180  
 aaaatcaata gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 240  
 cgtaatgggtg aactgggtgat tcatgaaaaa ggctttttatt atatttatag ccagacctat 300  
 tttcgtttc aagaagagat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtat 360  
 atctataaat ataccagcta tccggacccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc 420  
 tgttgagca aagatgcaga atatggctctg tatagcattt atcagggtgg catctttgag 480  
 ctgaaagaaa atgatcgcac ctttgttagc gtgaccaacg aacatctgat cgatatggat 540  
 catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gtgggt 576

ES 2 655 828 T3

<210> 71

<211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 71

10

```
catcatcatc accatcacia actggcaaaa ctggcAAAA aactggcgaa actggctaaa      60
tgtcgtcgtc gtcgccgtcg gcgtcgtcgt gttgttcgtc cgctgggtct ggcaggctcgt    120
gttgcagcac atattaccgg caccctgggt cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc      180
aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatc aatagctggg aaagcagccg tagcggtcac      240
agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttt      300
tattatattt atagccagac ctattttcgc tttcaagaag agattaaaga aaatacaaaa      360
aatgataaac aaatggtgca gtatatctat aaatacacca gctatccgga cccgattctg      420
ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg tctgtatagc      480
atztatcagg gtggcatctt tgagctgaaa gaaaatgatc gcatctttgt tagcgtgacc      540
aacgaacatc tgatcgatat ggatcatgaa gccagctttt ttggtgcatt tctggtgggt      600
```

<210> 72

15

<211> 606

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Péptido de fusión

<400> 72

ES 2 655 828 T3

cgtgttcag cacatattac cggcaccctg gtcgtagca atacctgag cagcccgaat 60  
 agcaaaaatg aaaaagcact gggctgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggg 120  
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggggaac tgggtgattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatfff cgctttcagg aagaaattaa agaaaatacc 240  
 aaaaatgata acaaatggg gcagtatata tataaataca ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgat 360  
 agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatfff tgtgagcgtg 420  
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctgggt 480  
 ggtgggtggg gcggtagcgg tgggtgggtg cgtgttgffc gtccgctggg tctggcaggt 540  
 cgtcgtcgtc gtagacgtcg tcgtaaactg gcaaaactgg ccaaaaaact ggcgaaactg 600  
 gctaaa 606

<210> 74

<211> 609

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 74

tttcgcaaaa gcaaagaaaa aattggcaaa ttttttaaac gcattgtgca gcgcattfff 60  
 gattttctgc gtaatctggg tcgtgttggt cgtccgctgg gtctggcagg cgaacgtggg 120  
 ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggc gtagcaatac cctgagcagc 180  
 ccgaatagca aaaatgaaaa agcactgggt cgcaaaatta atagctggga aagcagccgt 240  
 agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggg gattcatgaa 300  
 aaaggctfff attatattta tagccagacc tattttcgct ttcaagagga aattaaagaa 360  
 aatacaaaaa atgataaaca aatgggtgag tataatctata aatataccag ctatccggat 420  
 ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaatatggg 480  
 ctgtatagca tttatcaggg tggcattfff gaactgaaag aaaatgatcg catttttgtg 540  
 agcgtgacca atgaacatct gattgatatg gatcatgaag ccagctfff tgggtcattt 600  
 ctggttggg 609

ES 2 655 828 T3

<210> 75

<211> 609

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 75

10

```
ggtggtctgc gtagcctggg tcgtaaaatt ctgcgtgcat ggaaaaaata tgggccgatt      60
attgtgccga ttattcgtat tcgtgttggt cgtccgctgg gtctggcagg cgaacgtggt      120
ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc      180
ccgaatagca aaaatgaaaa agcactgggt cgcaaaatta atagctggga aagcagccgt      240
agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggt gattcatgaa      300
aaaggctttt attatattta tagccagacc tattttcgtt ttcaagagga aattaaagaa      360
aatacAAAA atgataaaca aatggtgcag tataatctata aatataccag ctatccggat      420
ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaatatggt      480
ctgtatagca tttatcaggg tggcattttt gaactgaaag aaaatgatcg catttttgtg      540
agcgtgacca atgaacatct gattgatatg gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcattt      600
ctggttggt                                     609
```

<210> 76

<211> 600

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

20

<400> 76

ES 2 655 828 T3

cggtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60  
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggg 120  
catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatgggtgaac tgggtgattca tgaaaaaggc 180  
ttttattata tttatagcca gacctatfff cgctttcagg aagaaattaa agaaaatacc 240  
aaaaatgata agcagatggg gcagtatatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaaag atgcagaata tggctctgtat 360  
agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatfff tgtgagcgtg 420  
accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt 480  
gggtgggtgta gcggtgggtcc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg tctggttgaa 540  
accctgacca aaattgttag ctatgggtatt gataaactga ttgaaaaaat tctggaaggt 600

<210> 77

<211> 600

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

10

<400> 77

cggtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60  
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggg 120  
catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatgggtgaac tgggtgattca tgaaaaaggc 180  
ttttattata tttatagcca gacctatfff cgctttcagg aagaaattaa agaaaatacc 240  
aaaaatgata agcagatggg gcagtatatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaaag atgcagaata tggctctgtat 360  
agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatfff tgtgagcgtg 420  
accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt 480  
gggtgggtgta gcggtgggtcc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg ttttattgca 540  
accctgacca aagttctgga ttttgggtatt gataaactga ttcagctgat tgaagataaa 600

15

<210> 78

<211> 600

ES 2 655 828 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Péptido de fusión

<400> 78

```
cgtgttcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat      60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcgg      120
catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggatgaac tggatgattca tgaaaaaggc   180
ttttattata tttatagcca gacctatctt cgctttcagg aagaaattaa agaaaaatcc    240
aaaaatgata agcagatggg gcagtatatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt     300
ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat    360
agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatctt tgtgagcgtg     420
accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctggtt     480
ggtaggtgta gcggtgggtc gctgggtctg gcaggtcgtg ttgttcgtgg ttttctgggc    540
accctggaaa aaattctgag ctttgggtgt gatgaactgg ttaaactgat tgaaaatcat     600
```

10

<210> 79

<211> 570

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido de fusión

<400> 79

20

ES 2 655 828 T3

ggtctgctgg aagcactggc agaactgctg gaaggctggc gtcgtcgtcg tcggcgtcgt 60  
 gttgttcgtc cgctgggtct ggcaggctgt gttgcagcac atattaccgg caccctgggt 120  
 cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatt 180  
 aatagctggg aaagcagccg tagcggctcat agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat 240  
 ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttt tattatattt atagccagac ctattttcgc 300  
 tttcaggaag aaattaaaga aaacaccaaa aacgataaac aaatggtgca gtatatctat 360  
 aaatacacca gctatccgga tccgattctg ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg 420  
 agcaaagatg cagaatatgg tctgtatagc atttatcagg gtggcatttt tgaactgaaa 480  
 gaaaatgatc gcatttttgt gagcgtgacc aatgaacatc tgattgatat ggatcatgaa 540  
 gccagctttt ttggtgcatt tctggttgg 570

<210> 86

5

<211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Péptido de fusión

<400> 86

cgtgttgtag cacatattac cggcaccctg gtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 60  
 agcaaaaatg aaaaagcact gggctgcaaa atcaatagct gggaaagcag ccgtagcgg 120  
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tgggtgattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatctt cgctttcaag aagagattaa agaaaaatcc 240  
 aaaaatgata acaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggaccggatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat 360  
 agcatttatc aggggtggcat ctttgagctg aaagaaaatg atcgcatctt tggtagcgtg 420  
 accaacgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttgggtc atttctggtt 480  
 ggtggtggtg gcggtagcgg agcaccgtgt cataccgcag cacgtagcga atgtaaacgt 540  
 agccataaat ttgttccggg tgcattggctg gcaggcgaag gtgttgatgt taccagcctg 600

15

<210> 87

<211> 630

ES 2 655 828 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido de fusión

<400> 87

	cggtttgcag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat	60
	agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa atcaatagct gggaaagcag ccgtagcgg	120
	catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggtgaac tggtagtca tgaaaaaggc	180
	ttttattata tttatagcca gacctatfff cgctttcaag aagagattaa agaaaatacc	240
	aaaaatgata aacaaatggt gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggacccgatt	300
	ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggctctgtat	360
	agcatttatc aggggtggcat ctttgagctg aaagaaaatg atcgcacctt tggtagcgtg	420
	accaacgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtt	480
	ggtggtggtg gcggtagcgg tcgtgttgtt cgtccgctgg gtctggctgg cgcaccgtgt	540
	cataccgcag cacgtagcga atgtaaactg agccataaat ttgttccggg tgcattgctg	600
10	gcaggcgaag gtgttgatgt taccagcctg	630

<210> 88

<211> 1308

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de fusión

20 <400> 88

ES 2 655 828 T3

gatgtgattc gcgaatatct gatgtttaat gaactgagcg cactgagcag cagtccggaa 60  
agcgttcgta gccgttttag cagcatttat ggcaccaatc cggatggtat tgactgaat 120  
aatgaaacct atttcaatgc cgtgaaacct ccgattaccg cacagtatgg ttattattgc 180  
tacaanaatg ttggcaccgt gcagtatggt aatcgtccga ccgatattaa tccgaatggt 240  
attctggcac aggataacct gaccaataat accaatgaac cgtttaccac caccattacc 300  
attaccggtg gctttaccaa taccagcacc gttaccagca gcaccaccac cggtttcaaa 360  
tttaccagca aactgagcat caaaaaagtg tttgaaattg gtggcgaagt gagcttttagc 420  
accaccattg gcaccagcga aaccaccacc gaaaccatta ccgtgagcaa aagcgttacc 480  
gttaccggtc cggcacagag ccgtcgtacc attcagctga ccgcaaaaat tgcaaaagaa 540  
agcgcagatt ttagcgcacc gattaccggt gatggttatt ttggtgcaa ttttccgaaa 600  
cgtgttggtc cgggtggtca ttacttttgg tttaatccgg cacgtgatgt gctgaatacc 660  
accagtggca ccctgcgtgg tacagttacc aatgtttcta gctttgattt tcagaccatt 720  
gttcagcctg cacgtagcct gctggatgaa cagcgtgttg ttcgtccgct gggctctggca 780  
ggcggtagcg gtggtggttc aggtggtggt gaacgtggtc cgcagcgtgt tgacgacat 840  
attaccggca cccgtggtcg tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aatgaaaaa 900  
gcaactgggtc gcaaaatcaa tagctgggaa agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc 960  
aatctgcatc tgcgtaatgg tgaactggtg attcatgaaa aaggcttcta ctatatttac 1020  
agccagacct attttcgctt tcaggaagaa attaaagaaa ataccaaaa tgataaacia 1080  
atggtgcagt atatctataa atacaccagc tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc 1140  
gcacgtaata gctgttggag caaagatgca gaatatggcc tgtatagcat ttatcagggt 1200  
ggcatttttg aactgaaaga aatgatcgc atttttgtga gcgtgaccaa tgaacatctg 1260  
attgatatgg atcatgaagc aagtttcttt ggtgcatttc tgggtgggc 1308

<210> 90

5 <211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

10

ES 2 655 828 T3

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

ES 2 655 828 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 275 280

<210> 91

<211> 223

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

10

<400> 91

ES 2 655 828 T3

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys  
 1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys  
 20 25 30

Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala  
 35 40 45

Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ser Gly Gly Arg Val  
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 92

5 <211> 223

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 655 828 T3

<220>

<223> -

<400> 92

5

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Arg Arg  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 93

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> -

<400> 93

10

ES 2 655 828 T3

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Arg Arg  
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Lys Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp  
 20 25 30

Glu Gln Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser Glu  
 35 40 45

Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu  
 50 55 60

Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr  
 65 70 75 80

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys  
 85 90 95

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His  
 100 105 110

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His  
 115 120 125

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln  
 130 135 140

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr  
 145 150 155 160

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser  
 165 170 175

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser  
 180 185 190

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe  
 195 200 205

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser  
 210 215 220

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
 225 230

<210> 94

5 <211> 207

ES 2 655 828 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> -

<400> 94

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
 165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly  
 180 185 190

Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
 195 200 205

10

ES 2 655 828 T3

<210> 95

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> -

<400> 95

10

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
1                    5                    10                    15

ES 2 655 828 T3

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
 165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly  
 180 185 190

Gly Arg Trp Gly Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr His Val Gly Lys His  
 195 200 205

Val Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ala Tyr Leu  
 210 215

<210> 96

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 655 828 T3

<223> -

<400> 96

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Gly  
180 185 190

Gly Gly Arg Arg Lys Arg Lys Trp Leu Arg Arg Ile Gly Lys Gly Val  
195 200 205

Lys Ile Ile Gly Gly Ala Ala Leu Asp His Leu  
210 215

<210> 97

5

<211> 212

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> -

<400> 97

ES 2 655 828 T3

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
 165 170 175

Arg Val Val Arg Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro  
 180 185 190

Gly Gly Gly Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu  
 195 200 205

Leu Lys Lys Lys  
 210

<210> 98

5 <211> 207

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 655 828 T3

<220>

<223> -

<400> 98

5

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
165 170 175

Arg Val Val Arg Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly  
180 185 190

Gly Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
195 200 205

<210> 102

10

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> -

<400> 102

ES 2 655 828 T3

Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu  
 1 5 10 15

Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn  
 20 25 30

Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His  
 35 40 45

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

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

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

Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser  
 100 105 110

Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe  
 115 120 125

Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His  
 130 135 140

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
 165 170 175

Arg Val Val Arg Gly Gly Gly Ile Gly Ala Arg Leu Lys Val Leu Thr  
 180 185 190

Thr Gly Leu Pro Arg Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln Gly  
 195 200 205

Gly Gly Gly Ser Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu  
 210 215 220

Ala Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 225 230

<210> 108

5 <211> 669

<212> ADN

ES 2 655 828 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

5

<400> 108

```
aaactgctgc tgaaactgct gaaaaaactg ctgaaactgc tgaaaaaaaa aggtggtggt      60
tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgca aacgtctgaa accgaccctg      120
gttgttcgtc cgctgggtct ggcaggcggg ggttgtgcag cagcatgtgc agcctgtagc      180
ggtggtcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc      240
ccgaatagca aaaatgaaaa agcactgggt cgcaaaatta acagctggga aagcagccgt      300
agtggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaaactggt gattcatgaa      360
aaaggcttct actatatcta cagccagacc tattttcgtc tccaagaaga gattaaagaa      420
aacaccaaaa acgataaaca aatggtgcag tacatctata aatacaccag ctatccggat      480
ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttgga gcaaagatgc agaatatggc      540
ctgtatagca tttatcaggg tggcatcttt gaactgaaag aaaacgatcg tattttcgtg      600
agcgtgacca atgaacatct gatcgatatg gatcatgaag ccagcttttt tgggtcattt      660
ctggtgggt                                         669
```

10 <210> 109

<211> 669

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> -

<400> 109

ES 2 655 828 T3

aaactggcaa aactggccaa aaaactggct aaactggcga aacgtcgtcg tcgccgtcgt 60  
 cggcgtaaaa aacgtgggtg tggttgtgca gcagcatgtg cagcctgtac cagcgaagaa 120  
 accattagca ccgttcaaga aaaacagcag aatattagtc cgctggttcg tgaacgtggg 180  
 ccgcagcgtg ttgcagcaca tattaccggc acccgtggtc gtagcaatac cctgagcagc 240  
 ccgaatagca aaaatgaaaa agcactgggt cgcaaaatta acagctggga aagcagccgt 300  
 agcggtcata gctttctgag caatctgcat ctgcgtaatg gtgaactggg gattcatgaa 360  
 aaaggcttct actatatcta cagccagacc tattttcgtt tccaagaaga gattaaagaa 420  
 aacaccaaaa acgataaaca aatgggtgcag tacatctata aatacaccag ctatccggat 480  
 ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat agctgttggg gcaaagatgc agaatatggc 540  
 ctgtatagca tttatcaggg tggcatcttt gaactgaaag aaaacgatcg tattttcgtg 600  
 agcgtgacca atgaacatct gatcgatatg gatcatgaag cgagcttttt tgggtcattt 660  
 ctggtgggt 669

<210> 110

5 <211> 696

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> -

<400> 110

ES 2 655 828 T3

aaactggcaa aactggccaa aaaactggct aaactggcga aacgtcgtcg tcgccgtcgt 60  
 cggcgtaaaa aacgtcatcg tcagccacgt ggttgggaac aggggtggtg ttgtgcagca 120  
 gcatgtgcag cctgtaccag cgaagaaacc attagcaccg ttcaagaaaa acagcagaat 180  
 attagtccgc tggttcgtga acgtgggccg cagcgtgttg cagcacatat taccggcacc 240  
 cgtggtcgta gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 300  
 aaaattaaca gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 360  
 cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttctact atatctacag ccagacctat 420  
 tttcgcttcc aagaagagat taaagaaaac accaaaaacg ataaacaaat ggtgcagtac 480  
 atctataaat acaccagcta tccggatccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc 540  
 tgttggagca aagatgcaga atatggcctg tatagcattt atcagggtgg catctttgaa 600  
 ctgaaagaaa acgatcgtat tttcgtgagc gtgaccaatg aacatctgat cgatatggat 660  
 catgaagcga gcttttttgg tgcatttctg gtgggt 696

<210> 111

<211> 621

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

10

<400> 111

cggtggcgg cgcatttac cggcaccgt ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac 60  
 agcaaaaacg aaaaagcgt gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120  
 catagctttc tgagcaacct gcatctgctg aacggcgaac tggtgattca tgaaaaaggc 180

ES 2 655 828 T3

ttttattata tttatagcca gacctatddd cgtdtttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240  
 aaaaacgata aacagatggg gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360  
 agcattttatc agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatddd tgtgagcgtg 420  
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctgggtg 480  
 ggcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc ccgctgggcc tggcgggccg tgtggtgcgt 540  
 tatgcgcgtg cggcggcgcg tcaggcgcgt gcgggcggca aactggcgaa actggcgaaa 600  
 aactggcga aactggcga a 621

<210> 112

<211> 654

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

10

<400> 112

cggtggcgg cgcataattac cggcaccctg gcccgtagca acaccctgag cagcccgaac 60  
 agcaaaaacg aaaaagcgt gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120  
 catagctttc tgagcaacct gcatctgcgt aacggcgaac tgggtattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatddd cgtdtttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240  
 aaaaacgata aacagatggg gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360  
 agcattttatc agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatddd tgtgagcgtg 420  
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctgggtg 480  
 ggcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc ccgctgggcc tggcgggccg tgtggtgcgt 540  
 tatgcgcgtg cggcggcgcg tcaggcgcgt gcgggcggcc gttggggcaa atggtttaaa 600  
 aaagcgacc atgtgggcaa acatgtgggc aaagcggcgc tgaccgcgta tctg 654

15 <210> 113

<211> 657

<212> ADN

ES 2 655 828 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

5

<400> 113

```
cgtgtggcgg cgcataattac cggcaccctgt ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac      60
agcaaaaacg aaaaagcgcct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc      120
catagctttc tgagcaacct gcatctgcgt aacggcgaac tggtgattca tgaaaaaggc      180
ttttattata tttatagcca gacctatatt cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc      240
aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt      300
ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat      360
agcatttatc agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatatt tgtgagcgtg      420
accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgcgct tttttggcgc gtttctggtg      480
ggcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc ccgctgggcc tggcgggccc tgtggtgcgt      540
tatgcgcgtg cggcggcgcg tcaggcgcgt gcggcggcgc gccgtcgtaa acgtaaattg      600
ctgcgtcgta ttggcaaagg cgtgaaaatt attggcggcg cggcgcctgga tcacctg      657
```

<210> 114

10

<211> 636

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> -

<400> 114

ES 2 655 828 T3

cgtgtggcgg cgcatattac cggcaccctg ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac 60  
 agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120  
 catagctttc tgagcaacct gcatctgcgt aacggcgaac tggatgattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatfff cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240  
 aaaaacgata aacagatggg gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360  
 agcatttatc agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatfff tgtgagcgtg 420  
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg 480  
 ggcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc ccgctgggcc tggcgggccc tgtggtgcgt 540  
 acccatcgtc cgccgatgtg gagcccgggtg tggccgggcg gcggcaaact gctgctgaaa 600  
 ctgctgaaaa aactgctgaa actgctgaaa aaaaaa 636

<210> 115

5 <211> 621

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> -

<400> 115

cgctggcgg cgcatattac cggcaccctg ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac 60  
 agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc 120  
 catagctttc tgagcaacct gcatctgcgc aacggcgaac tggatgattca tgaaaaaggc 180  
 ttttattata tttatagcca gacctatfff cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc 240  
 aaaaacgata aacagatggg gcagtatatt tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 300  
 ctgctgatga aaagcgcgcg caacagctgc tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat 360  
 agcatttatc agggcggcat ttttgaactg aaagaaaacg atcgtatfff tgtgagcgtg 420  
 accaacgaac atctgattga tatggatcat gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg 480  
 ggcggcggcg gcggcagcgg cggcggcggc ccgctgggcc tggcgggccc cgtggtgcgc 540  
 tatggcggca aaaaacgccc ccagcggcgc cgccggcgca aactggcgaa actggcgaaa 600  
 aaactggcga aactggcgaa a 621

ES 2 655 828 T3

<210> 119

<211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> -

<400> 119

10

```
cggtttgcag cacatattac cggcaccctgt ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat      60
agcaaaaatg aaaaagcact gggtcgcaaa attaacagct gggaaagcag ccgtagcggg      120
catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatgggtgaac tgggtgattca tgaaaaaggc      180
ttctactata tctacagcca gacctatfff cgcttccaag aagagattaa agaaaaacacc      240
aaaaacgata aacaaatggg gcagtacatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt      300
ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgcagaata tggcctgtat      360
agcattttatc aggggtggcat ctttgaactg aaagaaaacg atcgtatfff cgtgagcgtg      420
accaatgaac atctgatcga tatggatcat gaagccagct tttttgggtg atttctgggtg      480
ggagggtggg gcggtagtag cggtgggtgg cctctgggtc tggcaggtcg tgttgttcgc      540
ggagggtgta ttggtgcacg tctgaaagtt ctgaccaccg gtctgcctcg tattagctgg      600
attaaacgta aacgtcagca gggtgggggt ggtagcaaac tggcaaaact ggcgaaaaaa      660
ctggcctaac tggccaaacg tcgtcgtcgc cgtcgtcggc gt      702
```

<210> 125

15

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> -

<400> 125

ES 2 655 828 T3

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys  
1 5 10 15

Lys Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys  
20 25 30

Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr  
35

<210> 126

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Pleuronectes americanus

<300>

<301> Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin DW.

10 <302> Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts

<303> Breast Cancer Res.

<304> 13

<305> 5

15 <306> R102

<307> 24-10-2011

<400> 126

Arg Trp Gly Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr His Val Gly Lys His Val  
1 5 10 15

20 Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ala Tyr Leu  
20 25

<210> 127

<211> 26

<212> PRT

25 <213> Pleuronectes americanus

<300>

<301> Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin DW.

<302> Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts.

<303> Breast Cancer Res.

<304> 13

5 <305> 5

<306> R102

<307> 24-10-2011

<400> 127

10

Gly Arg Arg Lys Arg Lys Trp Leu Arg Arg Ile Gly Lys Gly Val Lys  
1 5 10 15

Ile Ile Gly Gly Ala Ala Leu Asp His Leu  
20 25

<210> 128

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> -

20

<300>

<301> Papo N, Shai Y.

<302> New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells.

25 <303> Biochemistry

<304> 42

<305> 31

<306> 9346-54

<307> 12-08-2003

30

<400> 128

ES 2 655 828 T3

Lys Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Lys  
1 5 10 15

Lys

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:

- 5 - dominio (a) que es un fragmento funcional de la secuencia de proteína hTRAIL soluble, siendo dicha secuencia de proteína hTRAIL presentada como SEQ. No. 90, fragmento que empieza con un aminoácido en una posición del intervalo hTRAIL95 a hTRAIL121, ambos incluidos, y termina con el aminoácido en la posición hTRAIL281, o un homólogo de dicho fragmento funcional que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia, preferentemente el 85 % de identidad, en el que dicho fragmento funcional u homólogo del mismo es capaz de inducir la señal apoptósica en células de mamífero tras la unión a sus receptores sobre la superficie de las células, y
- 10 - al menos un dominio (b) que es la secuencia de un péptido efector citolítico con una conformación de hélice alfa antipática que forma poros en la membrana celular,

en la que la secuencia del 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) está seleccionado del grupo que consiste en hTRAIL95-281, hTRAIL114-281, hTRAIL115-281, hTRAIL116-281, hTRAIL119-281 y hTRAIL121-281.

15 3. La proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en la que el dominio (b) está seleccionado del grupo que consiste en:

- pilosulina-1 de SEQ. No. 36,
- pilosulina-5 de SEQ. No. 37,
- péptido lítico sintético de 14-aminoácidos SEQ. No. 41,
- 20 - péptido de 27 aminoácidos FFhCAP18 de SEQ. No. 43,
- péptido BAMP-28 de SEQ. No. 44,
- análogo de la isoforma C del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* de SEQ. No. 45,
- análogo de la isoforma A del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* SEQ. No. 46,
- análogo de la isoforma B del péptido lítico de *Entamoeba histolytica* de SEQ. No. 47,
- 25 - fragmento del dominio HA2 de la hemaglutinina del virus de la gripe de SEQ. No. 48,
- fragmento activo de perforina humana de SEQ. No. 54,
- parasporina-2 de *Bacillus thuringiensis* de SEQ. No. 55,
- proteína de fusión que comprende el péptido lítico sintético con motivo KLLK y un péptido que es antagonista del receptor de PDGF de SEQ. No. 125,
- 30 - análogo de pleurocidina de SEQ. No. 126,
- análogo de pleurocidina de SEQ. No. 127, y
- péptido lítico sintético de SEQ. No. 128.

35 4. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que entre el dominio (a) y el dominio (b) o entre los dominios (b) contiene el dominio (c) que contiene sitio de escisión de proteasa, seleccionado de una secuencia reconocida por metaloproteasa MMP, una secuencia reconocida por urocinasa uPA, y secuencia reconocida por furina y una secuencia reconocida por furina nativa.

40 5. La proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que una secuencia reconocida por metaloproteasa MMP es Pro Leu Gly Leu Ala Gly, una secuencia reconocida por urocinasa uPA es Arg Val Val Arg, una secuencia reconocida por furina es Arg Lys Lys Arg, y una secuencia reconocida por furina nativa es Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu o His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln.

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

7. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el péptido efector de dominio (b) está además conectado con el dominio de transporte (d), seleccionado del grupo que consiste en:

- (d1) secuencia de polihistidina que transporta a través de la membrana celular que comprende 6, 7, 8, 9, 10 u 11 restos de His, y
  - (d2) secuencia de poliarginina que transporta a través de una membrana celular, que consiste en 6, 7, 8, 9, 10 u 11 restos de Arg,
  - 5 (d3) secuencia de transporte de PD4 (dominio 4 de transducción de proteínas) Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala,
  - (d4) una secuencia de transporte que consiste en la secuencia de unión al receptor de transferrina Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro, y
  - 10 (d5) secuencia de transporte de PD5 (dominio 5 de transducción de proteínas, proteína TAT) Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg,
- y combinaciones de las mismas.
8. La proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que la secuencia (d) está localizada en el extremo C o extremo N del dominio de péptido efector (b).
9. La proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que el dominio de transporte (d) está localizada entre el dominio (b) y el dominio (c), o entre el dominio (a) y el dominio (c), o entre dos dominios (c).
- 15 10. La proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que la secuencia (d) está localizada en el extremo C de la proteína de fusión.
11. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que entre dos (c) dominios contiene el dominio (e) que es un conector para la unión de la molécula de PEG, seleccionada de Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu Gly y Ala Ser Gly Cys Gly Pro Glu.
- 20 12. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 11, que comprende además un conector estérico flexible entre los dominios (a), (b) y/o (c).
13. La proteína de fusión según la reivindicación 12, en la que el conector estérico está seleccionado de Gly Gly, Gly Gly Gly, Gly Ser Gly, Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Ser Gly Gly, Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly, Gly Gly Gly Gly Ser Gly, Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser, Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly, Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly, Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys, Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys, Ser Gly Gly, resto de glicina individual Gly, y resto de cisteína individual Cys, y combinaciones de los mismos.
- 25 14. La proteína de fusión según la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ. No. 4; SEQ. No. 5; SEQ. No. 6; SEQ. No. 11; SEQ. No. 12; SEQ. No. 13; SEQ. No. 14; SEQ. No. 15; SEQ. No. 16; SEQ. No. 18; SEQ. No. 19; SEQ. No. 20; SEQ. No. 21; SEQ. No. 22; SEQ. No. 23; SEQ. No. 30; SEQ. No. 31; SEQ. No. 32; SEQ. No. 91; SEQ. No. 92; SEQ. No. 93; SEQ. No. 94; SEQ. No. 95; SEQ. No. 96; SEQ. No. 97, SEQ. No. 98; y SEQ. No. 102.
- 30 15. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una proteína recombinante.
- 35 16. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo la proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16 en una forma para administración parenteral.
18. La proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas en mamíferos, que incluyen seres humanos.
- 40

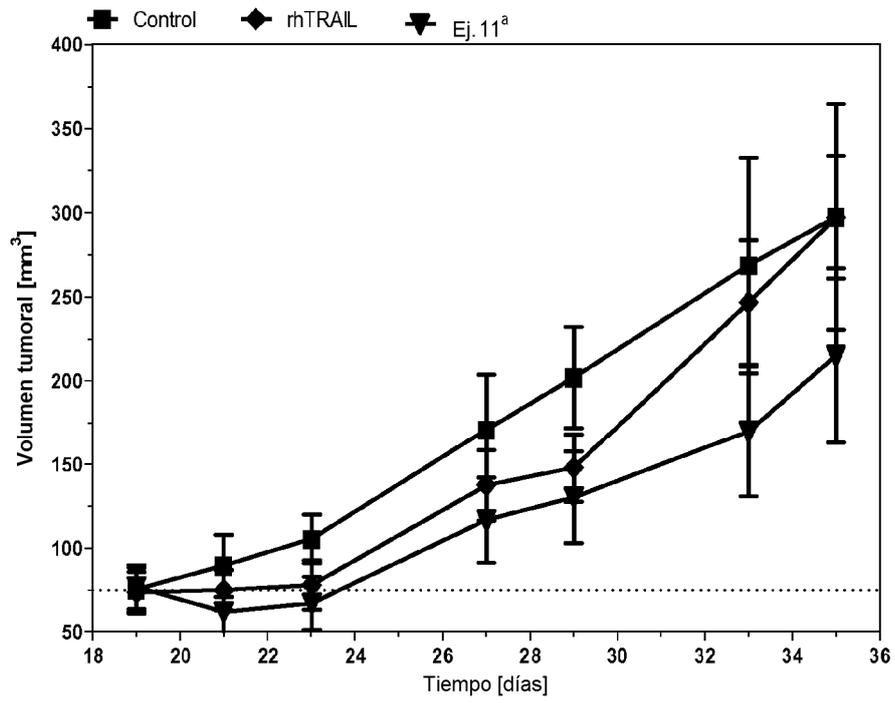


Fig. 1

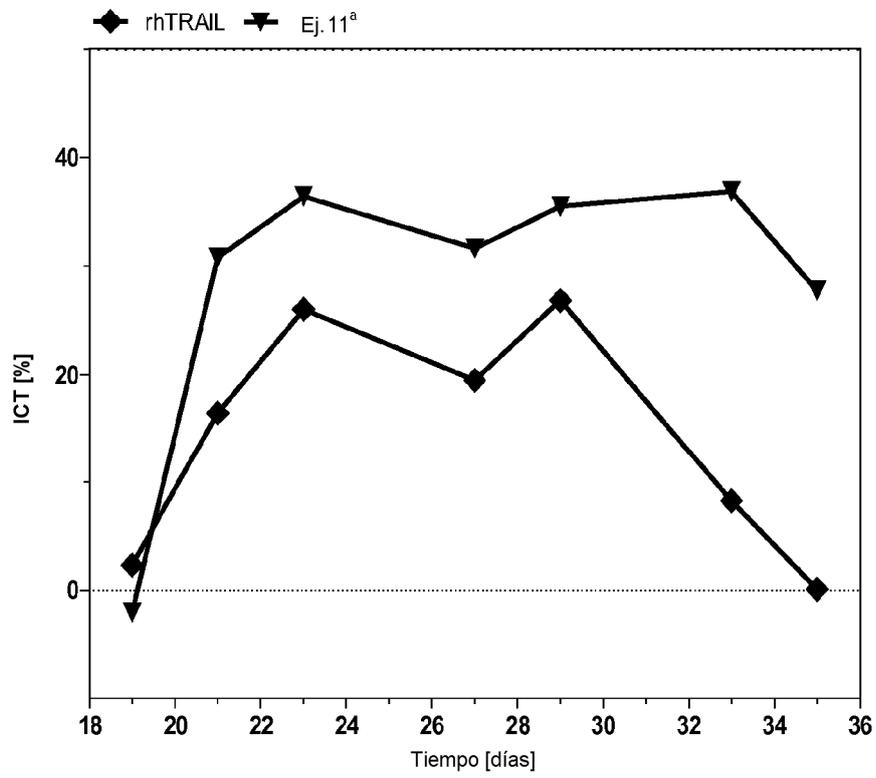


Fig. 2

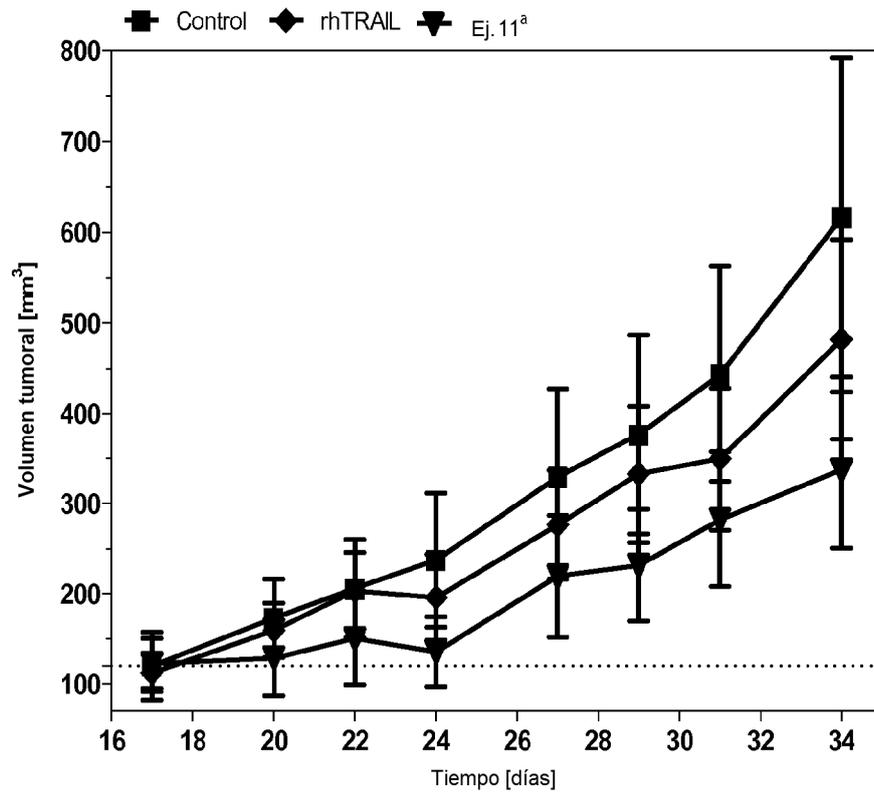


Fig. 3

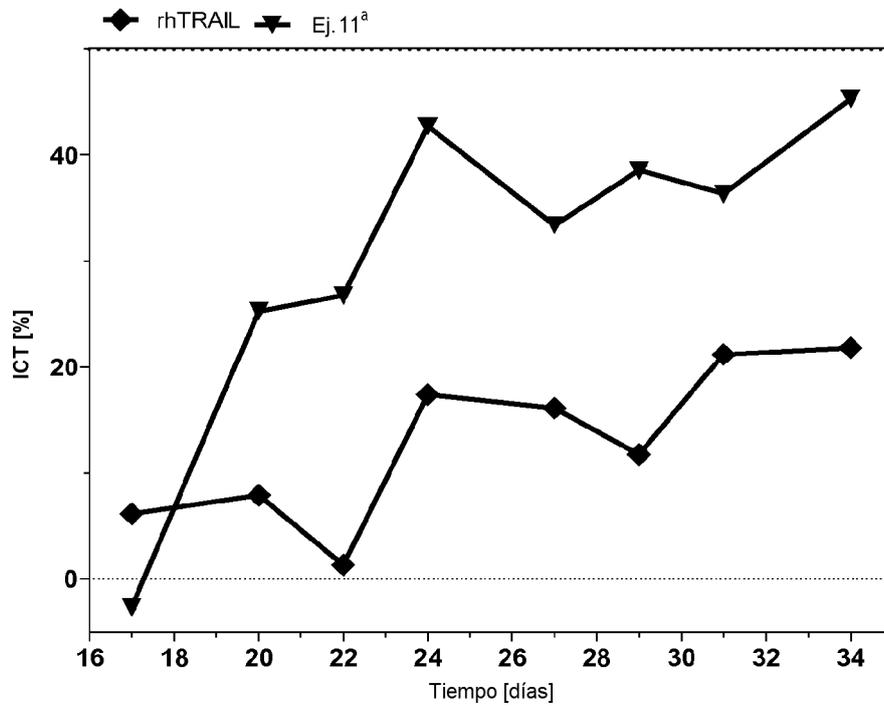


Fig. 4

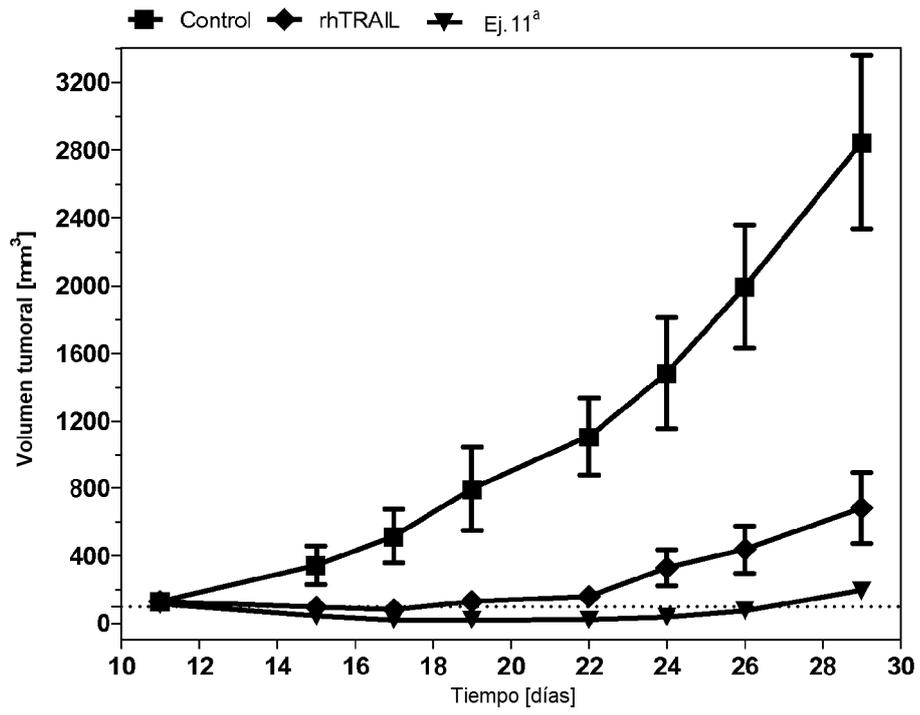


Fig. 5

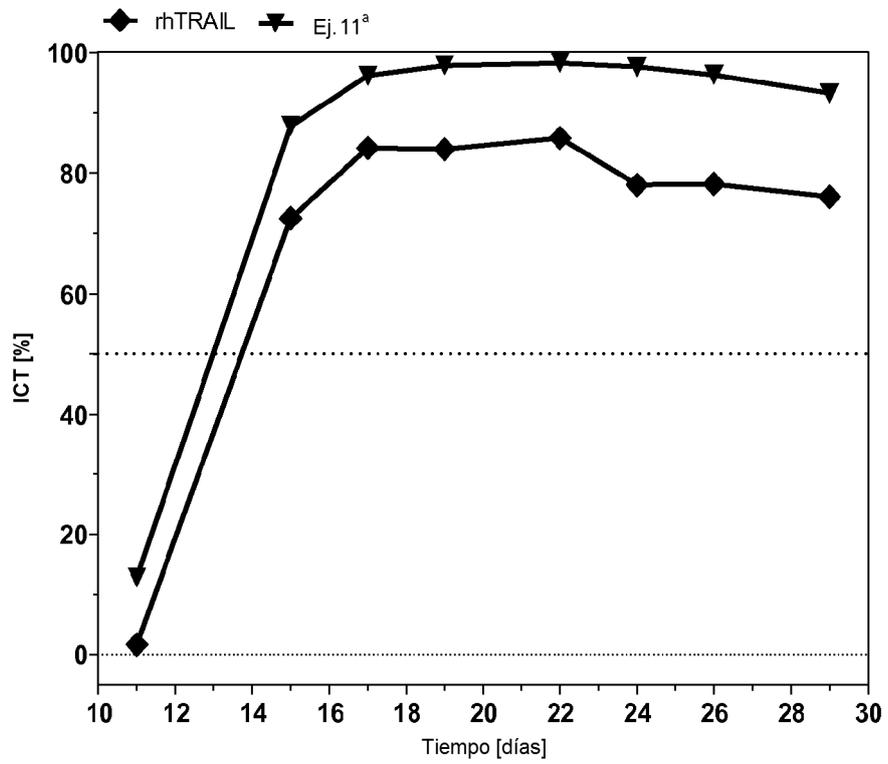


Fig. 6

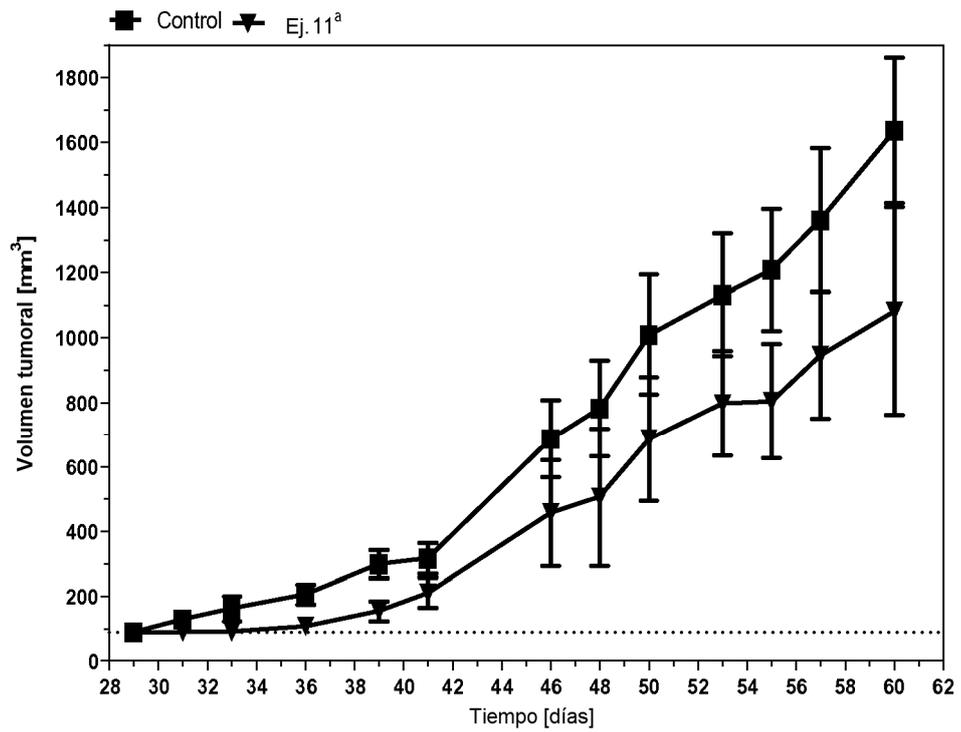


Fig. 7

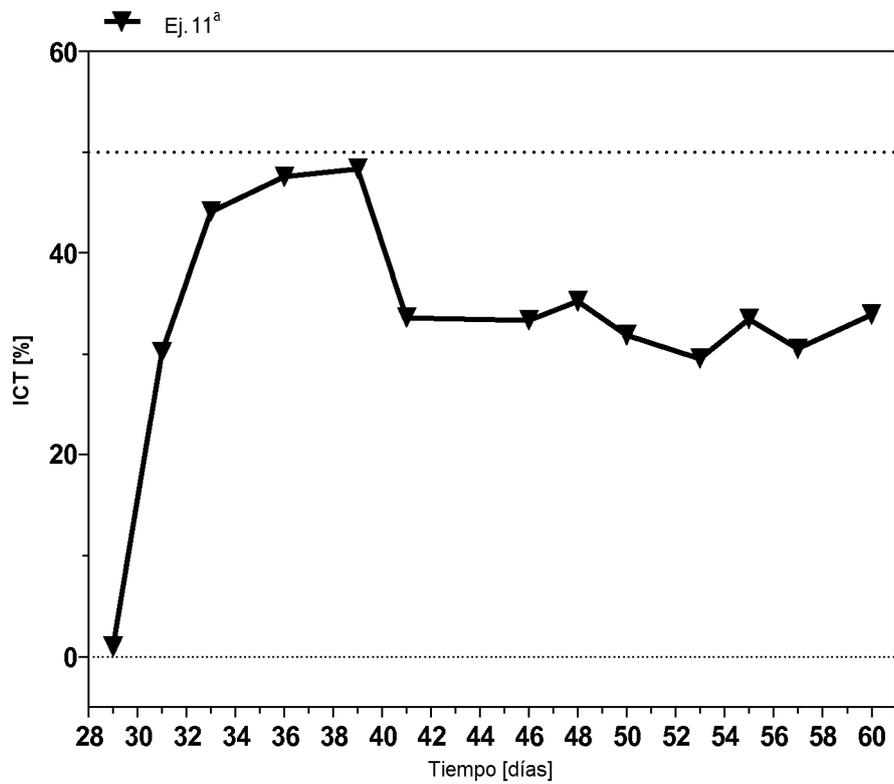


Fig. 8

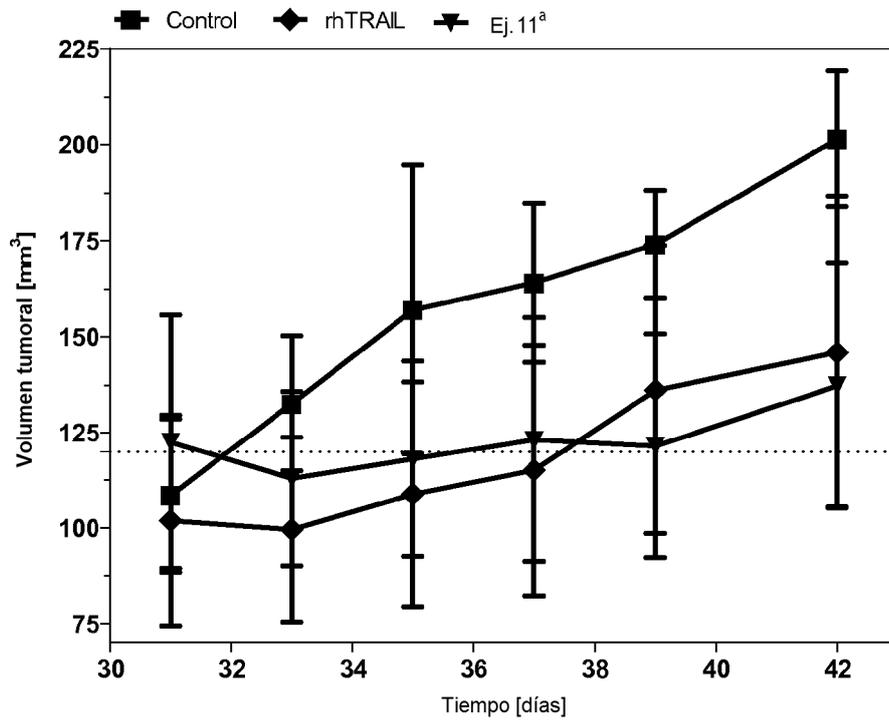


Fig. 9

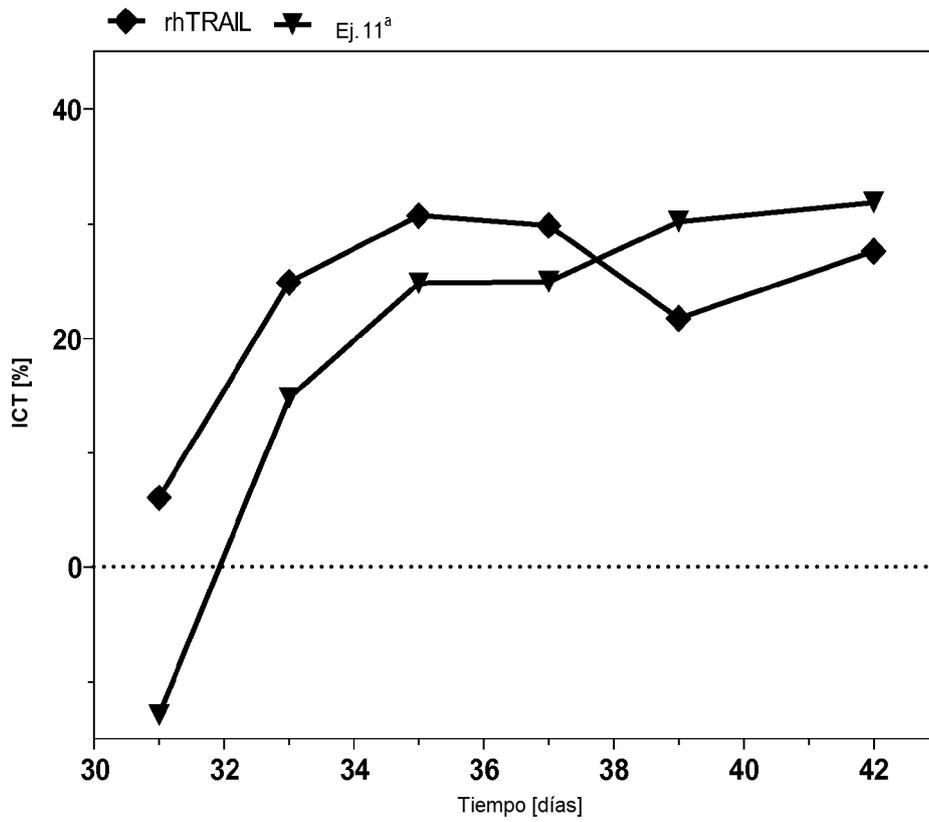


Fig. 10

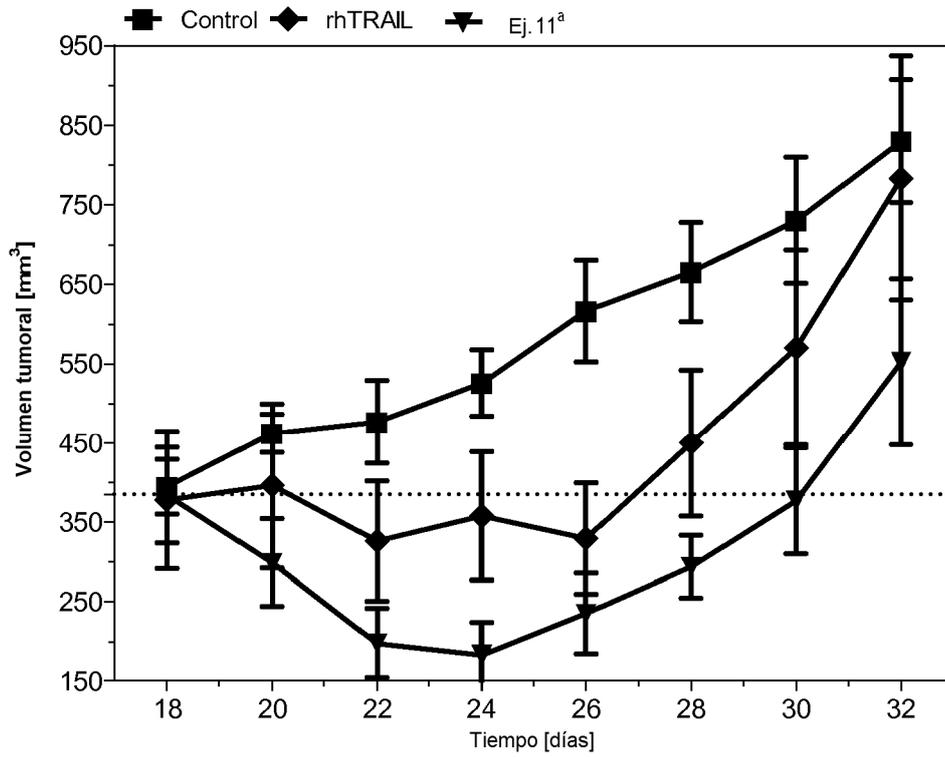


Fig. 11

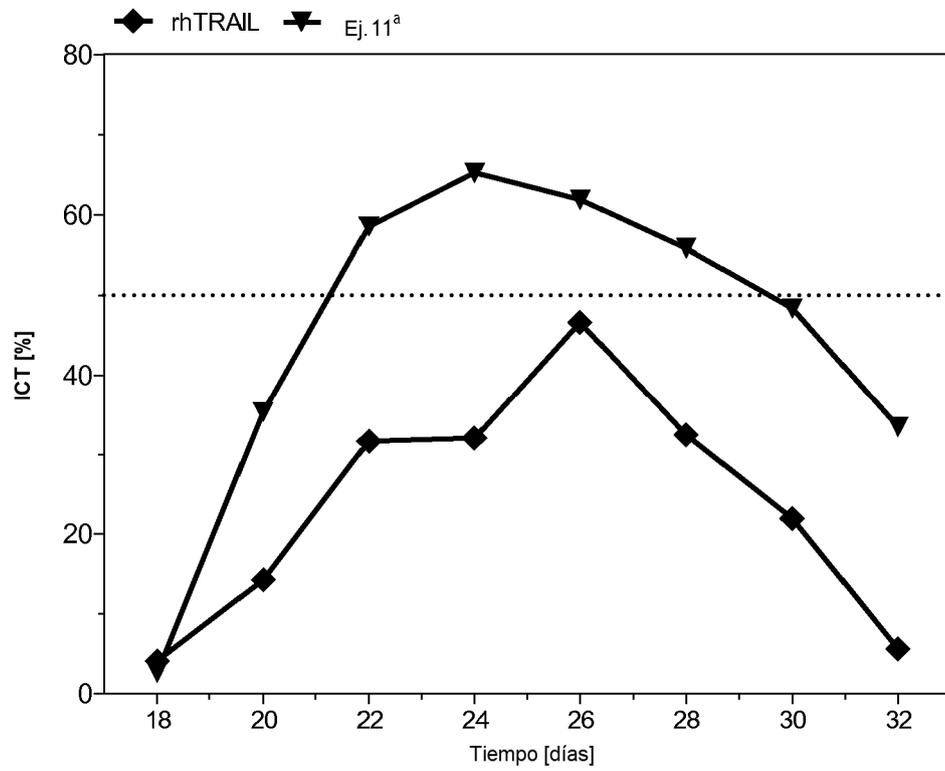


Fig.12

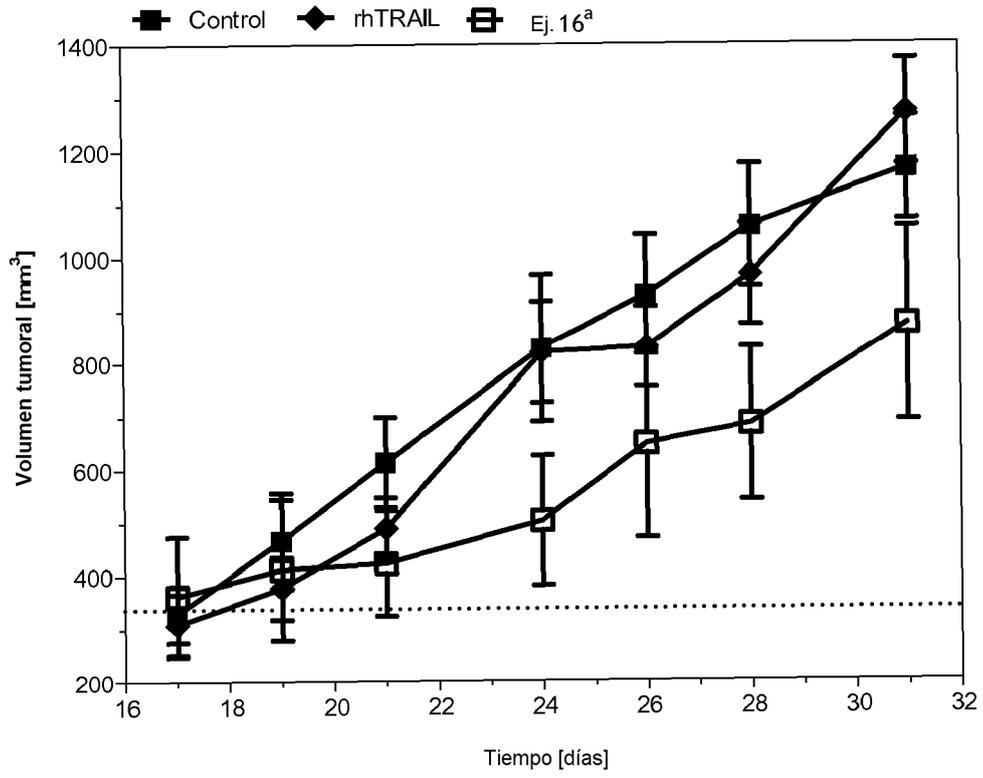


Fig. 13

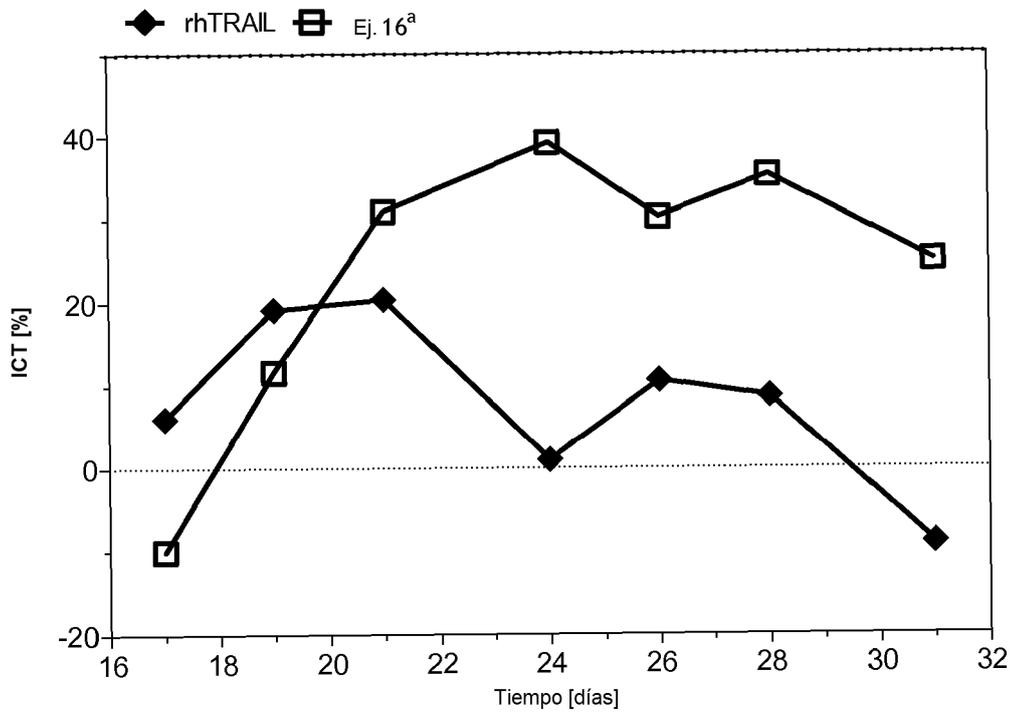


Fig. 14

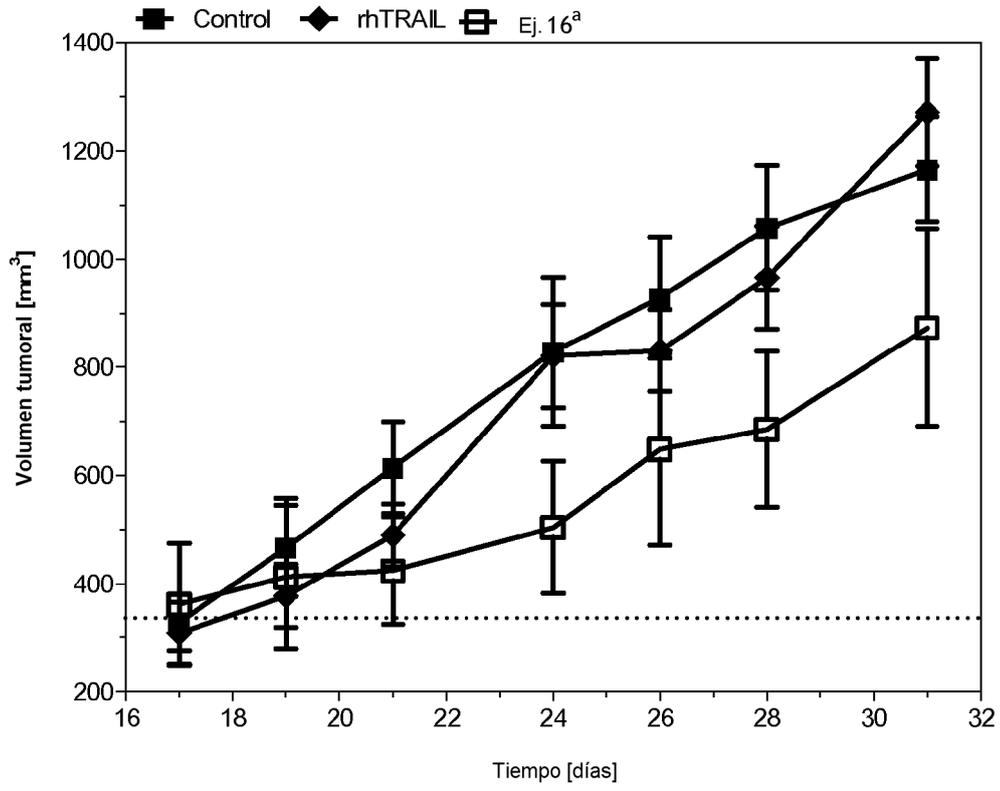


Fig. 15

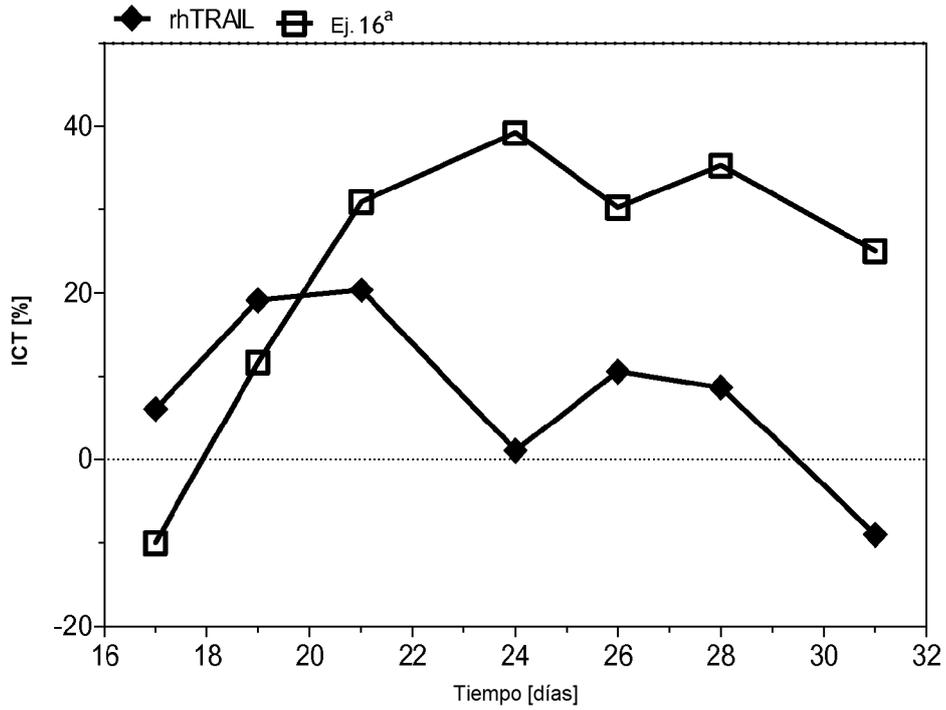


Fig. 16

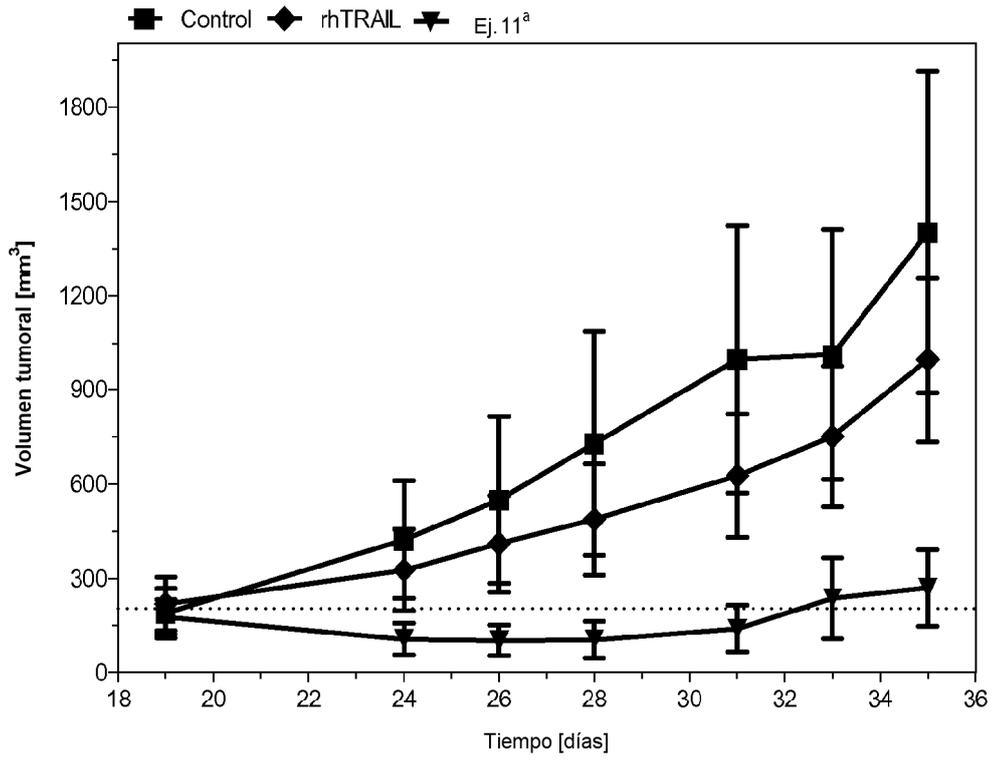


Fig. 17

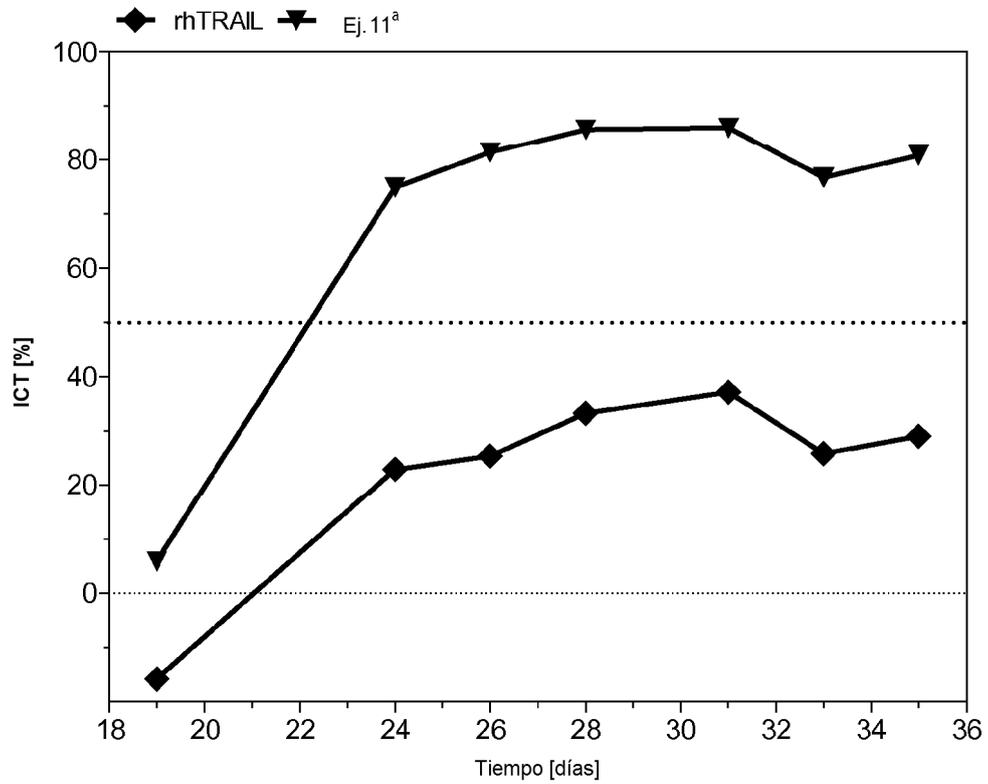


Fig. 18

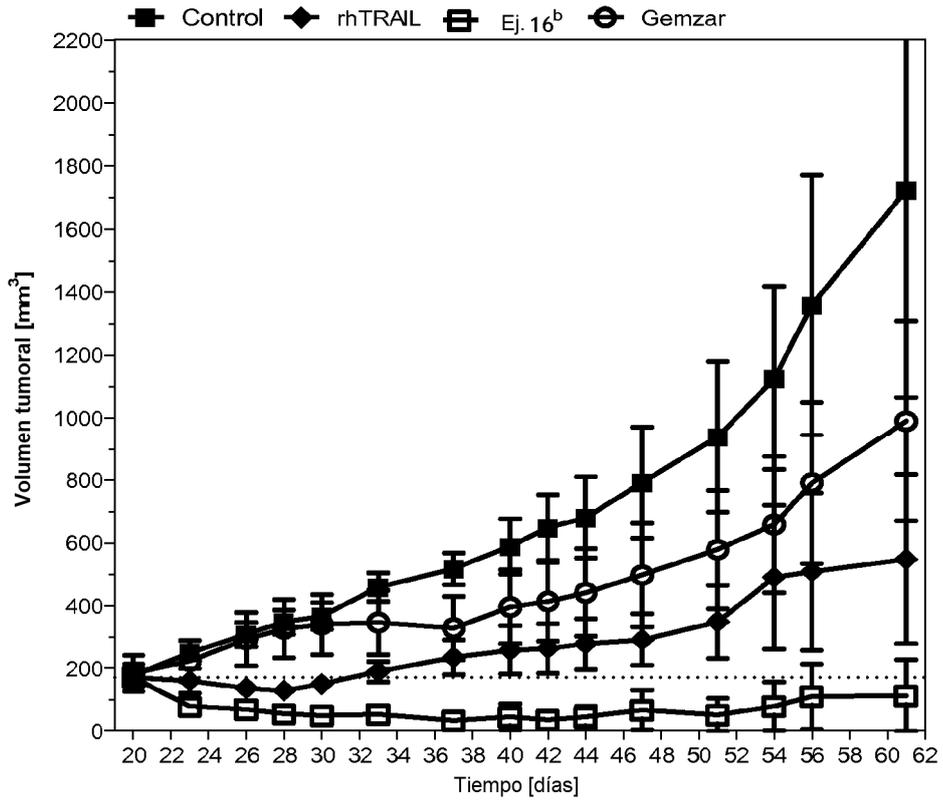


Fig. 19

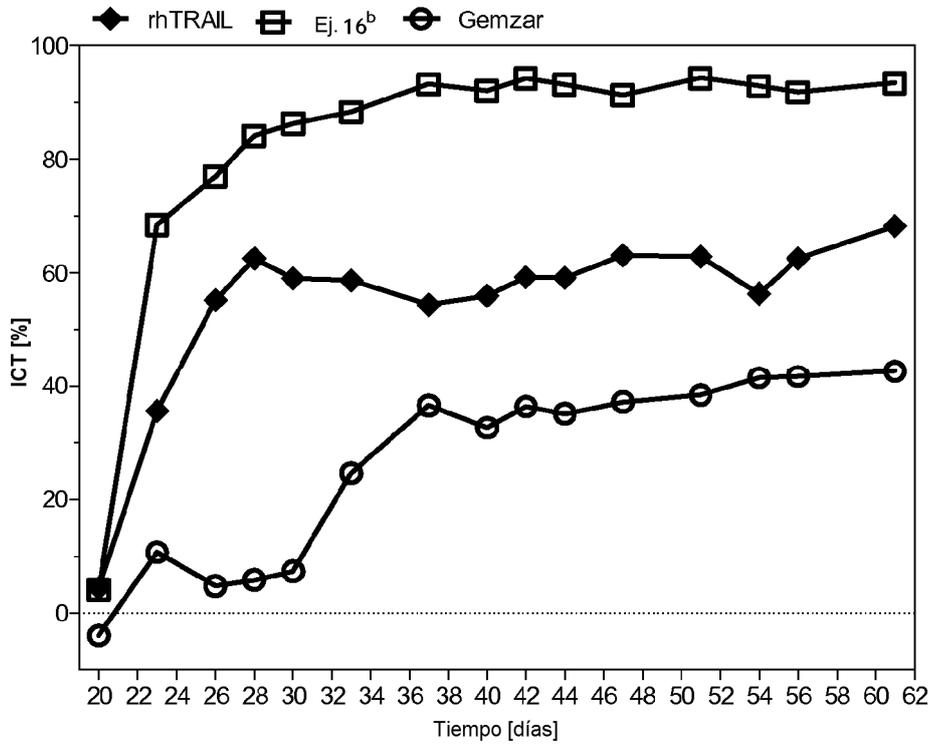


Fig. 20

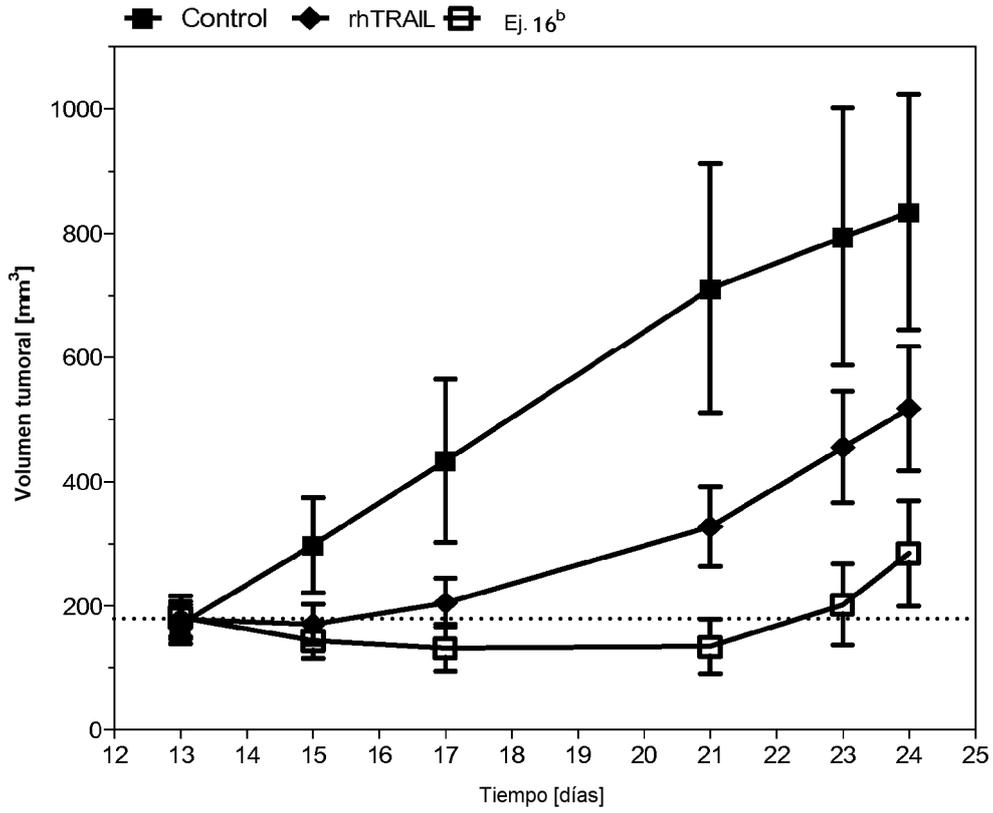


Fig. 21

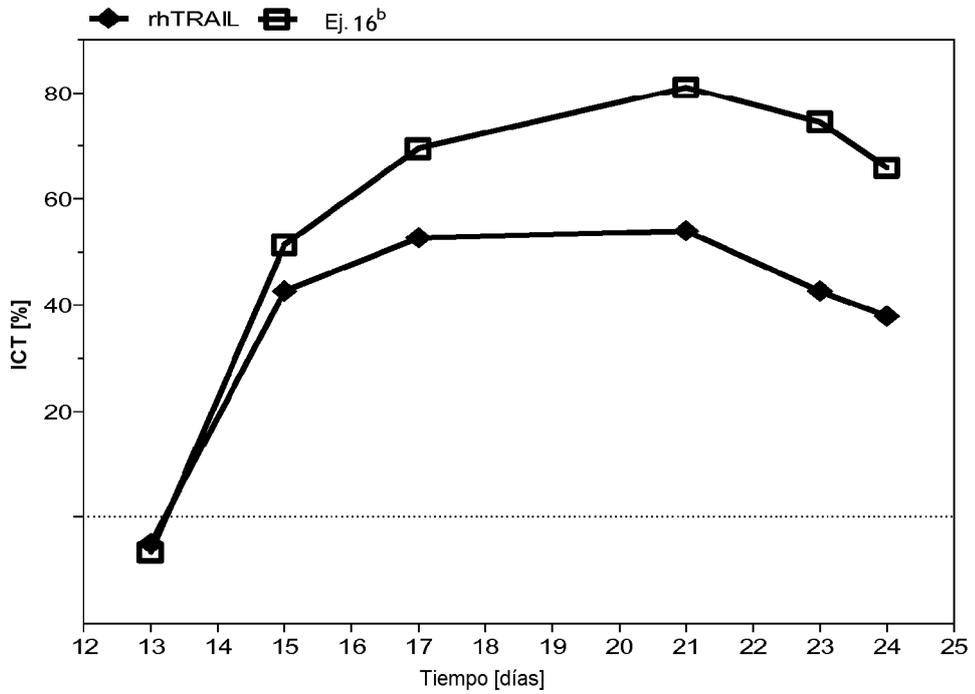


Fig. 22

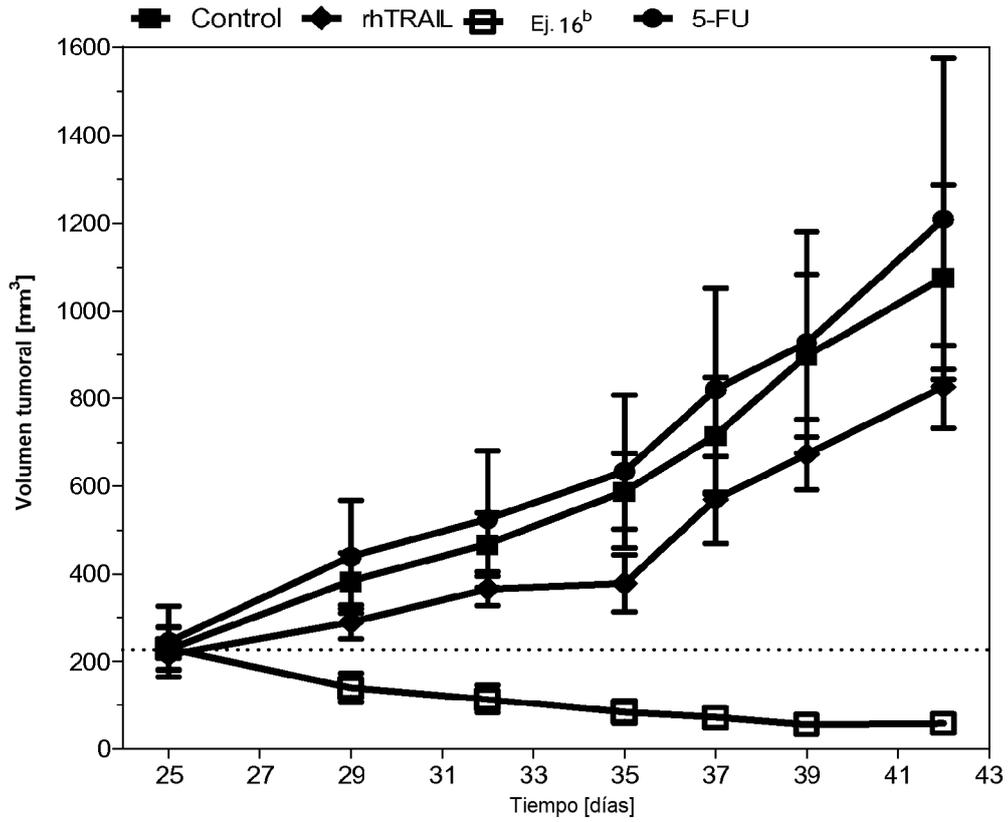


Fig. 23

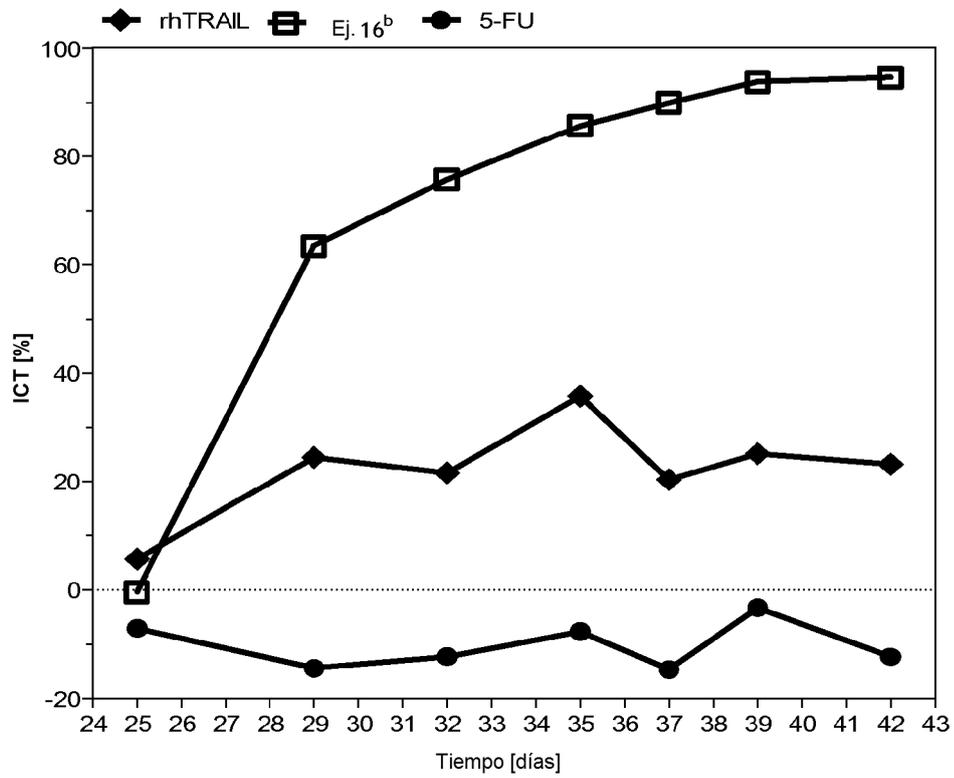


Fig. 24

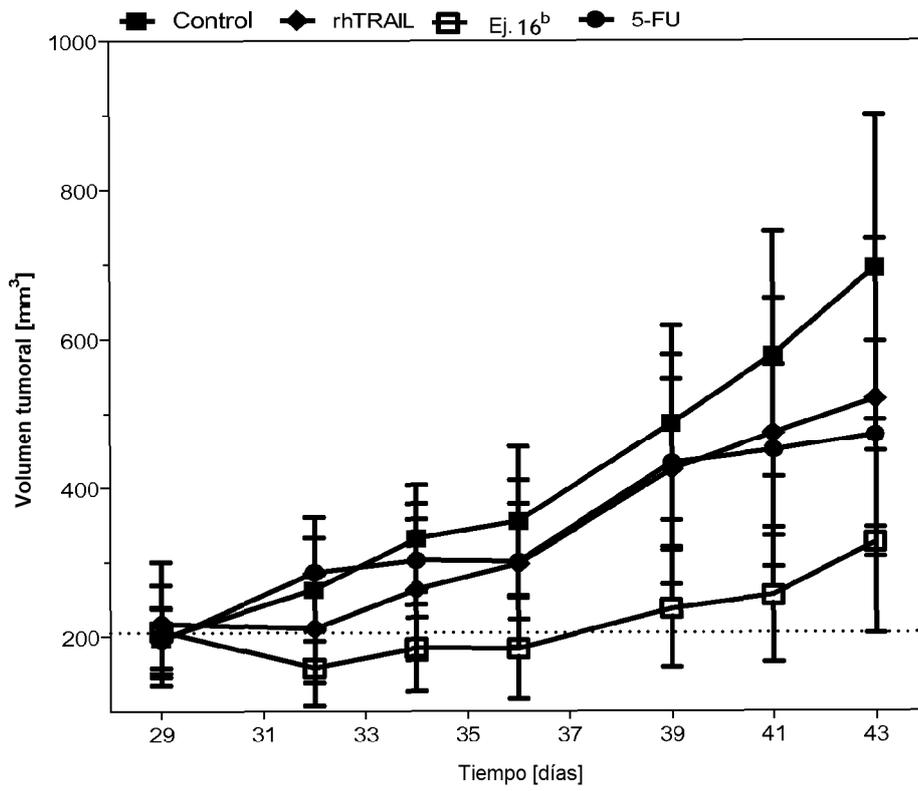


Fig. 25

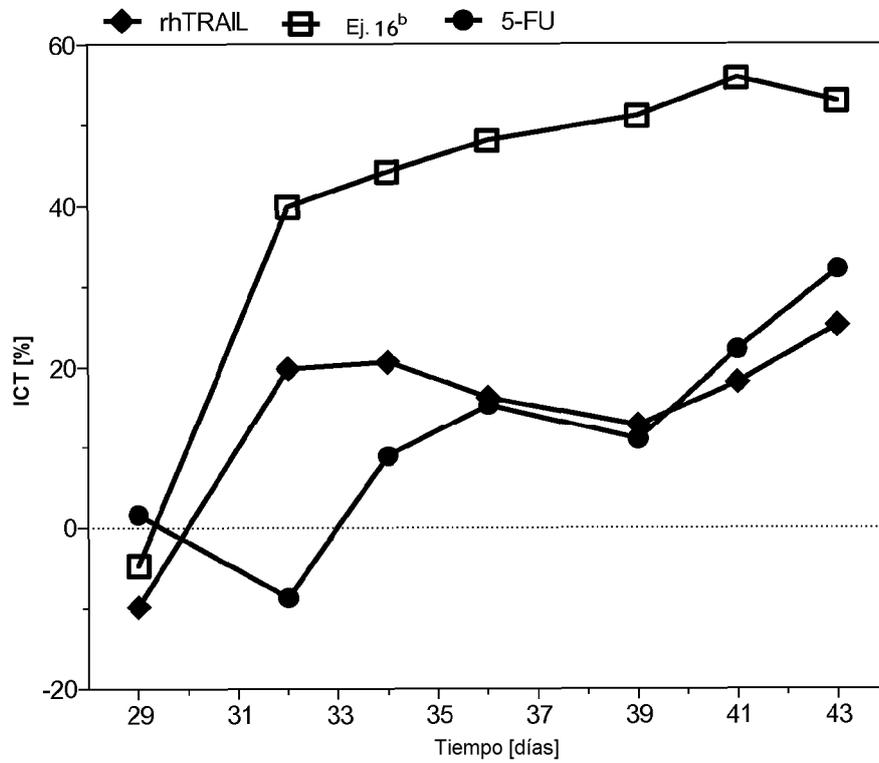


Fig. 26