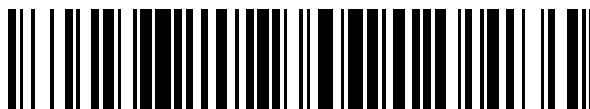


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 801**

51 Int. Cl.:

C07K 14/525 (2006.01)

C12N 15/28 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/42 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008** **E 16150412 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 3072903**

54 Título: **Proteínas de fusión de colectina de la superfamilia de TNF**

30 Prioridad:

10.07.2007 EP 07013506

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

06.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 657 801 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de colectina de la superfamilia de TNF

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una citoquina de la superfamilia de TNF (TNFSF) o un dominio de unión a receptor de la misma fusionada a un dominio de trimerización de colectina, a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, y a una célula que comprende la molécula de ácido nucleico. La proteína de fusión está presente como un complejo trimérico o como un oligómero del mismo. La proteína de fusión, el ácido nucleico, y la célula son adecuados como composición farmacéutica o para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o investigación como se describe en este documento.

15 Estado de la técnica

Los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) cumplen papeles cruciales en el sistema inmune, pero también se han implicado en el desarrollo de estructuras epiteliales y endoteliales.¹ Los ligandos de la familia de TNF se expresan principalmente como proteínas transmembrana de tipo II triméricas y a menudo se procesan en variantes solubles que también se organizan como trímeros.^{1,2} Aunque el desprendimiento de algunos ligandos de TNF no interfiere con su capacidad de activar sus receptores correspondientes y podría ser incluso importante para su función fisiológica, otros ligados de TNF quedan activados por procesamiento proteolítico.² Los ligandos de TNF solubles que no son activos o son solamente escasamente activos aún interaccionan con sus receptores afines. Por ejemplo, las formas solubles de TNF, CD95L, TRAIL y CD40L interaccionan con TNFR2, CD95, TRAILR2 y CD40, respectivamente, pero no activan o solamente activan escasamente la señalización por estos receptores.³⁻⁶ De forma notable, los ligandos de TNF solubles inactivos o escasamente activos pueden convertirse en moléculas altamente activas aumentando artificialmente su avidéz. Por ejemplo, variantes solubles marcadas con indicador de TNF, CD95L, TRAIL y CD40L estimulan una robusta señalización por TNFR2, CD95, TRAILR2 y CD40, respectivamente, dado que se entrecruzan con el mAb específico de indicador M2. Asimismo, proteínas de fusión hexaméricas y dodecaméricas de CD95L soluble y CD40L soluble, así como preparaciones no agregadas específicamente de ligandos de TNF producidas en *E. coli* presentan alta actividad.⁶⁻⁸

La característica estructural de los ligandos de la familia de TNF es el "dominio de homología de TNF 2" (THD) o "dominio de unión a receptor" (RBD) carboxi-terminal, usadas ambas expresiones por igual en este documento, que es parte tanto de la forma transmembrana como soluble de los ligandos de TNF.^{1,2} Los THD de los diversos ligandos de TNF están compuestos por un esqueleto de restos aromáticos e hidrófobos que adoptan un plegamiento terciario casi idéntico y que causa auto-asociación en trímeros.^{1,2} El THD también media la unión al receptor. En general, los ligandos triméricos de la familia de TNF se unen a tres moléculas de su correspondiente receptor o receptores. Esta interacción en solitario no es necesariamente suficiente para activar las rutas de señalización intracelular asociadas a receptor. Varias líneas de evidencia sugieren que la formación inicial de complejos triméricos competentes en señalización de ligando y receptor va seguida de multimerización secundaria en grupos supramoleculares.⁹⁻¹¹ Estas dos etapas en la activación del receptor de TNF (1, unión de ligando; 2, agregación secundaria de los complejos de receptor y ligando) dependen en un grado variable de varios factores incluyendo la localización de balsas lipídicas, soporte de citoesqueleto, autoagregación de receptores, proteínas adaptadoras asociadas a receptor, pero también de la afinidad y avidéz de la interacción del ligando y el receptor y el modo en que el ligando se presenta al receptor (ligando de membrana o ligando inmovilizado frente a ligando soluble, trímeros frente a agregados superiores).

Se sabe que los complejos triméricos de citoquinas de la superfamilia de TNF son difíciles de preparar a partir de unidades monoméricas recombinantes.

Por ejemplo, el documento WO 01/49866 describe proteínas de fusión recombinantes que comprenden una citoquina de TNF y un componente de multimerización. Una desventaja de estas proteínas de fusión es, sin embargo, que el dominio de trimerización habitualmente tiene un peso molecular grande y/o que la trimerización es más bien ineficaz.

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

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

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

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

Un objeto de la presente invención fue proporcionar proteínas de fusión que comprendan una citoquina de TNF o una proteína de unión a receptor, que permitan fabricación recombinante eficaz combinada con buenas propiedades de trimerización y propiedades farmacéuticas mejoradas.

Sumario de la invención

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

(i) una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma, y

(ii) un dominio de trimerización de colectina.

La invención se refiere adicionalmente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se describe en este documento y a una célula o un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como se describe en este documento.

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

La invención también se refiere a una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula como se describe en este documento para su uso en terapia, por ejemplo, el uso de una proteína de fusión, una molécula de ácido nucleico, o una célula como se describe en este documento para la preparación de una composición farmacéutica en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos proliferativos, particularmente trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de citoquinas de TNF, tales como tumores, por ejemplo, tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, enfermedades reumatóides y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazo de trasplantes.

Descripción detallada de la invención

La proteína de fusión puede ser una proteína monomérica o una proteína multimérica. Preferiblemente, la proteína de fusión está presente como un complejo trimérico que consiste en tres unidades monoméricas que pueden ser iguales o diferentes. Preferiblemente, un complejo trimérico consiste en tres proteínas de fusión idénticas. En una realización preferida adicional, el complejo se forma por enlace covalente entre tres de las proteínas de fusión descritas en este documento, por ejemplo, un enlace covalente de puentes disulfuro entre cisteínas del dominio de trimerización de colectina (ii) como se describe en este documento. El complejo trimérico tal cual muestra actividad biológica. Se descubrió, sin embargo, que oligómeros del complejo trimérico, por ejemplo, complejos definidos donde la estructura trimérica básica está presente 2, 3 o 4 veces, también tienen actividad biológica. Por tanto, también se prefiere un oligómero del complejo trimérico.

Un componente (i) de la proteína de fusión es una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma. Preferiblemente, el componente (i) es una citoquina de mamífero, particularmente humana o un dominio de unión a receptor de la misma incluyendo variantes alélicas y/o derivados del mismo. Además, se prefiere que la citoquina de TNF sea un dominio de unión a receptor de la misma capaz de unirse al correspondiente receptor de citoquinas y preferiblemente con capacidad de activación del receptor, mediante la cual puede causarse actividad apoptótica o proliferativa. La citoquina puede seleccionarse, por ejemplo, entre miembros de la superfamilia de TNF, por ejemplo TNFSF-1 a 18 humano como se indica en la Tabla 1, preferiblemente entre LTA (SEQ ID NO: 1), TNF α (SEQ ID NO: 2), LTB (SEQ ID NO: 3), OX40L (SEQ ID NO: 4), CD40L (SEQ ID NO: 5), CD95L (SEQ ID NO: 6), CD27L (SEQ ID NO: 7), CD30L (SEQ ID NO: 8), CD137L (SEQ ID NO: 9), TRAIL (SEQ ID NO: 10), RANKL (SEQ ID NO: 11), TWEAK (SEQ ID NO: 12), APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), BAFF (SEQ ID NO: 15), LIGHT (SEQ ID NO: 16), TL1A (SEQ ID NO: 17), GITRL (SEQ ID NO: 18), EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), EDA-A2 (SEQ ID NO: 20), o un dominio de unión a receptor de los mismos. Los dominios preferidos de unión a receptor de las proteínas respectivas se indican en la Tabla 1 (NH₂-aa a COOH-aa) y comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 59-205 o 60-205 de LTA (SEQ ID NO: 1), 86-233 de TNF α (SEQ ID NO: 2), 82-244 o 86-244 de LTB

(SEQ ID NO: 3), 52-183 o 55-183 de OX40L (SEQ ID NO: 4), 112-261 o 117-261 de CD40L (SEQ ID NO: 5), 51-193 o 56-193 de CD27L (SEQ ID NO: 7), 97-234, 98-234 o 102-234 de CD30L (SEQ ID NO: 8), 86-254 de CD137L (SEQ ID NO: 9), 161-317 de RANKL (SEQ ID NO: 11), 103-249, 104-249 o 105-249 de TWEAK (SEQ ID NO: 12), 112-247 o 113-247 de APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), 112-250 o 113-250 de APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), 140-285 de BAFF (SEQ ID NO: 15), 91-240 de LIGHT (SEQ ID NO: 16), 91-251 o 93-251 de TL1A (SEQ ID NO: 17), 52-177 de GITRL (SEQ ID NO: 18), 245-391 de EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), 245-389 de EDA-A2 (SEQ ID NO: 20).

Más preferiblemente, la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma se selecciona entre CD95L o TRAIL o un dominio de unión a receptor de los mismos. En una realización especialmente preferida, la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma comprende la parte extracelular de una citoquina de TNF incluyendo el dominio de unión a receptor sin dominios localizados en membrana.

En una realización preferida, la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma de la proteína de fusión se selecciona de CD95L humano (SEQ ID NO: 6), particularmente los aminoácidos 142-281 o 144-281 de CD95L humano.

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

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

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

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

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

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

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

En una realización preferida adicional, la parte citoquina de la proteína de fusión se obtiene de LIGHT humano (SEQ ID NO: 16), particularmente los aminoácidos 91-240 de la SEQ ID NO: 16.

En una realización preferida adicional más, la parte citoquina de la proteína de fusión se obtiene de APRIL humano (SEQ ID NO: 13 o 14), particularmente los aminoácidos 112-247 o 113-247 de la SEQ ID NO: 13, o 112-250 o 113-250 de la SEQ ID NO: 14.

Un elemento enlazador flexible puede estar adicionalmente localizado entre la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma (i) y el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento (ii). El elemento enlazador flexible preferiblemente tiene una longitud de 3-20 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 6, 9, 10, 12, 15 o 18 aminoácidos. Más preferiblemente, la longitud del enlazador es de 9-15 aminoácidos. El elemento enlazador es preferiblemente un enlazador de glicina/serina, es decir, un enlazador peptídico que consiste sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. En una realización especialmente preferida, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Está claro para los expertos que en casos en que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma ya termina con una G, por ejemplo TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) dicha G puede formar la primera G del enlazador en la secuencia enlazadora (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c.

El dominio de trimerización de colectina (ii) puede comprender cualquier miembro de la familia de colectina. Dichos miembros y sus estructuras se resumen en, por ejemplo, Hakansson et al. (Protein Science, 2000, 9:1607-1617) y pueden comprender proteína tensioactiva D, proteína tensioactiva A, proteína de unión a mananos A, proteína de unión a mananos C, colectina del hígado 1, colectina de placenta 1, o colectina-11. El dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de una especie diferente que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. Como alternativa, el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de la misma especie que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. En una realización preferida, el dominio de colectina como se describe en este documento es de ser humano y la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento es de ser humano. En una realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello y de unión a carbohidrato (CRD) de la proteína tensioactiva D, particularmente los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21. En otra realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, particularmente los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21. En otra realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello y de unión a carbohidrato (CRD) de colectina-11, particularmente los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22. En otra realización preferida el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello de colectina-11, particularmente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22.

El dominio de trimerización de colectina (ii) puede comprender un mutante, por ejemplo, un mutante de proteína tensioactiva D o colectina-11, que no se une a manosa. Dichos mutantes pueden identificarse por métodos conocidos para los expertos, por ejemplo, los métodos descritos en Crouch et al. (J Biol Chem, 2006, 281(26): 18008-18014). El dominio de trimerización de colectina (ii) puede comprender adicionalmente un mutante que comprende al menos una sustitución de aminoácido como se describe en este documento y puede generarse como se describe en este documento. Dichas sustituciones de aminoácido pueden modificar la unión del dominio de trimerización de colectina a su ligando manosa y conducir a una alteración de la tasa de eliminación de una proteína de fusión como se describe en este documento cuando se usa en terapia y/o como composición farmacéutica. La modificación puede provocar una unión disminuida o ausencia de unión a manosa y una baja tasa de eliminación. Dichas modificaciones pueden conseguirse por, por ejemplo, sustitución de aminoácido que afecte a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, particularmente por las sustituciones de aminoácido F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K, o F355R. Es especialmente preferida la sustitución F355D. Como alternativa, la modificación puede provocar una unión aumentada a manosa y una alta tasa de eliminación. Dichas modificaciones pueden conseguirse por, por ejemplo, sustitución de aminoácido que afecte a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, particularmente por las sustituciones de aminoácido F355L, F355Y, o F355W.

En la proteína de fusión de la invención como se describe en este documento, el dominio de trimerización de colectina (ii) está localizado de forma C-terminal de la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma (i). Por tanto, la proteína de fusión puede comprender una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello solamente o el dominio de cuello y CRD, por ejemplo, el dominio de cuello y el dominio CRD y/o de cuello de la proteína tensioactiva D o el dominio de cuello y el dominio CRD y/o de cuello de colectina-11, ambos, como se describe en este documento donde esos dominios están localizados de forma C-terminal de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma (i). En esta realización, se prefiere que el dominio de trimerización de colectina comprenda el dominio de cuello y el CRD.

En la proteína de fusión de la invención que se describe en este documento, el dominio de trimerización de colectina (ii) puede estar localizado de manera N-terminal de la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor del mismo (i). Por tanto, la proteína de fusión puede comprender una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello, por ejemplo, el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D o el dominio de cuello de colectina-11, ambos como se describe en este documento, donde esos dominios están localizados de forma N-terminal de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor del mismo (i).

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

En una realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEQ ID NO: 28. Como alternativa, la proteína de fusión anteriormente puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos $(GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c$ donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio CRD y de cuello de colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEQ ID NO: 29 o 30. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos $(GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c$ donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEQ ID NO: 31. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos $(GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c$ donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEQ ID NO: 36 o 37.

En una realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma N-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma N-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEQ ID NO: 32-34. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEQ ID NO: 35.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende CD95L, particularmente CD95L humano, o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 21-160 de la SEQ ID NO: 40, y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 172-209 y 210-327 de la SEQ ID NO: 40, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento. Preferiblemente, la proteína de fusión puede comprender un enlazador, por ejemplo, un enlazador flexible, más preferiblemente un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento que tiene una longitud de preferiblemente 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEQ ID NO: 40, particularmente los aminoácidos 21-327 de la SEQ ID NO: 40.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende LIGHT, particularmente LIGHT humano o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, preferiblemente los aminoácidos 21-170 de la SEQ ID NO: 41, y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 182-219, y 220-337 de la SEQ ID NO: 41, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento. Preferiblemente, la citoquina y el dominio de colectina están conectados por un enlazador, por ejemplo, un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento, que tiene una longitud de preferiblemente 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEQ ID NO: 41, particularmente los aminoácidos 21-327 de la SEQ ID NO: 41.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o mutante de TRAIL como se describe en este documento, por ejemplo, los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 43 (TRAIL de tipo silvestre), los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 47 (TRAILR1mut) o los aminoácidos 21-181 de la SEQ ID NO: 48 (TRAILR2mut). Además, la proteína de fusión comprende un dominio de trimerización de colectina seleccionado entre el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 193-230, y 231-384 de la SEQ ID NO: 43, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento, por ejemplo mutantes mostrados en las SEQ ID NO: 49 o 50. Preferiblemente, el polipéptido de fusión comprende tanto la región de cuello como el CRD de SP-D humana. La citoquina y el dominio de colectina están preferiblemente conectados por un enlazador, por ejemplo, un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Las proteínas preferidas de fusión a este respecto comprenden (i) la SEQ ID NO: 43, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 43, (ii) la SEQ ID NO: 44, particularmente los aminoácidos 21-230 de la SEQ ID NO: 44, (iii) la SEQ ID NO: 47, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 47, (iv) la SEQ ID NO: 48, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 48, (v) la SEQ ID NO: 49, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 49 o (vi) la SEQ ID NO: 50, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEQ ID NO: 50.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento anteriormente, y un dominio de trimerización de colectina, que es el dominio de cuello de colectina-11 humana, y opcionalmente el CRD de colectina-11 humana, por ejemplo, los aminoácidos 193-224 y 225-347 de la SEQ ID NO: 45, respectivamente.

Preferiblemente, el CRD está presente. Preferiblemente, la citoquina y el dominio de colectina están conectados por un enlazador, por ejemplo, un enlazador de glicina/serina como se ha descrito anteriormente en este documento, preferiblemente que tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Las proteínas preferidas de fusión a este respecto comprenden la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 46, particularmente, los aminoácidos 21-347 de la SEQ ID NO: 45 o los aminoácidos 21-229 de la SEQ ID NO: 46.

En otra realización preferida, la proteína de fusión comprende APRIL, particularmente APRIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 21-158 de la SEQ ID NO: 51 y un dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana o un mutante del mismo, como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 170-207 y 208-325 de la SEQ ID NO: 51, respectivamente. La citoquina y el dominio de colectina están conectados preferiblemente por un enlazador, por ejemplo, un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento, preferiblemente que tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. La proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEQ ID NO: 51, particularmente los aminoácidos 21-325 de la SEQ ID NO: 51.

La proteína de fusión como se describe en este documento puede comprender adicionalmente un dominio peptídico señal N-terminal, que permite el procesamiento, por ejemplo, secreción extracelular, en una célula hospedadora adecuada. Preferiblemente, el dominio peptídico señal N-terminal comprende una proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por peptidasa señal y por tanto puede retirarse después de o durante la expresión para obtener la proteína madura. En una realización preferida, el dominio peptídico señal N-terminal comprende la secuencia SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25.

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

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

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se describe en este documento. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN, por ejemplo, una molécula de ADN bicatenaria o monocatenaria, o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión o un precursor de la misma, por ejemplo, una pro- o pre-proforma de la proteína de fusión que puede comprender una secuencia señal como se describe en este documento u otras partes de aminoácidos heterólogos para la secreción o purificación que están preferiblemente localizadas en el extremo N- y/o C-terminal de la proteína de fusión como se describe en este documento. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión donde las partes de aminoácidos heterólogos pueden estar unidas al primer y/o segundo dominio mediante un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por proteasa de Factor X_a, trombina o IgA.

Ejemplos de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia codificante de una proteína de fusión como se describe en este documento son las SEQ ID NO: 38, 39 o 42.

La molécula de ácido nucleico puede estar unida de forma funcional a una secuencia de control de la expresión, por ejemplo, una secuencia de control de la expresión que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar localizada en un vector, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago, un vector viral, un vector de integración cromosómica, etc. Se describen ejemplos de secuencias adecuadas de control de la expresión y vectores, por ejemplo, por Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, y Ausubel et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons o ediciones más recientes del mismo.

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

Además, la invención se refiere a un organismo no humano, por ejemplo, ratón o rata, transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como se describe en este documento. Dichos organismos pueden comprender organismos knock-out, generados por métodos conocidos de transferencia genética incluyendo recombinación homóloga. Como alternativa, dichos organismos pueden comprender organismos transgénicos que comprenden

varias copias de la molécula de ácido nucleico como se describe en este documento. La generación de organismos transgénicos es conocida en la técnica.

La proteína de fusión, el ácido nucleico que codifica la misma, la célula transformada o transfectada, así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejos triméricos, todos como se describe en este documento pueden usarse para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o investigación. Para estas aplicaciones se prefiere usar proteínas de fusión en que tanto la citoquina de la superfamilia de TNF o dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento como el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento son de la misma especie para minimizar los efectos inmunológicos, por ejemplo, de ser humano cuando se aplican dichas proteínas a seres humanos. Además, la fusión de una citoquina de la superfamilia de TNF o dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento a un dominio de trimerización de colectina de cuello como se describe en este documento, por ejemplo, dominio de cuello de la proteína tensioactiva D o colectina-11, puede conducir a una rápida eliminación. Como alternativa, la fusión de una citoquina de la superfamilia de TNF o dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento a un dominio de trimerización de colectina de cuello y CRD como se describe en este documento, por ejemplo, dominio de cuello y CRD de la proteína tensioactiva D o colectina-11, puede conducir a baja eliminación. El uso de mutantes del dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede modificar la tasa de eliminación de la proteína de fusión de un modo como se describe en este documento.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende como agente activo al menos una proteína de fusión, el ácido nucleico que codifica la misma, la célula transformada o transfectada, así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejos triméricos, todos como se describe en este documento.

Al menos una proteína de fusión, el ácido nucleico que codifica la misma, la célula transformada o transfectada así como los complejos triméricos u oligómeros de los complejos triméricos, todos como se describe en este documento pueden usarse en terapia, por ejemplo, en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos seleccionados entre trastornos proliferativos, particularmente trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de citoquinas de TNF, tales como tumores, por ejemplo tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, por ejemplo enfermedades reumatoideas y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazo de trasplantes.

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

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

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

La Tabla 1 muestra una lista de citoquinas de la superfamilia de TNF que pueden usarse en la presente invención.

Tabla 1

Símbolo aprobado del gen	Número TNFSF	Sinónimo	Acceso	NH2-aa	COOH-aa	Longitud
LTA	TNFSF-1	LTA	gi 6806893 ref NP_000586.2 	Ser59	Leu205	147aa
TNF	TNFSF-2	TNF-alfa	gi 25952111 ref NP_000585.2 	Thr60	Leu205	146aa
LTB	TNFSF-3	LTB	gi 4505035 ref NP_002332.11 	Asp86	Leu233	148aa
TNFSF4	TNFSF-4	OX40L/GP34	gi 4507603 ref NP_003317.11 	Asp82	Gly244	163aa
CD40LG	TNFSF-5	CD40L	gi 4557433 ref NP_000065.1 	Gly85	Gly244	159aa
FASLG	TNFSF-6	CD95L/APO-U/FAS-L	gi 4557329 ref NP_000630.1 	Val52	Leu183	132aa
TNFSF7	TNFSF-7	CD27L	gi 4507605 ref NP_001243.1 	Arg55	Leu183	129aa
TNFSF8	TNFSF-8	CD30L	gi 4507607 ref NP_001235.1 	Asp117	Leu261	150aa
TNFSF9	TNFSF-9	4-1BB/CD137L	gi 4507609 ref NP_003802.1 	Glu112	Leu261	145aa
TNFSF10	TNFSF-10	TRAIL	gi 4507593 ref NP_003801.1 	Glu142	Leu281	140aa
TNFSF11	TNFSF-11	TRANCE/RANK L	gi 4507595 ref NP_003692.1 	Arg144	Leu281	138aa
TNFSF12	TNFSF-12	TWEAK/Apo-3	gi 4507597 ref NP_003800.1 	Glu51	Pro193	143aa
TNFSF13	TNFSF-13	APRIUTALL-2/TRDL-1	gi 26051248 ref NP_742085.1 	Asp56	Pro193	138aa
TNFSF13	TNFSF-13	APRIUTALL-2/TRDL-1	gi 4507599 ref NP_003799.1 	Lys97	Asp234	138aa
				Ser98	Asp234	137aa
				Leu102	Asp234	133aa
				Asp86	Glu254	169aa
				Glu116	Gly281	166aa
				Glu118	Gly281	164aa
				Glu161	Asp317	157aa
				Ala103	His249	147aa
				Arg104	His249	146aa
				Arg105	His249	145aa
				Lys112	Leu247	136aa
				Lys112	Leu250	139aa

(continuación)

Símbolo aprobado del gen	Número TNFSF	Sinónimo	Acceso	NH2-aa	COOH-aa	Longitud
TNFSF13B	TNFSF-13B	BAFF/Blys	gi 5730097 ref NP_006564.1 	Glu140	Leu285	146aa
TNFSF714	TNFSF-14	LIGHT	gi 25952144 ref NP_003798.2 	Glu91	Val240	150aa
TNFSF15	TNFSF-15	TL1A/VEGI	gi 23510445 ref NP_005109.2 	Asp91	Leu251	161aa
				Asp93	Leu751	159aa
TNFSF18	TNFSF-18	GITRL	gi 14827034 ref NP_005083.1 	Glu52	Ser177	126aa
EDA		EDA-A1	gi 4503449 ref NP_001390.1 	Glu245	Ser391	147aa
EDA		EDA-A2	gi 54112101 ref NP_001005609.1 	Glu245	Ser389	145aa

En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a nuevas variantes de sustitución de aminoácido de la proteína tensioactiva D (SP-D) humana que comprenden un dominio de reconocimiento de carbohidrato con capacidad reducida de unión a carbohidrato, opcionalmente fusionado a al menos un polipéptido o dominio polipeptídico heterólogo, así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos de fusión. Preferiblemente, los polipéptidos SP-D mutados de la presente invención tienen una sustitución de aminoácido en la posición F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, particularmente una sustitución de aminoácido por aminoácido hidrófilo o cargado, por ejemplo, F355S, F355T, F355E, F355D, F355H o F355R, particularmente F355D. El polipéptido o dominio polipeptídico heterólogo es preferiblemente de mamífero, por ejemplo, de origen humano, por ejemplo, un dominio de citoquina de TNSF como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos SP-D mutados preferiblemente comprenden un dominio de cuello de SP-D como se ha descrito anteriormente. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N- y/o C-terminal del dominio SP-D. Preferiblemente, está presente un enlazador, por ejemplo, un enlazador como se ha descrito en este documento anteriormente, entre la SP-D y el dominio polipeptídico heterólogo.

Estructura básica de una proteína de fusión

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

1.1 Secuencias de los péptidos señal

MNFGFSLIFLVVLKGVQC (SEQ ID NO: 23)
 METDTLLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 24)
 METDTLLLWVLLWVPAGNG (SEQ ID NO: 25)

1.2 Indicador-epítipo/sitio de procesamiento por enteroquinasa

DYKDDDDKD

1.3 Colectinas humanas

Proteína tensioactiva D (SEQ ID NO: 21)

```

1      MLLFLLSALV LLTQPLGYLE AEMKTYSHRT TPSACTLVMC SSVESGLPGR
DGRDGGREGPR
61     GEKGDPGLPG AAGQAGMPGQ AGPVGPKGDN GSVGEPGPKG DTGPGSGPPGP
PGVPGGPAGRE
121    GPLGKQGNIG PQGKPGPKGE AGPKGEVGAP GMQGSAGARG LAGPKGERGV
PGERGVPGNA
181    GAAGSAGAMG PQGSPGARGP PGLKGDKGIP GDKGAKGESG LPDVASLRQQ
VEALQGQVQH
241    LQAAFSQYKK VELFPNGQSV GEKIFKTAGF VKPFTEAQLL CTQAGGQLAS
PRSAANAAL
301    QQLVVAKNEA AFLSMTDSKT EGKFTYPTGE SLVYSNWAPG EPNDDGGSSE
CWEIFTNGKW
361    NDRACGEKRL VVCEF

```

Colectina-11 (SEQ ID NO: 22)

```

1      MRGNLALVGV LISLAFLSLL PSGHPQPAGD DACSVQILVP GLKGDAKEKG
DKGAPGRPGR
61     VGPTGEKGDM GDKGQKGSVG RHGKIGPIGS KGEKGDSGDI GPPGPNGEPG
LPCECSQLRK
121    AIGEMDNQVS QLTSELKFIK NAVAGVRETE SKIYLLVKEE KRYADAQLSC
QGRGGTSLMP
181    KDEAANGLMA AYLAQAGLAR VFIGINDLEK EGAFVYSDHS PMRTFNKWSR
GEPNNAYDEE
241    DCVEMVASGG WNDVACHTTM YFMCEFDKEN M

```

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

1.4 Elemento enlazador flexible

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

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

5	SEC-ID-01 SEC NP_000586_TNFSF1_LTA PALABRA CLAVE PROTEÍNA CARACTERÍSTICAS ORIGEN
10	1 MTPPERLFLP RVC GTTLHLL LLGLLLVLLP GAQGLPGVGL TPSAAQTARQ HPKMHLAHST 61 LKPA AHLIGD PSKQNSLLWR ANT DRAFLQD GFSLSNNSLL VPTSGIYFVY SQVVFSGKAY 121 SPKATSSPLY LAHEVQLFSS QYPFHVPLLS SQKMVYPGLQ EPWLHSMYHG AAFQLTQGDQ 181 LSTHTDGIPH LVLSPSTVFF GAFAL
15	SEC-ID-02 SEC NP_000585_TNFSF2_TNFa PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN
20	1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL LHFGVIGPQR 61 EEFPRLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEQ QLQWLNRRAN ALLANGVELR 121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE 181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL
25	SEC-ID-03 SEC NP_002332_TNFSF3_LTB PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN
30	1 MGALGLEGRG GRLQGRGSL LAVA GATSLV TLLLAVPITV LAVLALVPQD QGGLVTETAD 61 PGAQAQQGLG FQKLPEEEPE TDLSPGLPAA HLIGAPLKGQ GLGWETTKEQ AFLTSGTQFS 121 DAEGIALPQD GLYYLYCLVG YRGRAPPGGG DPQGRSVTLR SSLYRAGGAY GPGTPELLLE 181 GAETVTPVLD PARRQGYGPL WYTSVGFGL VQLRRGERVY VNISHPDMVD FARGKTFFGA 241 VMVG
35	SEC-ID-04 SEC NP_003317_TNFSF4_OX40L PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN
	1 MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 61 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ 121 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 181 CVL
	SEC-ID-05 SEC NP_000065_TNFSF5_CD40L PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN

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

SEC-ID-06

SEC NP_000630_TNFSF6_CD95L

5 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MQQPFNYYP QIYVVDSSAS SPWAPPGTVL PCPTSVPRRP GQRRPPPPPP
 PPPLPPPPPP
 61 PPLPPLPLPP LKKRGNHSTG LCLLVMMFMV LVALVGLGLG MFQLFHLQKE
 LAELRESTSQ
 121 MHTASSLEKQ IGHPSPPEK KELRKVAHLT GKSNSRSMPL EWEDTYGIVL
 LSGVKYKKG
 181 LVINETGLYF VYSKVYFRGQ SCNNLPLSHK VYMRNSKYPQ DLVMMEGKMM
 SYCTTGQMW
 241 RSSYLGAVFN LTSADHLYVN VSELSLVNFE ESQTFFGLYK L

SEC-ID-07

SEC NP_001243_TNFSF7_CD27L

10 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

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

SEC-ID-08

SEC NP_001235_TNFSF8_CD30L

20 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

1 MDPGLQQALN GMAPPGDTAM HVPAGSVASH LGTTSRSYFY LTTATLALCL
 VFTVATIMVL
 61 VVQRTDSIPN SPDNVPLKGG NCSEDLLCIL KRAPFKKSWA YLQVAKHLNK
 TKLSWNKDI
 121 LHGVRYQDGN LVIQFPGLYF IICQLQFLVQ CPNNSVDLKL ELLINKHIKK
 QALVTVCESG
 181 MQTKHVVQNL SQFLLDYLQV NTTISVNVDI FQYIDTSTFP LENVLSIFLY SNSD

SEC-ID-09

SEC NP_003802_TNFSF9_CD137L

25 PALABRA CLAVE PROTEÍNA
 ORIGEN

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

SEC-ID-10

SEC NP_003801_TNFSF10_TRAIL
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

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

SEC-ID-11
SEC NP_003692_TNFSF11_a_RANKL
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MRRASRDYTK YLRGSEEMGG GPGAPHEGPL HAPPPPAPHQ PPAASRSMFV
ALLGLGLGQV
61 VCSVALFFYF RAQMDPNRIS EDGTHCIYRI LRLHENADFQ DTTLESQDTK
LIPDSCRRIK
121 QAFQGAUVKE LQHIVGSQHI RAEKAMVDGS WDLAKRSKL EAQPFAHLTI
NATDIPSGSH
181 KVSLSWYHD RGWAKISNMT FSNGKLIVNQ DGFYLYYANI CFRHHETSGD
LATEYLQLMV
241 YVTKTSIKIP SSHTLMKGGG TKYWSGNSEF HFYSINVGGF FKLRSGEEIS
IEVSNPSLLD
301 PDQDATYFGA FKVRDID

SEC-ID-12
SEC NP_003800_TNFSF12_TWEAK
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MAARRSQRRR GRRGEPGTAL LVPLALGLGL ALACLGLLLA VVSLGSRASL
SAQEPAQEEL
61 VAEEDQDPSE LNPQTEESQD PAPFLNRLVR PRRSAPKGRK TRARRAIAAH
YEVHPRPGQD
121 GAQAGVDGTV SGWEARINS SSPLRYNRQI GEFIVTRAGL YYLYCQVHFD
EGKAVYLKLD
181 LLVDGVLALR CLEEFSAATAA SSLGPQLRLC QVSGLLALRP GSSLRIRTLF
WAHLKAAPFL
241 TYFGLFQVH

SEC-ID-13
SEC NP_742085_TNFSF13_APRIL_ver1
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSVA LWLSWGAALG AVACAMALLT
QQTQLQSLRR
61 EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK
QKKQHSVLHL
121 VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GVVLLYSQVL
FQDVTFTMGQ
181 VVSREGQGRQ ETLFR CIRSM PSHPDRAVNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP
RARAKLNLSP
241 HGTFLGL

SEC-ID-14
SEC NP_003799_TNFSF13_APRIL_ver2
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

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

SEC-ID-15

SEC NP_006564_TNFSF13b_BAFF

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

1 MDDSTEREQS RLTSCLKKRE EMKLKECVSI LPRKESPSVR SSKDGKLLAA
 TLLLALLSCC
 61 LTVVSFYQVA ALQGDLASLR AELQGHHA EK LPAGAGAPKA GLEEAPAVTA
 GLKIFEPPAP
 121 GEGNSSQNSR NKRAVQGPEE TVTQDCLQLI ADSETPTIQK GSYTFVPWLL
 SFKRGSAL EE
 181 KENKILVKET GYFFIYGQVL YTDKTYAMGH LIQRKKVHVF GDELSLVTLF
 RCIQNPETL

241 PNNSCYSAGI AKLEEGDELQ LAIPRENAQI SLDGDVTFFG ALKLL

SEC-ID-16

SEC NP_003798_TNFSF14_LIGHT

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

1 MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLMGAG
 LAVQGWFLQ
 61 LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLIQERRSH EVNPAHLTG ANSSLTGSGG
 PLLWETQLGL
 121 AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YYIYSKVQLG GVGCPGLAS TITHGLYKRT
 PRYPEELELL
 181 VSQQSPCGRA TSSSRVWWS SFLGGVVHLE AGEKVVRVL DERLVRLDG
 TRSYFGAFMV

SEC-ID-17

SEC NP_005109_TNFSF15_TL1A

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

1 MAEDLGLSFG ETASVEMLPE HGSCRPKARS SSARWALTCC LVLLPFLAGL
 TTYLLVSQLR
 61 AQGEACVQFQ ALKGQEFAPS HQQVYAPLRA DGDKPRAHLT VVRQTPTQHF
 KNQFPALHWE
 121 HELGLAFTKN RMNYTNKFLI IPESGDYFIY SQVTFRGMTS ECSEIRQAGR
 PNKPDSITVV
 181 ITKVTDSYPE PTQLLMGTS VCEVGSNWFQ PIYLGAMFSL QEGDKLMVNV
 SDISLVDTYK
 241 EDKTFFGAFL L

SEC-ID-18

SEC NP_005083_TNFSF18_GITRL

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

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

SEC-ID-19
SEC NP_001390_EDA-A1
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

5

```

1      MGYPEVERRE LLPAAAPRER GSQGC GCGGA PARAGEGNSC LLFLGFFGLS
LALHLLTLCC
61     YLELRSELRR ERGAESRLGG SGTPTSGTL SSLGG LDPDS PITSHLGQPS
PKQQPLEPGE
121    AALHSDSQDG HQMALLNFFF PDEKPYSEEE SRRVRRNKRS KSNEGADGPV
KNKKKGKKAG
181    PPGPNGPPGP PGPPGPQGGP GIPGIPGIPG TTVMGPPGPP GPPGPQGGPP
LQGPGGAADK
241    AGTRENQPAV VHLQGGGSAI QVKNDLGGV LNDWSRITMN PKVFKLHPRS
GELEVLVDGT
301    YFIYSQVEVY YINFTDFASY EVVVDEKPFL QCTRSIETGK TNYNTCYTAG
VCLLKARQKI
361    AVKMVHADIS INMSKHTTFF GAIRLGEAPA S

```

SEC-ID-20
SEC NP_001005609_EDA-A2
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

10

```

1      MGYPEVERRE LLPAAAPRER GSQGC GCGGA PARAGEGNSC LLFLGFFGLS
LALHLLTLCC
61     YLELRSELRR ERGAESRLGG SGTPTSGTL SSLGG LDPDS PITSHLGQPS
PKQQPLEPGE
121    AALHSDSQDG HQMALLNFFF PDEKPYSEEE SRRVRRNKRS KSNEGADGPV
KNKKKGKKAG
181    PPGPNGPPGP PGPPGPQGGP GIPGIPGIPG TTVMGPPGPP GPPGPQGGPP
LQGPGGAADK
241    AGTRENQPAV VHLQGGGSAI QVKNDLGGV LNDWSRITMN PKVFKLHPRS
GELEVLVDGT
301    YFIYSQVYYI NFTDFASYEV VVDEKPFLQC TRSIETGKTN YNTCYTAGVC
LLKARQKIAV
361    KMOVHADISIN MSKHTTFFGA IRLGEAPAS

```

15

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

1.6 Ejemplos de proteínas de fusión

20

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

```

1      METDTLLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RENGELVIHEK GFYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VSGGLPDVAS LRQOVEALOG QVQHLOAFS QYKKVELFPN GQSVGEKIFK
TAGFVKPFTE
241    AQLCTQAGG QLASPRSAE NAALQQLVVA KNEAFLSMT DSKTEGKFTY
PTGESLVYSN
301    WAPGEPNDG GSEDCVEIFT NGKWDRACG EKRLVVCEF

```

25

SEQ ID NO: 27 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-2_PRO.PRO
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

30

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVAAH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61 SSRSGHSFLS NLHLRNGELV IHEKGFYIY SQT YFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121 YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181 GAFLVGSGLP DVASLRQQVE ALQGQVQHLQ AAFSQQYKKVE LFPNGQSVGE
KIFKTAGFVK
241 PFTEAQLLCT QAGGQLASPR SAAENAALQQ LVVAKNEAAF LSMTDSKTEG
KFTYPTGESL
301 VYSNWAPGEP NDDGGSEDCV EIFTNGKWND RACGEKRLVV CEF

SEQ ID NO: 28
ORIGEN

5

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVAAH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61 SSRSGHSFLS NLHLRNGELV IHEKGFYIY SQT YFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121 YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181 GAFLVGSGLP DVASLRQQVE ALQGQVQHLQ AAFSQQYKKVE LFPNG

SEQ ID NO: 29 SP-hsTrailsin-col11-Construcción-1.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

10

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

SEQ ID NO: 30 SP-hsTrailsin-col-11-Construcción-2.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

15

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG ERGPQRVAAH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61 SSRSGHSFLS NLHLRNGELV IHEKGFYIY SQT YFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121 YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181 GAFLVGSQLR KAIGEMDNQV SOLTSELKFI KNAVAGVRET ESKIYLLVKE
EKRYADAQLS
241 CQGRGGTSLM PKDEAANGLM AAYLAQAGLA RVFIGINDLE KEGAFVYSDH
SPMRTFNKWR
301 SGEPNNAYDE EDCVEMVASG GWNDVACHTT MYFMCEFDKE NM

20

SEQ ID NO: 31 SP-hsTrailsin-col-11-Construcción-3.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 METDTLLLV LLLWVPGSTG ERGPQRVA AH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61 SSRSGHSFLS NLHLRNGELV IHEKGFYIY SQTYFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121 YPDPILLMKS ARNSCWSKDA EYGLYSIYQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181 GAFLVGSOLR KAIGEMDNQV SOLTSELKFI KNAVAGVRET ES

SEQ ID NO: 32 INDICADOR-hCol11-hTRAIL_Glu116_Gly281.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MNFGFSLIFL VLVKGVQCD YKDDDDKGLP CECSQLRKAI GEMDNQVSQ L
TSELKFIKNA
61 VAGVRETESE RGPQRVA AH I TGRGRSNTL SSPNSKNEKA LGRKINSWES
SRSGHSFLSN
121 LHLRNGELVI HEKGFYIYQS QTYFRFQEEI KENTKNDKQM VQYIYKYTSY
PDPILLMKS
181 RNSCWSKDAE YGLYSIYQGG IFELKENDRI FVSVTNEHLI DMDHEASFFG
AFLVG

SEQ ID NO: 33 INDICADOR-hCol11s-hTRAIL_Glu116_Gly281.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MNFGFSLIFL VLVKGVQCD YKDDDDKGLP CECSQLRKAI GEMDNQVSQ L
TSELKFIKNA
61 VAGVRETERG PQRVA AH ITG TRGRSNTLSS PNSKNEKALG RKINSWESSR
SGHSFLSNLH
121 LRNGELVIHE KGFYIYQSQT YFRFQEEIKE NTKNDKQMVQ YIYKYTSYPD
PILLMKSARN
181 SCWSKDAEY G LYSIYQGGIF ELKENDRIFV SVTNEHLIDM DHEASFFGAF LVG

SEQ ID NO: 34 hCol11s-hTRAIL_Glu116_Gly281.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MNFGFSLIFL VLVKGVQCG LPCECSQLRK AIGEMDNQVS QLTSELKFIK
NAVAGVRETE
61 RGPQRVA AH I TGRGRSNTL SSPNSKNEKA LGRKINSWES SRSGHSFLSN
LHLRNGELVI
121 HEKGFYIYQS QTYFRFQEEI KENTKNDKQM VQYIYKYTSY PDPILLMKS
RNSCWSKDAE
181 YGLYSIYQGG IFELKENDRI FVSVTNEHLI DMDHEASFFG AFLVG

SEQ ID NO: 35 INDICADOR-hCol11-GSS-hTRAIL_Glu116_Gly281.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

1 MNFGFSLIFL VLVKGVQCD YKDDDDKGLP CECSQLRKAI GEMDNQVSQ L
TSELKFIKNA
61 VAGVRETESG SSGSSGSSGS GERGPQRVAA HITGTRGRSN TLSSPNSKNE
KALGRKINSW
121 ESSRSGHSFL SNLHLRNGEL VIHEKGFYIY YSQTYFRFQE EIKENTKNDK
QMVQYIYKYT
181 SYDPILLMK SARNSCWSKD AEYGLYSIYQ GGIFELKEND RIFVSVTNEH
LIDMDHEASF
241 FGAFLVG

SEQ ID NO: 36 Sp1-hTRAIL_Glu116_Gly281-GSS-col11.pro
PALABRA CLAVE PROTEÍNA
ORIGEN

```

1      MNFGFSLIFL VLVKGVQCE RGPQRVAHI TGTRGRSNTL SSPNSKNEKA
LGRKINSWES
61     SRSGHSFLSN LHLRNGELVI HEKGFYIYS QTYFRFQEEI KENTKNDKQM
VQYIYKYTSY
121    PDPILLMKSA RNSCWSKDAE YGLYSIQGG IFELKENDRI FVSVTNEHLI
DMDHEASFFG
181    AFLVGSSGSS GSSGSGLPCE CSQLRKAIGE MDNQVSQLTS ELKFIKNAVA
GVRETES

```

SEQ ID NO: 37 Sp3-hTRAIL_Glu116_Gly281-GSS-col11.pro

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG ERGPQRVAH ITGTRGRSNT LSSPNSKNEK
ALGRKINSWE
61     SSRSGHSFLS NLHLRNGELV IHEKGFYIY SQTFRFQEE IKENTKNDKQ
MVQYIYKYTS
121    YPDPIILLKS ARNSCWSKDA EYGLYSIQG GIFELKENDR IFVSVTNEHL
IDMDHEASFF
181    GAFLVGSSGS SGSSGSGLPCE ECSQLRKAIG EMDNQVSQLT SELKFIKNAV
AGVRETES

```

SEQ ID NO: 38 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-1_ADN.sec: 1045 pb

PALABRA CLAVE ADN (la secuencia codificante de ADN correspondiente a la SEQ ID NO: 26 empieza en la posición de la base 16)

ORIGEN

```

1      AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCGATACA CTGCTCTTGT GGGTGCTCTT
GCTGTGGGTT
61     CCTGCAGGTA ATGGTCAAAG AGTCGCAGCT CACATCACTG GGACTAGAGG
CAGGAGTAAC
121    ACCCTGAGTT CTCCCAATTC CAAGAACGAG AAAGCCCTGG GTAGGAAGAT
CAACTCCTGG
181    GAAAGCTCCA GAAGCGGCCA TAGCTTTCTT AGCAACCTCC ACTTGAGGAA
TGGCGAACTT
241    GTGATCCATG AGAAGGGCTT CTACTACATC TACAGCCAGA CGTACTTCAG
GTTCCAGGAG
301    GAAATCAAGG AGAACACCAA GAACGACAAG CAGATGGTGC AATACATCTA
CAAGTACACG
361    TCATACCCTG ATCCTATACT GCTGATGAAG TCCGCCAGAA ACAGTTGCTG
GAGCAAAGAC
421    GCTGAATACG GCCTGTATTC CATCTATCAG GCGGGTATCT TTGAACTCAA
GGAGAACGAC
481    AGGATCTTCG TGTCTGTGAC AAACGAGCAT CTGATCGACA TGGACCATGA
AGCGTCTTTC
541    TTCGGTGCCT TCTTGGTGGG ATCCGGTTTG CCAGATGTTG CTTCTTTGAG
ACAACAGGTT
601    GAGGCTTTGC AGGGTCAAGT CCAGCACTTG CAGGCTGCTT TCTCTCAATA
CAAGAAGGTT
661    GAGTTGTTCC CAAATGGTCA ATCTGTTGGC GAAAAGATTT TCAAGACTGC
TGTTTCGTC
721    AAACCATTC ACGAGGCACA ATTATTGTGT ACTCAGGCTG GTGGACAGTT
GGCCTCTCCA
781    CGTTCTGCCG CTGAGAACGC CGCCTTGCAA CAATTAGTCG TAGCTAAGAA
CGAGGCTGCT
841    TTCTTGAGCA TGA CTGATTC CAAGACAGAG GGCAAGTTCA CCTACCCAAC
AGGAGAATCC
901    TTGGTCTATT CTAATTGGGC ACCTGGAGAG CCCAACGATG ATGGCGGCTC
AGAGGACTGT
961    GTGGAAATCT TCACCAATGG CAAGTGGAAAT GACAGAGCTT GTGGAGAGAA
GCGTTTGGTG
1021   GTCTGTGAGT TCTAATAGCG GCCGC

```

SEQ ID NO: 39 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-2_ADN.sec: 1057 pb

PALABRA CLAVE ADN (la secuencia codificante de ADN correspondiente a la SEQ ID NO: 27 empieza en la posición de la base 16)

ORIGEN

```

1      AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCGATACA CTGCTCTTGT GGGTACTCTT
GCTGTGGGTT
61      CCGGGATCTA CCGGTGAACG TGGTCTCTAA AGAGTCGCAG CTCACATCAC
TGGGACTAGA
121     GGCAGGAGTA ACACCCTGAG TTCTCCCAAT TCCAAGAACG AGAAAGCCCT
GGGTAGGAAG
181     ATCAACTCCT GGGAAAGCTC CAGAAGCGGC CATAGCTTTC TTAGCAACCT
CCACTTGAGG
241     AATGGCGAAC TTGTGATCCA TGAGAAGGGC TTCTACTACA TCTACAGCCA
GACGTACTTC
301     AGGTTCAGG AGGAAATCAA GGAGAACACC AAGAACGACA AGCAGATGGT
GCAATACATC
361     TACAAGTACA CGTCATACCC TGATCCTATA CTGCTGATGA AGTCCGCCAG
AAACAGTTGC
421     TGGAGCAAAG ACGCTGAATA CGGCCTGTAT TCCATCTATC AGGGCGGTAT
CTTTGAACTC
481     AAGGAGAACG ACAGGATCTT CGTGTCTGTG ACAAACGAGC ATCTGATCGA
CATGGACCAT
541     GAAGCGTCTT TCTTCGGTGC CTTCTTGGTG GGATCCGGTT TGCCAGATGT
TGCTTCTTTG
601     AGACAACAGG TTGAGGCTTT GCAGGGTCAA GTCCAGCACT TGCAGGCTGC
TTTCTCTCAA
661     TACAAGAAGG TTGAGTTGTT CCCAAATGGT CAATCTGTTG GCGAAAAGAT
TTTCAAGACT
721     GCTGGTTTCG TCAAACCATT CACGGAGGCA CAATTATTGT GTACTCAGGC
TGGTGGACAG
781     TTGGCCTCTC CACGTTCTGC CGCTGAGAAC GCCGCCTTGC AACAATTAGT
CGTAGCTAAG
841     AACGAGGCTG CTTTCTTGAG CATGACTGAT TCCAAGACAG AGGGCAAAGT
CACCTACCCA
901     ACAGGAGAAT CCTTGGTCTA TTCTAATTGG GCACCTGGAG AGCCCAACGA
TGATGGCGGC
961     TCAGAGGACT GTGTGGAAAT CTTACCAAT GGCAAGTGGG ATGACAGAGC
TTGTGGAGAG
1021    AAGCGTTTGG TGGTCTGTGA GTTCTAATAG CGGCCGC

```

Ejemplos

1. Materiales y métodos

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

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

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

Motivo de trimerización	Aminoácidos de las secuencias wt no procesadas para la construcción del motivo	Entrada Swiss-Prot
SPD	220 - 375	P35247
SPD_F335A	220 - 375; The355 -> Ala355	P35247
SPD_F335D	220 - 375; Phe355 -> Asp355	P35247
CCSPD	220 - 257	P35247
Col11	117 - 271	Q9BWP8
CC11	116 - 151	Q9BWP8

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

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

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

Tabla 4: Nombres de enlazadores y secuencia de aminoácidos (G = glicina; S = serina)

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

1.2 Generación de construcciones de expresión

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

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

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

Enlazador Motivo	TRAIL (tipo silvestre)				Muteína de TRAIL (R1-específica)				Muteína de TRAIL (R2-específica)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
SPD	●	●	●	●	●	n.s.	n.s.	●	●	n.s.	n.s.	●
SPD_F335A	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SPD_F335D	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CCSPD	●	●	●	●	●	n.s.	n.s.	●	●	n.s.	n.s.	●
Col11	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CC11	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T4	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
69	●	●	●	●	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

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

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

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

5 1.3 Expresión y purificación de ligandos modificados por ingeniería de la superfamilia de TNF

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

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

1.4. Ensayos de muerte celular

Para analizar la activación de caspasas, se usó un ensayo celular con la línea de células T humanas permanente Jurkat A3 (n.º cat. CRL2570, ATCC). Las células Jurkat se cultivaron en matraces con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) suplementado con FBS al 10 % (Biochrom), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GibCo). Antes del ensayo, se sembraron 100.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La adición de diferentes soluciones que contenían la proteína con o sin un anticuerpo de entrecruzamiento a los pocillos (volumen final: 200 µl) estuvo seguida de una incubación de 3 horas a 37 °C. Las células se lisaron añadiendo 20 µl de tampón de lisis (HEPES 250 mM, MgCl₂ 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 al 5 %, DTT 100 mM, AEBSEF 10 mM, pH 7,5) y las placas se incubaron en hielo durante 30 minutos hasta 2 horas. La apoptosis coincide con una actividad aumentada de caspasas. Por tanto, se usó la escisión del sustrato de caspasa específico Ac-DEVD-AFC (Biomol) para determinar el grado de apoptosis. Para el ensayo de actividad caspasa, se transfirieron 20 µl de lisado celular a una placa de microtitulación negra de 96 pocillos. Después de la adición de 80 µl de tampón que contenía HEPES 50 mM, sacarosa al 1 %, CHAPS al 0,1 %, Ac-DEVD-AFC 50 µM, y DTT 25 mM, pH 7,5, la placa se transfirió a un lector de placa de microtitulación Tecan Infinite F500 y se controló el aumento en la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 400 nm, longitud de onda de emisión de 505 nm).

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

1.5 Ensayo de citotoxicidad hepatocelular

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

1.6 Streptactin-ELISA

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

1.7 Ensayo de unión a manano

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

1.8 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD

A ratones CD1 macho (Charles River) se les inyectó por vía intravenosa 10 µg de proteína disuelta en 300 µl de PBS (Invitrogen). Se recogió sangre después de 0 min (predosis), 5 min, 30 min, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Para cada punto temporal, se recogieron dos muestras. Las muestras de sangre se procesaron para obtener suero y se almacenaron a -15 °C. La concentración de proteínas de fusión de TRAIL se determinó usando un ELISA como se describe a continuación (sección 1.9) y se calcularon las semi-vidas (GraphPad Prism v4.0).

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

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

Se recubrieron placas ELISA durante 1 h a 37 °C con 2 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-TRAIL (clon RIK-2; Pharmingen). Después de lavar con PBS + Tween-20 al 0,1 % y bloquear la placa durante 30 min a 37 °C con StartingBlock™ (Pierce), se añadieron muestras de suero a una concentración del 0,2 % y 5 %, muestras de calibración y muestras de control y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las muestras de calibración y control se prepararon a partir del lote respectivo de TRAIL (TRAIL-ASPD o TRAIL-ASPD-F335A o TRAIL-ASPD-F335D) y se suplementaron con suero al 0,2 % o 5 % de ratón CD1 combinado sin tratar para justificar los efectos potenciales de la matriz. Las muestras de control (concentración alta, media y baja de la construcción de TRAIL) se añadieron como controles de calidad para asegurar la precisión y exactitud de la cuantificación de TRAIL en la ventana de ensayo dada. Las placas se lavaron de nuevo y se detectaron las construcciones de TRAIL que contenían la marca Estrep con StrepTactin-POD (IBA) diluido 1:1000. Todas las muestras y proteínas se diluyeron con tampón ELISA (PBS, Tween-20 al 0,1 %, Starting Block al 5 % (Pierce)). La reacción de color se inició después de la adición de 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics). Se determinó la absorbancia a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H₂SO₄ al 25 % como solución de parada. Los valores se calcularon como

450 nm - 630 nm con MS Excel.

2. Resultados

5 2.1 Caracterización de proteína de fusión de CD95L (CD95L-ASPD)

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

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

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

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

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

SEC ID 40 Sp-CD95L-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 346, PM=37682

ORIGEN

```

1  METDTLLLWV LLLWVPGSTG ELRKVAHLTG KNSRSMPLE WEDTYGIVLL
SGVKYKKGGL
61  VINETGLYFV YSKVYFRGQS CNNLPLSHKV YMRNSKYPQD LVMMEGKMMS
YCTTGQMWAR
121 SSVVGAVFNL TSADHLYNVV SELSLVNFEESQTFFGLYKL GSSGSSGSSG
40  SGLPDVASLR
181  QQVEALQGQV QHLQAAFSQY KKVELFPNGQ SVGEKIFKTA GFVKPFTEAQ
LLCTQAGGQL
241  ASPRSAAENA ALQQLVVAKN EAAFLSMTDS KTEGKFTYPT GESLVYSNWA
PGEPNDDGGS
301  EDCVEIFTNG KWNDRACGEK RLVVCEFGGS PSSSSSSAWS HPQFEK

```

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

21 - 160: CD95L-dominio de unión a receptor

161 - 171: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)

172 - 209: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana

210 - 327: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana

328 - 338: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

339 - 346: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

50 2.2 Caracterización de proteínas de fusión de LIGHT (LIGHT-ASPD)

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

resultados se muestran en la Fig. 5.

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

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

SEC ID 41 Sp-LIGHT-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 356, PM=37931

ORIGEN

```

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

```

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

21 - 170: LIGHT-dominio de unión a receptor

171 - 181: Elemento enlazador flexible (enlazador A; cursiva)

182 - 219: Región superenrollada de "cuello" de SP-D humana

220 - 337: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana

338 - 348: Elemento enlazador (GGSPSSSSSA)

349 - 356: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

2.3 Caracterización de proteínas de fusión de TRAIL

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

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

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

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

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

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

fluorogénico.

Como resultado, la actividad caspasa disminuía con el tipo de elemento enlazador empleado (A>B>C>D) y con el plegamiento empleado. Se expresan construcciones de TRAIL de contenían colectina-11 o hélice superenrollada de colectina-11 (CCCol11) (mostradas por análisis de transferencia de Western), sin embargo, no fueron funcionales, mientras que los motivos de plegamiento derivados de SPD produjeron ligandos TRAIL funcionales. Los resultados se muestran en la Fig. 8.

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

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

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

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

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

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

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

ORIGEN

1	<u>AAGCTT</u> GCCG	CCACCATGGA	GACCGATACA	CTGCTCTTGT	GGGTGCTCTT
GCTGTGGGTT					
61	CCTGCAGGTA	ATGGTCAAAG	AGTCGCAGCT	CACATCACTG	GGACTAGAGG
CAGGAGTAAC					
121	ACCCTGAGTT	CTCCCAATTC	CAAGAACGAG	AAAGCCCTGG	GTAGGAAGAT
CAACTCCTGG					

```

181      GAAAGCTCCA GAAGCGGCCA TAGCTTTCTT AGCAACCTCC ACTTGAGGAA
TGGCGAACTT
241      GTGATCCATG AGAAGGGCTT CTACTACATC TACAGCCAGA CGTACTTCAG
GTTCCAGGAG
301      GAAATCAAGG AGAACACCAA GAACGACAAG CAGATGGTGC AATACATCTA
CAAGTACACG
361      TCATACCCTG ATCCTATACT GCTGATGAAG TCCGCCAGAA ACAGTTGCTG
GAGCAAAGAC
421      GCTGAATACG GCCTGTATTC CATCTATCAG GCGGTATCTT TTGAACTCAA
GGAGAACGAC
481      AGGATCTTCG TGTCTGTGAC AAACGAGCAT CTGATCGACA TGGACCATGA
AGCGTCTTTC
541      TTCGGTGCCT TCTTGGTGGG ATCCTCTGGT TCGAGTGGTT CGAGTGGTTC
TGGATTGCCA
601      GACGTTGCTT CTTTGAGACA ACAGGTTGAG GCTTTCAGAG GTCAAGTCCA
GCACTTGACG
661      GCTGCTTTCT CTCAATACAA GAAGGTTGAG TTGTTCCCAA ACGGTCAATC
TGTTGGCGAA
721      AAGATTTTCA AGACTGCTGG TTTCGTCAA CCATTCACGG AGGCACAATT
ATTGTGTACT
781      CAGGCTGGTG GACAGTTGGC CTCTCCACGT TCTGCCGCTG AGAACGCCGC
CTTGCAACAG
841      TTGGTCGTAG CTAAGAACGA GGCTGCTTTC TTGAGCATGA CTGATTCCAA
GACAGAGGGC
901      AAGTTCACCT ACCCAACAGG AGAATCCTTG GTCTATTCTA ATTGGGCACC
TGGAGAGCCC
961      AACGATGATG GCGGCTCAGA GGAATGTTG GAAATCTTCA CCAATGGCAA
GTGGAATGAC
1021     AGAGCTTGTG GAGAGAAGCG TTTGGTGGTC TGTGAGTTCG GAGGCAGTCC
TTCATCTTCA
1081     TCTAGCTCTG CCTGGTCGCA TCCACAATC GAGAAATAAT AGCGGCCGC

```

SEC ID 43 Sp-TRAIL-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40404

ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RNgELVIHEK GFYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKsARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSsGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGQ VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRsAAEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDCVEIFTN GKWNDRACGE KRLVVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

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

21 - 181: TRAIL-dominio de unión a receptor

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

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

231 - 348: Dominio de lectina tipo C de SP-D humana

349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSA)

360 - 367: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

SEC ID 44 Sp-TRAIL-ACCSPD

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27534

ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL  RNGELVIHEK  GFYYIYSQTY  FRFQEEIKEN  TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS  CWSKDAEYGL  YSIYQGGIFE  LKENDRIFVS  VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181     VGSSGSSGSS  GSGLPDVASL  RQQVEALQGQ  VQHLQAAFSQ  YKKVELFPNG
PSSSSSSAWS
241     HPQFEK

```

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

SEC ID 45 Sp-TRAIL-ACol11

Cantidad total de aminoácidos: 365, PM=40806
ORIGEN

```

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

```

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

SEC ID 46 Sp-TRAIL-ACC11

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27431
ORIGEN

```

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

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (subrayado)
21 - 181: TRAIL-dominio de unión a receptor
182 - 193: Elemento enlazador flexible (enlazador A; GSS GSS GSS GSG cursiva)
194 - 229: Región superenrollada de "cuello" de colectina-11 humana
230 - 238: Elemento enlazador (GPSSSSSSA)
239 - 246: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

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

Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 con plásmidos de expresión que codificaban diferentes

construcciones de SPD selectivas de receptor de TRAIL:

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

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

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

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

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

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

disulfuro. La especie trimérica estuvo presente en las fracciones A8 a A11 y se usó para análisis posteriores.

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

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

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

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

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

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

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

SEC ID 47 Sp-TRAILR1mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40335

ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RINGELVIHEK GFYYIYSQTA FRFSEEIKEV TRNDKQMVQY
IYKWTDPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGO VQHLQAQFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGGS SEDCVEIFTN GKWNDRACGE KRLVVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

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

SEC ID 48 Sp-TRAILR2mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40401
ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RINGELVIHEK GFYYIYSQTQ FKFREEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNERLLQMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGO VQHLQAQFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGGS SEDCVEIFTN GKWNDRACGE KRLVVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

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

2.5 Caracterización de variantes de carbohidrato de SPD

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

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

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

SEC ID 49: Sp-TRAIL-ASPD_F335A

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40328
ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RINGELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGO VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDCVEIATN GKWDRACGE KRLVVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

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

SEC ID 50: Sp-TRAIL-ASPD_F335D

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40372
ORIGEN

```

1      METDTLLLWV LLLWVPAGNG QRVAAHITGT RGRSNTLSSP NSKNEKALGR
KINSWESSRS
61     GHSFLSNLHL RINGELVIHEK GFYYIYSQTY FRFQEEIKEN TKNDKQMVQY
IYKYTSYPDP
121    ILLMKSARNS CWSKDAEYGL YSIYQGGIFE LKENDRIFVS VTNEHLIDMD
HEASFFGAFL
181    VGSSGSSGSS GSGLPDVASL RQQVEALQGO VQHLQAAFSQ YKKVELFPNG
QSVGEKIFKT
241    AGFVKPFTEA QLLCTQAGGQ LASPRSAEN AALQQLVVAK NEAAFLSMTD
SKTEGKFTYP
301    TGESLVYSNW APGEPNDGG SEDCVEIDTN GKWDRACGE KRLVVCEFGG
SPSSSSSSAW
361    SHPQFEK

```

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

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

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

De la cromatografía por exclusión de tamaño se resolvieron alícuotas de TRAIL-ASPD_F335D purificada por

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

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

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

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

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

Para analizar la unión de las proteínas de fusión de TRAIL a carbohidratos, se inmovilizó manano de levadura en microplacas y se detectó la unión de TRAIL-SPD, TRAIL-SPO_F335A o TRAIL-SPD_F335D por ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 30. Como se esperaba, la señal ELISA aumentó con concentraciones crecientes de TRAIL-ASPD. En contraste, la forma mutante de carbohidrato TRAIL-ASPD_F335A mostró una señal ELISA muy baja. Además, la nueva variante construida TRAIL-ASPD_F335D presentó la señal ELISA más baja (véase el recuadro y la flecha). Esto indicó que el mutante F335D tiene una afinidad de unión a manano inferior en comparación con la forma mutante de SP-D descrita previamente F335A.

2.7 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD

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

2.8 Citotoxicidad de proteína de fusión TRAIL-ASPD

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

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

Como resultado, todas las proteínas de fusión TRAIL-SPD analizadas no indujeron efectos hepatotóxicos, incluso si

los ligandos se entrecruzaban de forma secundaria por anticuerpos. En contraste, CD95L-T4 es hepatotóxica como se indica por un aumento de la caspasa activa (A a D). Cinco horas de co-incubación de hepatocitos humanos primarios con TRAIL-ASPD_F335D trimérica junto con fármacos quimioterapéuticos no indujeron actividad caspasa (E). Sin embargo, después de 24 h de co-incubación con doxorubicina, TRAIL-ASPD_F335D soluble indujo una fuerte señal de actividad caspasa (F).

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

2.9 Caracterización de proteínas de fusión de APRIL

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

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

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

SEC ID 51: Sp-APRIL-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 344, PM=37120

ORIGEN

```

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

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (subrayado)

21 - 158: APRIL-RBD

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

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

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

326 - 336: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

337 - 344: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

Referencias

1. Locksley RM, Killeen N y Lenardo MJ (2001) Cell 104: 487-501

2. Bodmer JL, Schneider P y Tschoopp J (2002) Trends Biochem. Sci. 27: 19-26

3. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M., Claus M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K y Scheurich P (1995) Cell 83: 793-802

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

La presente descripción se caracteriza adicionalmente por los siguientes puntos:

1. Una proteína de fusión que comprende

- (i) una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma, y
- (ii) un dominio de trimerización de colectina.

2. Proteína de fusión del punto 1, que comprende adicionalmente un elemento enlazador flexible entre (i) y (ii).

3. Proteína de fusión del punto 2, en la que el elemento enlazador flexible tiene una longitud de 3-20 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 6, 9, 10, 12, 15 o 18 aminoácidos.

4. Proteína de fusión de los puntos 2 o 3, en la que el elemento enlazador flexible es un enlazador de glicina/serina.

5. Proteína de fusión del punto 4, en la que el elemento enlazador flexible tiene la secuencia de aminoácidos (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c en la que a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

6. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 2-5, en la que el elemento enlazador flexible tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

7. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-6, en la que (i) se selecciona entre LTA (SEQ ID NO: 1), TNF α (SEQ ID NO: 2), LTB (SEQ ID NO: 3), OX40L (SEQ ID NO: 4), CD40L (SEQ ID NO: 5), CD95L (SEQ ID NO: 6), CD27L (SEQ ID NO: 7), CD30L (SEQ ID NO: 8), CD137L (SEQ ID NO: 9), TRAIL (SEQ ID NO: 10), RANKL (SEQ ID NO: 11), TWEAK (SEQ ID NO: 12), APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), BAFF (SEQ ID NO: 15), LIGHT (SEQ ID NO: 16), TL1A (SEQ ID NO: 17), GITRL (SEQ ID NO: 18), EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), EDA-A2 (SEQ ID NO: 20), o un dominio de unión a receptor de las mismas.

8. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) comprende los aminoácidos 59-205 o 60-205 de LTA (SEQ ID NO: 1), 86-233 de TNF α (SEQ ID NO: 2), 82-244 o 86-244 de LTB (SEQ ID NO: 3), 52-183 o 55-183 de OX40L (SEQ ID NO: 4), 112-261 o 117-261 de CD40L (SEQ ID NO: 5), 51-193 o 56-193 de CD27L (SEQ ID NO: 7), 97-234, 98-234 o 102-234 de CD30L (SEQ ID NO: 8), 86-254 de CD137L (SEQ ID NO: 9), 161-317 de RANKL (SEQ ID NO: 11), 103-249, 104-249 o 105-249 de TWEAK (SEQ ID NO: 12), 111-247 o 112-247 de APRIL 1 (SEQ ID NO: 13), 111-247 o 112-250 de APRIL 2 (SEQ ID NO: 14), 140-285 de BAFF (SEQ ID NO: 15), 91-240 de LIGHT (SEQ ID NO: 16), 91-251 o 93-251 de TL1A (SEQ ID NO: 17), 52-177 de GITRL (SEQ ID NO: 18), 245-391 de EDA-A1 (SEQ ID NO: 19), 245-389 de EDA-A2 (SEQ ID NO: 20).

9. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) es CD95L o un dominio de unión a receptor de la misma, en la que (i) preferiblemente comprende los aminoácidos 142-281 o 144-281 de CD95L humano (SEQ ID NO: 6).

10. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) es TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo, en la que (i) preferiblemente comprende los aminoácidos 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10).

11. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7 o 10, en la que (i) comprende un mutante de TRAIL o de un dominio de unión a receptor del mismo, que se une a y/o activa TRAILR1 y/o TRAILR2.

12. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-11, en la que (i) comprende al menos una sustitución de aminoácido.

13. Proteína de fusión del punto 11 o 12, en la que la sustitución de aminoácido afecta a al menos una de las

siguientes posiciones de aminoácido de TRAIL humano (SEQ ID NO: 10): R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269, y en la que la sustitución de aminoácido es preferiblemente al menos una de las siguientes: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R, o D269K.

- 5 14. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-13, en la que (ii) es la proteína tensioactiva D, la proteína tensioactiva A, la proteína de unión a manano A, la proteína de unión a manano C, colectina del hígado 1, colectina de placenta 1, o colectina-11.
- 10 15. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14, en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21.
- 15 16. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14, en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21.
- 20 17. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-15, en la que (ii) comprende al menos una sustitución de aminoácido.
- 25 18. Proteína de fusión del punto 17, en la que la sustitución de aminoácido afecta a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, y en la que la sustitución de aminoácido es preferiblemente una de las siguientes: F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K, o F355R.
- 30 19. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-18, en la que (ii) comprende un mutante que no se une a manosa.
- 35 20. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14 o 19, en la que (ii) comprende los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22.
- 40 21. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14 o 19, en la que (ii) comprende los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEQ ID NO: 22.
- 45 22. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-21, en la que (ii) está localizado de forma C-terminal de (i).
- 50 23. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-21, en la que (ii) está localizado de forma N-terminal de (i).
- 55 24. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-23, que comprende adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, que puede comprender un sitio de escisión por proteasa, en la que el dominio de péptido señal N-terminal preferiblemente comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25.
- 60 25. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-24, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40-41 o SEQ ID NO: 43-51.
- 65 26. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-25, en la que la proteína de fusión comprende adicionalmente un dominio de reconocimiento/purificación, que está localizado preferiblemente en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal.
27. Proteína de fusión del punto 26, en la que el dominio de reconocimiento/purificación es una marca Estrep o un dominio poli-His.
28. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-27, que comprende adicionalmente un elemento flexible terminal que puede incluir y/o conectar con el dominio de reconocimiento/purificación.
29. Proteína de fusión de cualquiera de los puntos 1-28, que está presente como un complejo trimérico o como un oligómero del complejo trimérico.
30. Proteína de fusión del punto 29, en la que el complejo se forma por enlace covalente entre tres proteínas de fusión, y en la que el enlace covalente preferiblemente consiste en puentes disulfuro entre cisteínas de (ii).
31. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 29-30, en la que el complejo consiste en tres proteínas de fusión idénticas.
32. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-28.

33. Molécula de ácido nucleico del punto 32, que está unida de forma funcional a una secuencia de control de la expresión.
- 5 34. Molécula de ácido nucleico de los puntos 32 o 33, que está localizada en un vector.
35. Una célula transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de los puntos 32-34.
- 10 36. La célula del punto 35, que es una célula procariota.
37. La célula del punto 35, que es una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero y más preferiblemente una célula humana.
- 15 38. Un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico de uno cualquiera de los puntos 32-34.
39. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-31, una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 32-34, o una célula de uno cualquiera de los puntos 35-37.
- 20 40. Una composición de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-31, una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 32-34, o una célula de uno cualquiera de los puntos 35-37.
- 25 41. Una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-31, una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 32-34, o una célula de uno cualquiera de los puntos 35-37 para su uso en terapia.
- 30 42. Uso de una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-31, una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 32-34, o una célula de uno cualquiera de los puntos 35-37 para la preparación de una composición farmacéutica en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos proliferativos, particularmente trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de citoquinas de TNF, tales como tumores, por ejemplo tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, por ejemplo enfermedades reumatoides y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazo de trasplantes.
- 35 43. El uso del punto 42 en combinación con un agente sensibilizante y/o inductor de apoptosis.
- 40 44. Un polipéptido que comprende un dominio de trimerización de colectina de la proteína tensioactiva D humana, que comprende una sustitución de aminoácido seleccionada entre F355S, F355T, F355E, F355D, F355K o F355R, y opcionalmente un dominio polipeptídico heterólogo.

Lista de secuencias

<110> Apogenix GmbH

5 <120> Proteínas de fusión de colectina de la superfamilia de TNF

<130> 40623PEP-WO-2

10 <150> PCT/EP2008/005644

<151> 10-07-2008

<150>

<151> 10-07-2008

15 <160> 62

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<223> LTA humana

<400> 1

ES 2 657 801 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> >233

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> TNFa humano

<400> 2

ES 2 657 801 T3

```

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1          5          10          15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
          20          25          30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
          35          40          45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
          50          55          60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65          70          75          80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
          85          90          95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
          100          105          110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
          115          120          125

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

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145          150          155          160

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

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
          180          185          190

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

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
          210          215          220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225          230

```

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> LTA humana

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> LTB humana

10

<400> 3

```

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

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

Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro
      35           40           45

Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln
      50           55           60

Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu
65           70           75           80

Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro
      85           90           95

Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe
    
```

ES 2 657 801 T3

100	105	110
Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro		
115	120	125
Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg		
130	135	140
Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg		
145	150	155
Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu		
165	170	175
Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala		
180	185	190
Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly		
195	200	205
Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser		
210	215	220
His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala		
225	230	235
240		
Val Met Val Gly		

<210> 4

<211> 183

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> OX40L humano

<400> 4

ES 2 657 801 T3

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

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CD40L humano

<400> 5

ES 2 657 801 T3

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

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

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

ES 2 657 801 T3

```

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
      85                      90                      95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
      100                    105                    110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
      115                    120                    125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
      130                    135                    140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
      145                    150                    155                    160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
      165                    170                    175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
      180                    185                    190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
      195                    200                    205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
      210                    215                    220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
      225                    230                    235                    240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
      245                    250                    255

Gly Leu Leu Lys Leu
      260

```

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CD95L humano

<400> 6

```

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
1      5      10      15

```

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

275

280

<210> 7

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> CD27L humano

<400> 7

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15

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

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro

ES 2 657 801 T3

<210> 8

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> CD30L humano

<400> 8

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
20 25 30

Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
35 40 45

Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg
50 55 60

Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys Gly Gly
65 70 75 80

Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
85 90 95

Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
225 230

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

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CD137L humano

10 <400> 9

```

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
 1              5              10              15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
      20              25              30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
      35              40              45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
      50              55              60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
      65              70              75              80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
      85              90              95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
      100              105              110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
      115              120              125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
      130              135              140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
      145              150              155              160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
      165              170              175
    
```

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 10

<211> 281

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> TRAIL humano

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu

ES 2 657 801 T3

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 11

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> RANKL humano

<400> 11

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

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

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

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

ES 2 657 801 T3

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

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

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> TWEAK humana

10 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
 180 185 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg
 195 200 205

ES 2 657 801 T3

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu
210 215 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> APRIL_ver1 humano

<400> 13

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
35 40 45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
50 55 60

Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
65 70 75 80

Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
85 90 95

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
100 105 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
115 120 125

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
130 135 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
145 150 155 160

Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe

ES 2 657 801 T3

165

170

175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
180 185 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
195 200 205

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

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
225 230 235 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Leu
245

<210> 14

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> APRIL_ver2 humano

<400> 14

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
35 40 45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
50 55 60

Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
65 70 75 80

Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
85 90 95

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
100 105 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
115 120 125

ES 2 657 801 T3

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
130 135 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
145 150 155 160

Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
165 170 175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
180 185 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
195 200 205

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

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
225 230 235 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
245 250

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

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> BAFF humana

<400> 15

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
20 25 30

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

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

15

ES 2 657 801 T3

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> LIGHT humana

<400> 16

ES 2 657 801 T3

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

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

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

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
50 55 60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
85 90 95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
100 105 110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
115 120 125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
130 135 140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
165 170 175

Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
180 185 190

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
195 200 205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
210 215 220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225 230 235 240

<210> 17

<211>251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TL1A humana

5

<400> 17

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

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45

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

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
245 250

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

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> GITRL humano

10 <400> 18

Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile
 20 25 30

Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe
 35 40 45

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

Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn
 65 70 75 80

Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
 85 90 95

Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
 100 105 110

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

Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
 130 135 140

Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
 145 150 155 160

Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
 165 170 175

Ser

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

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> EDA-A1 humana

<400> 19

```

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala
 1           5           10           15

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

Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly
      35           40           45

Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu
      50           55           60

Arg Ser Glu Leu Arg Arg Glu Arg Gly Ala Glu Ser Arg Leu Gly Gly
      65           70           75           80

Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu
      85           90           95

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

Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln
      115          120          125

Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys
      130          135          140

Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser
      145          150          155          160

Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly
      165          170          175

Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
      180          185          190

Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile
      195          200          205

```

ES 2 657 801 T3

Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
210 215 220

Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys
225 230 235 240

Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln
245 250 255

Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn
260 265 270

Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro
275 280 285

Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr
290 295 300

Ser Gln Val Glu Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Val Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile
325 330 335

Glu Thr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys
340 345 350

Leu Leu Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp
355 360 365

Ile Ser Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg
370 375 380

Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser
385 390

<210> 20
<211> 389
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<223> EDA-A2 humana

<400> 20
Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala
1 5 10 15

Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

Arg Ser Gly Glu Leu Glu Val Leu Val Asp Gly Thr Tyr Phe Ile Tyr
290 295 300

Ser Gln Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr Glu Val
305 310 315 320

Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile Glu Thr
325 330 335

Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys Leu Leu
340 345 350

Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp Ile Ser
355 360 365

Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg Leu Gly
370 375 380

Glu Ala Pro Ala Ser
385

<210>21

<211> 375

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu
1 5 10 15

Gly Tyr Leu Glu Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Thr Pro
20 25 30

Ser Ala Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Ser Val Glu Ser Gly Leu Pro
35 40 45

Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys Gly
50 55 60

Asp Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ala Gly Met Pro Gly Gln
65 70 75 80

Ala Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Asp Asn Gly Ser Val Gly Glu Pro
85 90 95

Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
100 105 110

10

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

<210> 22
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22

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

Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly His Pro Gln Pro Ala Gly Asp Asp Ala
 20 25 30

Cys Ser Val Gln Ile Leu Val Pro Gly Leu Lys Gly Asp Ala Gly Glu
 35 40 45

Lys Gly Asp Lys Gly Ala Pro Gly Arg Pro Gly Arg Val Gly Pro Thr
 50 55 60

Gly Glu Lys Gly Asp Met Gly Asp Lys Gly Gln Lys Gly Ser Val Gly
 65 70 75 80

Arg His Gly Lys Ile Gly Pro Ile Gly Ser Lys Gly Glu Lys Gly Asp
 85 90 95

Ser Gly Asp Ile Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Glu Pro Gly Leu Pro
 100 105 110

Cys Glu Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln
 115 120 125

Val Ser Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala
 130 135 140

Gly Val Arg Glu Thr Glu Ser Lys Ile Tyr Leu Leu Val Lys Glu Glu
 145 150 155 160

Lys Arg Tyr Ala Asp Ala Gln Leu Ser Cys Gln Gly Arg Gly Gly Thr
 165 170 175

Leu Ser Met Pro Lys Asp Glu Ala Ala Asn Gly Leu Met Ala Ala Tyr
 180 185 190

Leu Ala Gln Ala Gly Leu Ala Arg Val Phe Ile Gly Ile Asn Asp Leu
 195 200 205

Glu Lys Glu Gly Ala Phe Val Tyr Ser Asp His Ser Pro Met Arg Thr
 210 215 220

ES 2 657 801 T3

Phe Asn Lys Trp Arg Ser Gly Glu Pro Asn Asn Ala Tyr Asp Glu Glu
225 230 235 240

Asp Cys Val Glu Met Val Ala Ser Gly Gly Trp Asn Asp Val Ala Cys
245 250 255

His Thr Thr Met Tyr Phe Met Cys Glu Phe Asp Lys Glu Asn Met
260 265 270

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 23

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 24

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

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido señal

<400> 25

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

Ala Gly Asn Gly
20

<210> 26
<211> 339
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-SPD-construcción-1

5

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Phe Leu Val Gly Ser Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg
180 185 190

Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala
195 200 205

Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val

ES 2 657 801 T3

210

215

220

Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val Lys Pro Phe Thr Glu
225 230 235 240

Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln Leu Ala Ser Pro Arg
245 250 255

Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu Val Val Ala Lys Asn
260 265 270

Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe
275 280 285

Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly
290 295 300

Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys Val Glu Ile Phe Thr
305 310 315 320

Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val
325 330 335

Cys Glu Phe

<210> 27

<211> 343

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-SPD-construcción-2

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Ser Gly Leu Pro Asp Val
180 185 190

Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln His
195 200 205

Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro Asn
210 215 220

Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val Lys
225 230 235 240

Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln Leu
245 250 255

Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu Val
260 265 270

Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys Thr
275 280 285

Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser Asn
290 295 300

Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys Val
305 310 315 320

Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu Lys
325 330 335

Arg Leu Val Val Cys Glu Phe

<210> 28
 <211> 225
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> proteína de fusión

 10 <400> 28
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Ser Gly Leu Pro Asp Val
 180 185 190

 Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln His
 195 200 205

 Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro Asn
 210 215 220

 Gly
 225

<210> 29
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-col11-construcción-1

<400> 29

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Phe Leu Val Gly Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met
      180          185          190
    
```

10

ES 2 657 801 T3

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

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

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

Gly Gly Thr Leu Ser Met Pro Lys Asp Glu Ala Ala Asn Gly Leu Met
245 250 255

Ala Ala Tyr Leu Ala Gln Ala Gly Leu Ala Arg Val Phe Ile Gly Ile
260 265 270

Asn Asp Leu Glu Lys Glu Gly Ala Phe Val Tyr Ser Asp His Ser Pro
275 280 285

Met Arg Thr Phe Asn Lys Trp Arg Ser Gly Glu Pro Asn Asn Ala Tyr
290 295 300

Asp Glu Glu Asp Cys Val Glu Met Val Ala Ser Gly Gly Trp Asn Asp
305 310 315 320

Val Ala Cys His Thr Thr Met Tyr Phe Met Cys Glu Phe Asp Lys Glu
325 330 335

Asn Met

<210> 30

<211> 342

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-col11-construcción-2

<400> 30

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

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

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

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

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

Gly Trp Asn Asp Val Ala Cys His Thr Thr Met Tyr Phe Met Cys Glu
 325 330 335

Phe Asp Lys Glu Asn Met
 340

<210> 31

<211> 222

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-col11-construcción-3

10

<400> 31

ES 2 657 801 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Ser Gln Leu Arg Lys Ala
180 185 190

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

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

<210> 32

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión INDICADOR-hCol11-hTRAIL_Glu116_Gly281

10

ES 2 657 801 T3

<400> 32

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Leu Pro Cys Glu
20 25 30

Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser
35 40 45

Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val
50 55 60

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

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

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

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

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

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
145 150 155 160

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
165 170 175

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

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

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

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
225 230 235

5 <210> 33

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> proteína de fusión INDICADOR-hCol11s-hTRAIL_Glu116_Gly281

<400> 33

```

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1           5           10           15

Val Gln Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Leu Pro Cys Glu
          20           25           30

Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser
          35           40           45

Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val
 50           55           60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
          225          230

```

<210> 34
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión hCol11s-hTRAIL_Glu116_Gly281

<400> 34

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gly Leu Pro Cys Glu Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile
 20 25 30

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

Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val Arg Glu Thr Glu Arg Gly Pro Gln
 50 55 60

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

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

Gly
225

<210> 35
<211>247
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> proteína de fusión INDICADOR-hCol11-GSS-hTRAIL_Glu116_Gly281

<400> 35

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Leu Pro Cys Glu
20 25 30

Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser
35 40 45

Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val
50 55 60

Arg Glu Thr Glu Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser
65 70 75 80

Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
85 90 95

Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
100 105 110

Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
115 120 125

ES 2 657 801 T3

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

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

Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
165 170 175

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

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

Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
225 230 235 240

Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
245

<210> 36

<211> 237

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp1-hTRAIL-Glu116_Gly281-GSS-col11

<400> 36

ES 2 657 801 T3

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

<210> 37

<211> 238

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> proteína de fusión Sp3-hTRAIL_Glu116_Gly281-GSS-col11

<400> 37

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

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

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

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

ES 2 657 801 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Gly Ser Gly Leu Pro Cys Glu Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala
195 200 205

Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys
210 215 220

Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val Arg Glu Thr Glu Ser
225 230 235

<210> 38

<211> 1045

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante correspondiente a la SEQ ID NO: 26 SP-hsTrailsin-SPD-construcción-1

<400> 38

ES 2 657 801 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gaccgataca ctgctcttgt ggggtgctctt gctgtggggtt      60
cctgcaggta atgggtcaaag agtcgcagct cacatcactg ggactagagg caggagtaac      120
accctgagtt ctcccaattc caagaacgag aaagccctgg gtaggaagat caactcctgg      180
gaaagctcca gaagcggcca tagcttttctt agcaacctcc acttgaggaa tggcgaactt      240
gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tacagccaga cgtacttcag gttccaggag      300
gaaatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatgggtgc aatacatcta caagtacacg      360

tcataccctg atcctatact gctgatgaag tccgccagaa acagttgctg gagcaaagac      420
gctgaatacg gcctgtattc catctatcag ggcggtatct ttgaactcaa ggagaacgac      480
aggatcttog tgtctgtgac aaacgagcat ctgatcgaca tggaccatga agcgtctttc      540
ttcgggtgct tcttgggtggg atccgggtttg ccagatggtg cttctttgag acaacagggtt      600
gaggctttgc aggggtcaagt ccagcacttg caggctgctt tctctcaata caagaagggtt      660
gagttgttcc caaatggtca atctgttggc gaaaagattt tcaagactgc tggtttcgtc      720
aaaccattca cggaggcaca attatttgtt actcaggctg gtggacagtt ggcctctcca      780
cgttctgccc ctgagaacgc cgccttgcaa caattagtcg tagctaagaa cgaggctgct      840
ttcttgagca tgactgattc caagacagag ggcaagttca cctacccaac aggagaatcc      900
ttggtctatt ctaattgggc acctggagag cccaacgatg atggcggctc agaggactgt      960
gtggaaatct tcaccaatgg caagtggaat gacagagctt gtggagagaa gcgtttggtg     1020
gtctgtgagt tctaatagcg gccgc                                           1045

```

<210> 39
 <211> 1057
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia codificante correspondiente a la SEQ ID NO: 27 SP-hsTrailsin-SPD-construcción-2

<400> 39

ES 2 657 801 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gaccgatata ctgctcttgt gggtagctctt gctgtgggtt      60
ccgggatcta ccggtgaacg tggtcctcaa agagtcgcag ctcacatcac tgggactaga      120
ggcaggagta acaccctgag ttctcccaat tccaagaacg agaaagccct gggtaggaag      180
atcaactcct gggaaagctc cagaagcggc catagctttc ttagcaacct ccacttgagg      240
aatggcgaac ttgtgatcca tgagaagggc ttctactaca tctacagcca gacgtacttc      300
aggttccagg aggaaatcaa ggagaacacc aagaacgaca agcagatggt gcaatacatc      360
tacaagtaca cgtcataccc tgatcctata ctgctgatga agtccgccag aaacagttgc      420
tggagcaaaag acgctgaata cggcctgtat tccatctatc agggcggtat ctttgaactc      480
aaggagaacg acaggatctt cgtgtctgtg acaaacgagc atctgatcga catggaccat      540
gaagcgtctt tcttcggtgc cttcttggtg ggatccggtt tgccagatgt tgcttctttg      600
agacaacagg ttgaggcttt gcagggtcaa gtccagcact tgcaggctgc tttctctcaa      660
tacaagaagg ttgagttggt cccaaatggt caatctgttg gcgaaaagat tttcaagact      720
gctggtttcg tcaaaccatt cacggaggca caattattgt gtactcaggc tggtaggacag      780
ttggcctctc caggttctgc cgtgagaac gccgccttgc aacaattagt cgtagctaag      840
aacgaggctg ctttcttgag catgactgat tccaagacag agggcaagtt cacctaccca      900

acaggagaat ccttggtcta ttctaattgg gcacctggag agcccaacga tgatggcggc      960
tcagaggact gtgtggaaat cttcaccaat ggcaagtggg atgacagagc ttgtggagag     1020
aagcgtttgg tggctctgtg gttctaatag cggccgc                                1057

```

<210> 40
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> proteína de fusión CD95L-ASPD
 <400> 40

ES 2 657 801 T3

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

Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro Asn
195 200 205

Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val Lys
210 215 220

Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln Leu
225 230 235 240

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

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

Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser Asn
275 280 285

Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys Val
290 295 300

Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu Lys
305 310 315 320

Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser
325 330 335

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
340 345

<210> 41

<211> 356

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-LIGHT-ASPD

<400> 41

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

Gly Ser Thr Gly Glu Val Asn Pro Ala Ala His Leu Thr Gly Ala Asn
20 25 30

Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu Leu Trp Glu Thr Gln Leu
35 40 45

Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr His Asp Gly Ala Leu Val
50 55 60

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu
325 330 335

Phe Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro
340 345 350

Gln Phe Glu Lys
355

<210> 42
<211> 1129
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> casete de expresión de Sp-TRAIL-ASPD

<400> 42

```
aagcttgccg ccaccatgga gaccgatata ctgctcttgt ggggtgctctt gctgtgggtt      60
cctgcaggta atgggtcaaag agtcgcagct cacatcactg ggactagagg caggagtaac      120
accctgagtt ctcccaattc caagaacgag aaagccctgg gtaggaagat caactcctgg      180
gaaagctcca gaagcggcca tagctttctt agcaacctcc acttgaggaa tggcgaactt      240
gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tacagccaga cgtacttcag gttccaggag      300
gaaatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatgggtgc aatacatcta caagtacacg      360
tcataccctg atcctatact gctgatgaag tccgccagaa acagttgctg gagcaaagac      420
gctgaatacg gcctgtattc catctatcag ggcgggtatct ttgaactcaa ggagaacgac      480
aggatcttcg tgtctgtgac aaacgagcat ctgatcgaca tggaccatga agcgtctttc      540
ttcgggtgctt tcttgggtggg atcctctggt tcgagtgggt cgagtgggtc tggattgcca      600
gacgttgctt ctttgagaca acaggttgag gctttgcagg gtcaagtcca gcacttgacg      660
gctgctttct ctcaatacaa gaaggttgag ttgttcccaa acggtcaatc tgttggcgaa      720
aagattttca agactgctgg tttcgtcaaa ccattcacgg aggcacaatt attgtgtact      780
caggctgggtg gacagttggc ctctccacgt tctgccgctg agaacgcgcg cttgcaacag      840
ttgggtcgtag ctaagaacga ggctgctttc ttgagcatga ctgattccaa gacagagggc      900
aagttcacct acccaacagg agaatccttg gtctattcta attgggcacc tggagagccc      960
aacgatgatg gcggctcaga ggactgtgtg gaaatcttca ccaatggcaa gtggaatgac     1020
agagcttggtg gagagaagcg tttgggtggtc tgtgagttcg gaggcagtc cttcatcttca     1080
tctagctctg cctgggtcgca tccacaattc gagaaataat agcgggcgcg                    1129
```

<210> 43
<211> 367
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD

<400> 43

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln
          195          200          205

Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val
          210          215          220

Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr
225          230          235          240

```

ES 2 657 801 T3

Ala Gly Phe Val Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln
245 250 255

Ala Gly Gly Gln Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala
260 265 270

Leu Gln Gln Leu Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met
275 280 285

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser
290 295 300

Leu Val Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly
305 310 315 320

Ser Glu Asp Cys Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg
325 330 335

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
355 360 365

<210> 44

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACCSPD

10

<400> 44

ES 2 657 801 T3

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

<210> 45
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACol11

<400> 45

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

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

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

10

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

Met Val Ala Ser Gly Gly Trp Asn Asp Val Ala Cys His Thr Thr Met
325 330 335

Tyr Phe Met Cys Glu Phe Asp Lys Glu Asn Met Gly Ser Pro Ser Ser
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
355 360 365

<210> 46

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACC11

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

165

170

175

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

Gly Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser
195 200 205

Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val
210 215 220

Arg Glu Thr Glu Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser
225 230 235 240

His Pro Gln Phe Glu Lys
245

<210> 47

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAILR1mut-ASPD

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 801 T3

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

<210> 48
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAILR2mut-ASPD

5 <400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln
 195 200 205

Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr
 225 230 235 240

ES 2 657 801 T3

Ala Gly Phe Val Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln
245 250 255

Ala Gly Gly Gln Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala
260 265 270

Leu Gln Gln Leu Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met
275 280 285

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser
290 295 300

Leu Val Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly
305 310 315 320

Ser Glu Asp Cys Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg
325 330 335

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
355 360 365

<210> 49

<211> 367

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD_F335A

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	100	105	110
Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	115	120	125
Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	130	135	140
Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	145	150	155
Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	165	170	175
Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	180	185	190
Gly	Leu	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Gln	Gln	Val	Glu	Ala	Leu	Gln	195	200	205
Gly	Gln	Val	Gln	His	Leu	Gln	Ala	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Lys	Lys	Val	210	215	220
Glu	Leu	Phe	Pro	Asn	Gly	Gln	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Phe	Lys	Thr	225	230	235
Ala	Gly	Phe	Val	Lys	Pro	Phe	Thr	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Cys	Thr	Gln	245	250	255
Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Glu	Asn	Ala	Ala	260	265	270
Leu	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Asn	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser	Met	275	280	285
Thr	Asp	Ser	Lys	Thr	Glu	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Pro	Thr	Gly	Glu	Ser	290	295	300
Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Trp	Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Asn	Asp	Asp	Gly	Gly	305	310	315
Ser	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Ile	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Trp	Asn	Asp	Arg	325	330	335
Ala	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Val	Val	Cys	Glu	Phe	Gly	Gly	Ser	Pro	340	345	350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 355 360 365

<210> 50

<211> 367

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD_F335D

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln
 195 200 205

Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val
210 215 220

Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr
225 230 235 240

Ala Gly Phe Val Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln
245 250 255

Ala Gly Gly Gln Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala
260 265 270

Leu Gln Gln Leu Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met
275 280 285

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser
290 295 300

Leu Val Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly
305 310 315 320

Ser Glu Asp Cys Val Glu Ile Asp Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg
325 330 335

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
355 360 365

<210> 51

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-APRIL-ASPD

<400> 51

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

Ala Gly Asn Gly Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn
20 25 30

Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro
35 40 45

Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg
50 55 60

ES 2 657 801 T3

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

ES 2 657 801 T3

Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala
325 330 335

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
340

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> INDICADOR-epítopo/sitio de procesamiento por enteroquinasa
<400> 52

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> elemento enlazador flexible

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1)..(3)
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (4)..(6)
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (7)..(9)
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<400> 53

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador A

<400> 54

Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> enlazador B
 5 <400> 55
 Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser
 1 5
 <210> 56
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> enlazador C
 15 <400> 56
 Gly Ser Ser Gly Ser
 1 5
 <210> 57
 <211> 2
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> enlazador D
 <400> 57
 Gly Ser
 1
 30 <210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> marca Estrep II
 <400> 58
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 1 5
 40 <210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> elemento enlazador flexible
 <400> 59
 Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala
 1 5
 50 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>

ES 2 657 801 T3

<223> elemento enlazador

<400> 60

Gly	Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala
1				5						10

5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> elemento enlazador

<400> 61

Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala
1				5					10

15

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> elemento enlazador

25

<400> 62

Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala
1				5				

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende

- 5 (i) una citoquina ligando de CD40 (CD40L) o un dominio de unión a receptor de la misma, y
(ii) un dominio de trimerización de colectina que comprende la proteína tensioactiva D o el dominio de cuello y de unión a carbohidrato de la proteína tensioactiva D,

10 en la que (i) comprende los aminoácidos 112-261 o 117-261 de la SEQ ID NO: 5 y en la que (ii) está localizado de forma C-terminal de (i).

15 2. Proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un elemento enlazador flexible entre (i) y (ii), en la que el elemento enlazador flexible preferiblemente tiene una longitud de 3-20 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de 3, 6, 9, 10, 12, 15 o 18 aminoácidos.

3. Proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en la que el elemento enlazador flexible es un enlazador de glicina/serina, en la que el elemento enlazador flexible preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c en la que a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20 4. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que (i) es CD40L (SEQ ID NO: 5), o un dominio de unión a receptor de la misma.

5. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4,

- 25 (a) en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257 o preferiblemente 225-257 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21, y/o
(b) en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375 o 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21.

30 6. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que (ii) comprende un mutante de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21 que tiene una única sustitución de aminoácido y que no se une a manosa.

35 7. Proteína de fusión de la reivindicación 6, en la que (ii) comprende los aminoácidos 225-375 de la proteína tensioactiva D humana de la SEQ ID NO: 21 y en la que la sustitución de aminoácido afecta a F355 de la SEQ ID NO: 21 y en la que la sustitución de aminoácido es preferiblemente una de las siguientes: F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K o F355R.

40 8. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Una célula transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

45 10. Un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

11. Un complejo trimérico que comprende tres proteínas de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

50 12. El complejo trimérico de la reivindicación 11, en el que el complejo se forma por enlace covalente entre las tres proteínas de fusión.

13. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, una célula de la reivindicación 9 o un complejo trimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12.

55 14. Una composición de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, una célula de la reivindicación 9 o un complejo trimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12.

60 15. Una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, una célula de la reivindicación 9 o un complejo trimérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para su uso en terapia, preferiblemente para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos proliferativos, particularmente trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de citoquinas de TNF, tales como tumores, por ejemplo, tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, enfermedades reumatoideas y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazo de trasplantes.

Figura 1
SEC de CD95L-ASPD purificada por afinidad

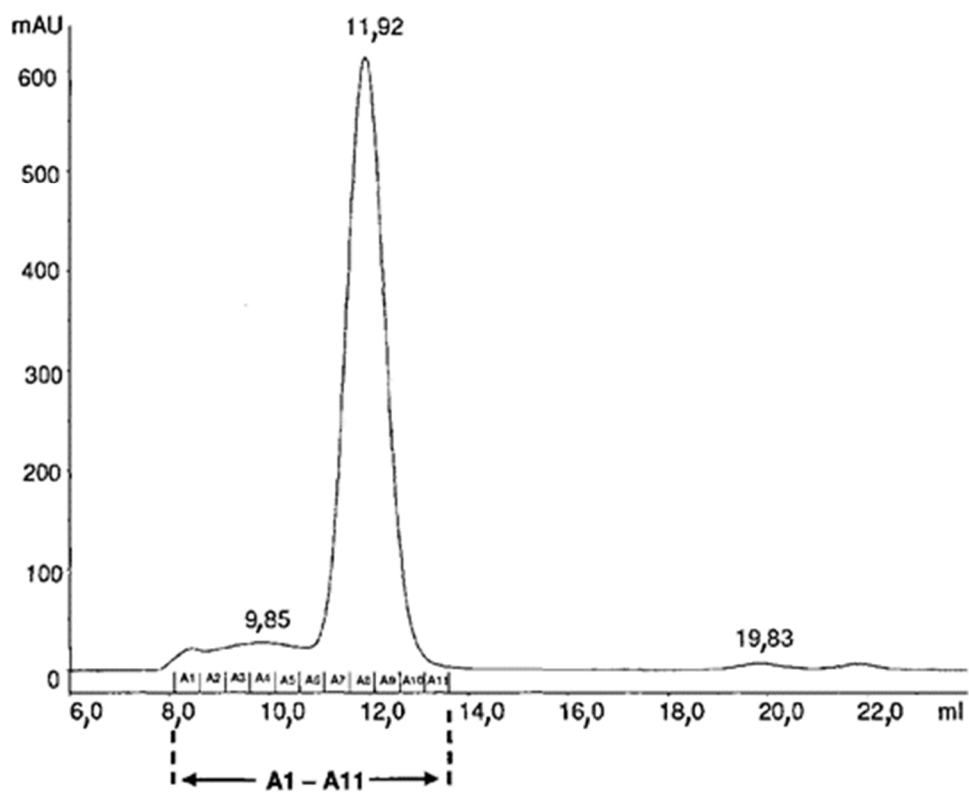


Figura 2

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

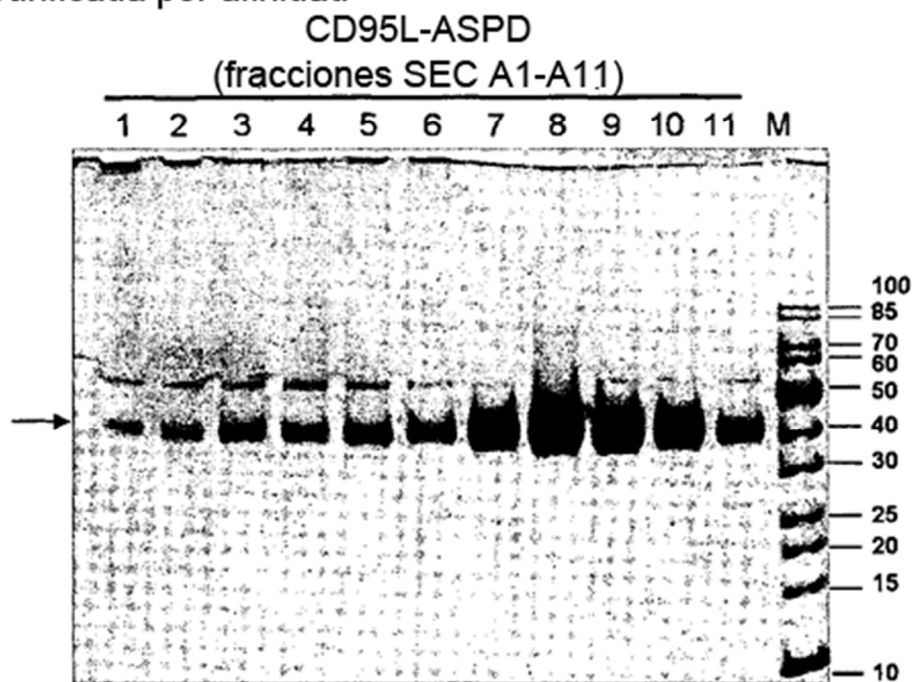


Figura 3

Actividad caspasa en células Jurkat inducida por secciones SEC A1-A15 de CD95L-ASPD purificada por afinidad

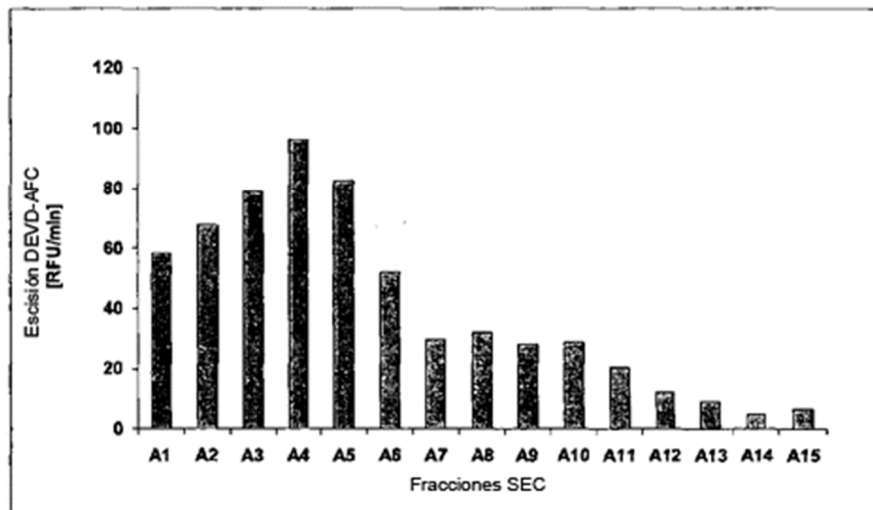


Figura 4

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

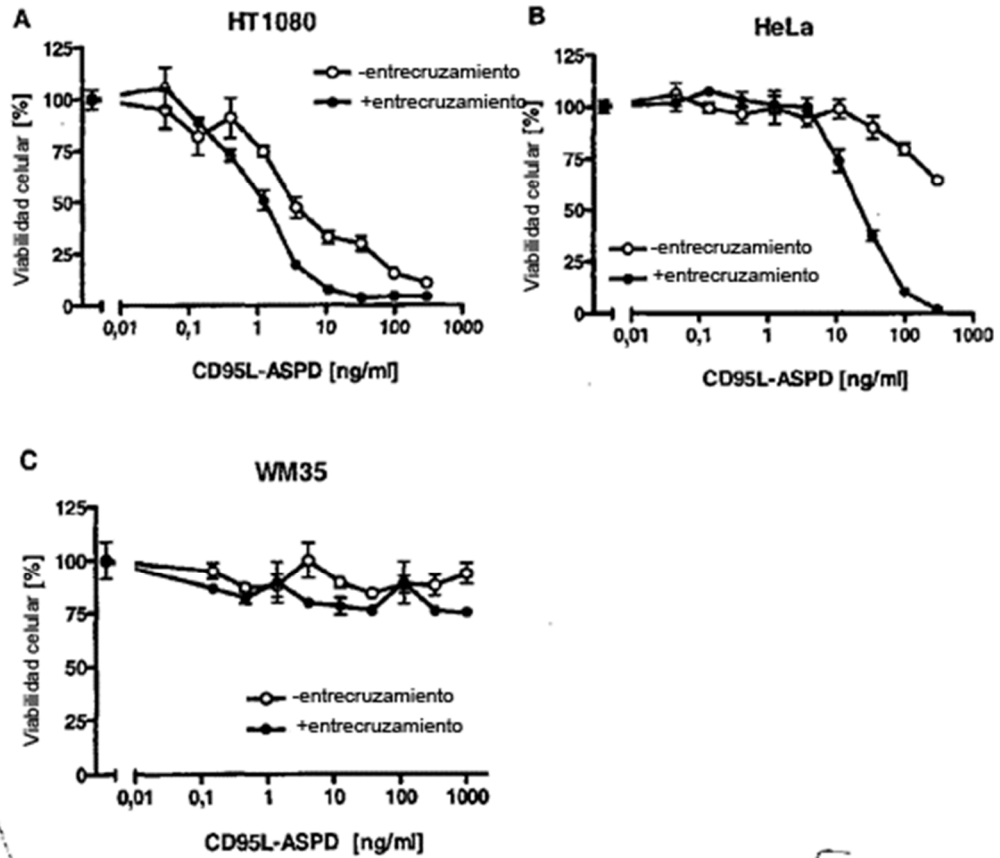


Figura 5

SEC de LIGHT-ASPD purificada por afinidad

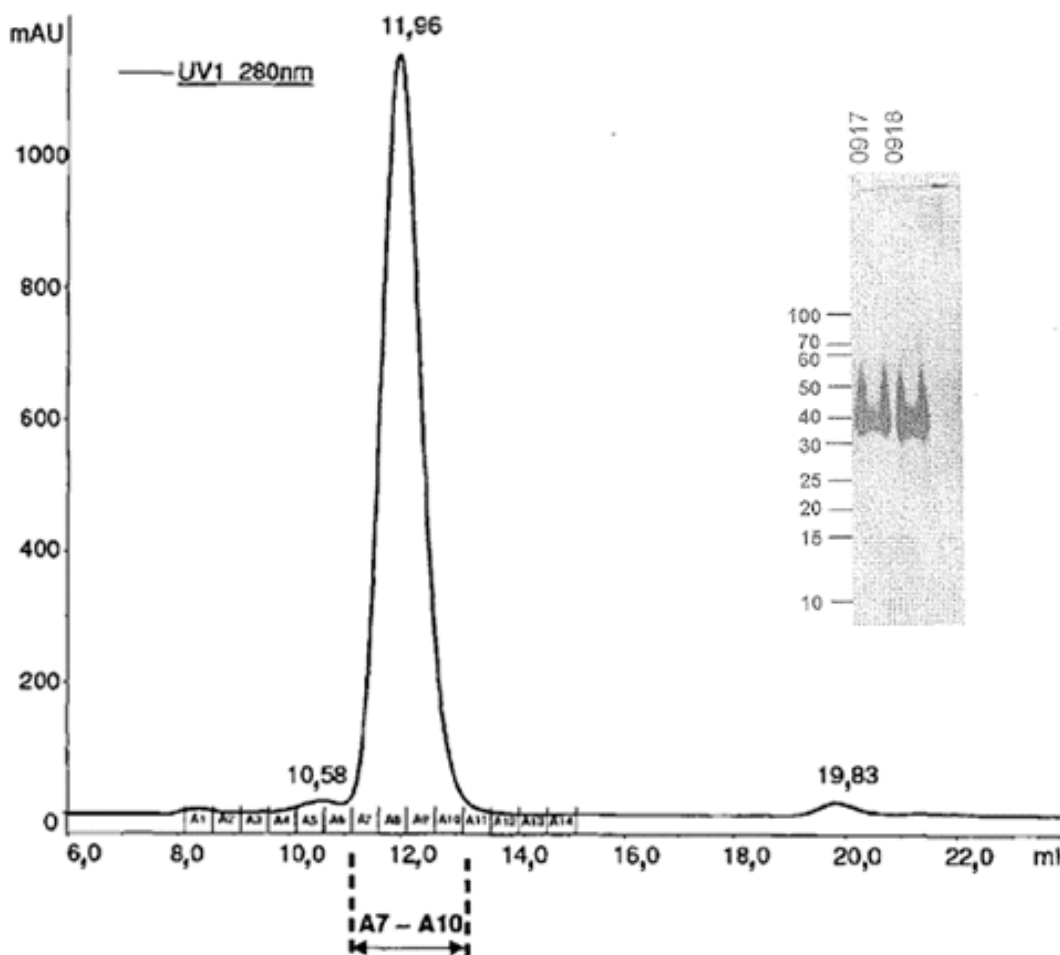


Figura 6

Unión de HVEM-Fc a LIGHT-ASPD inmovilizada

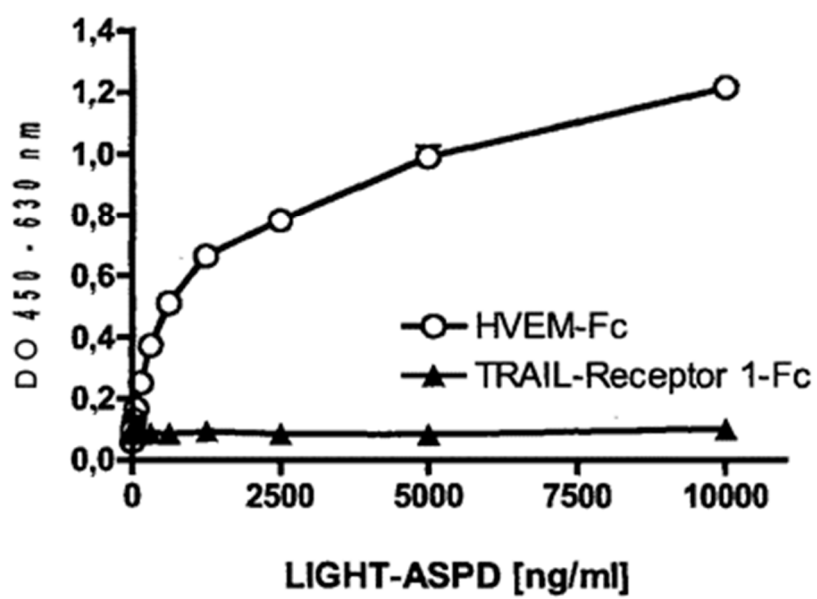


Figura 7

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

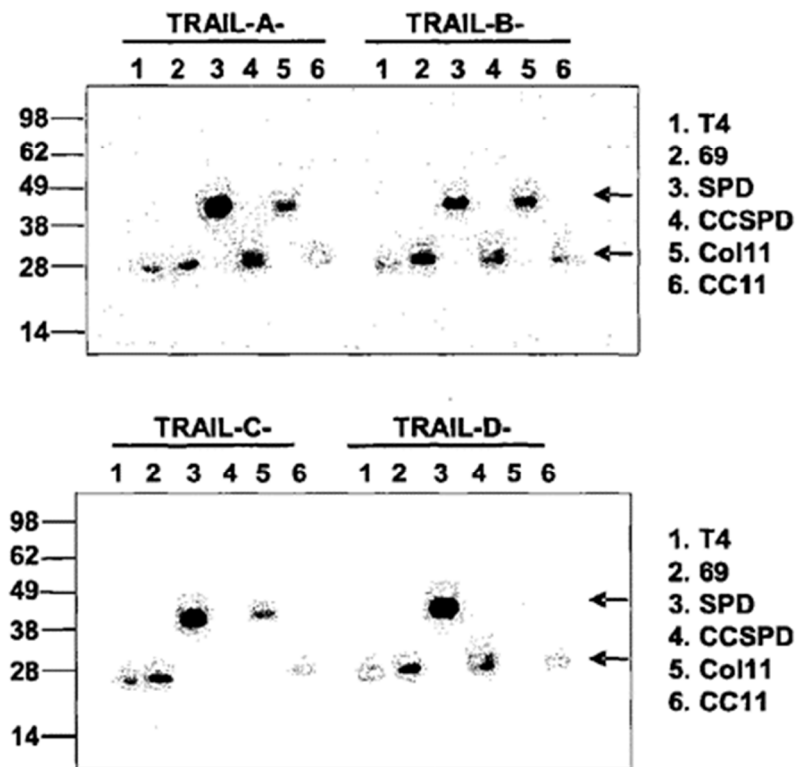


Figura 8

Actividad caspasa en células T Jurkat

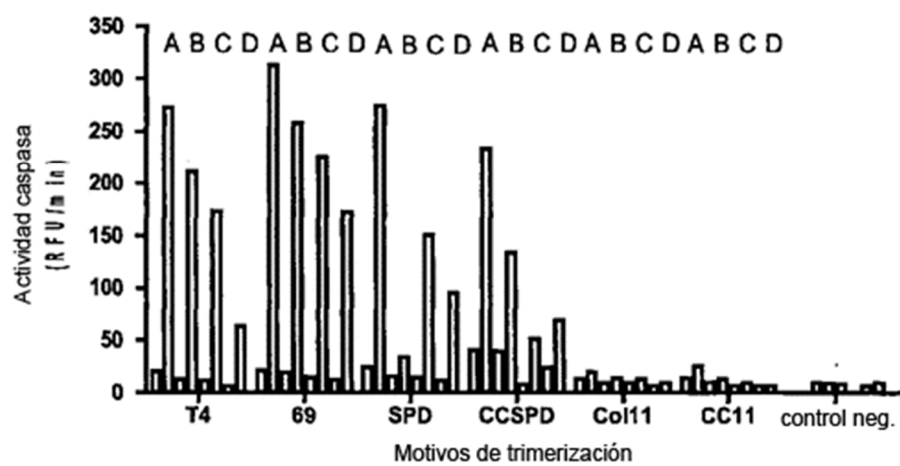


Figura 9

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAIL-ASPD

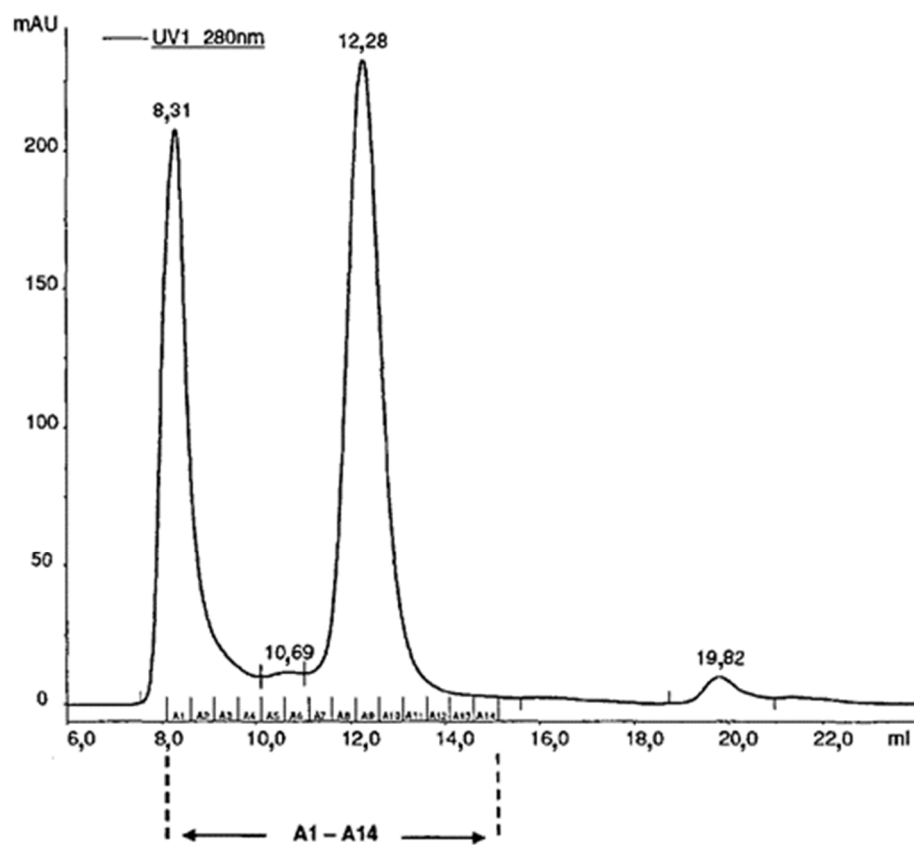


Figura 10

Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD contra células cancerosas humanas

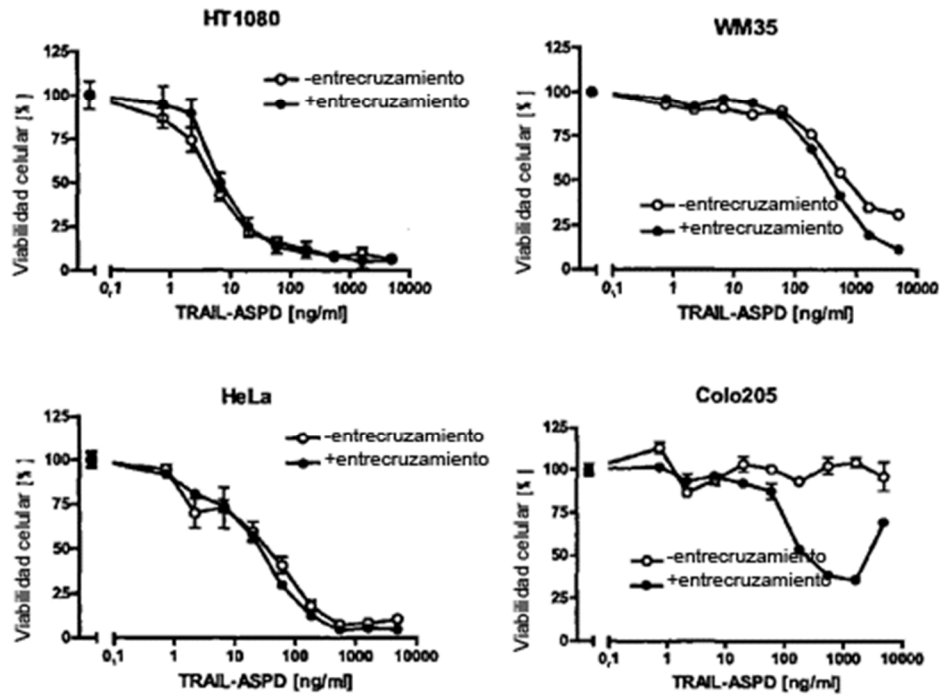
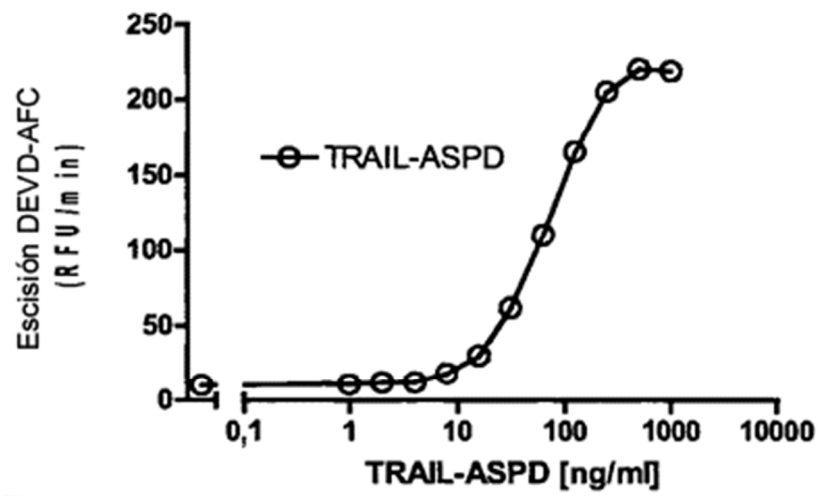


Figura 11

TRAIL-ASPD indujo actividad caspasa en Jurkat

A



B

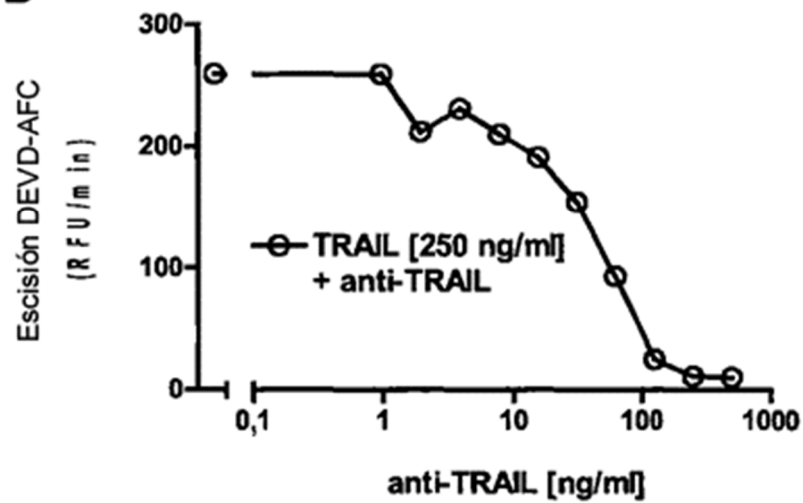


Figura 12

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

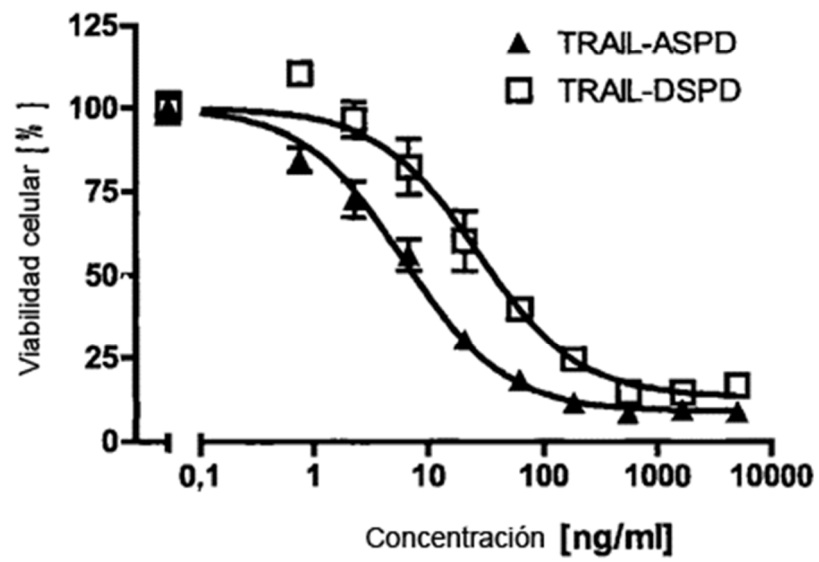


Figura 13

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

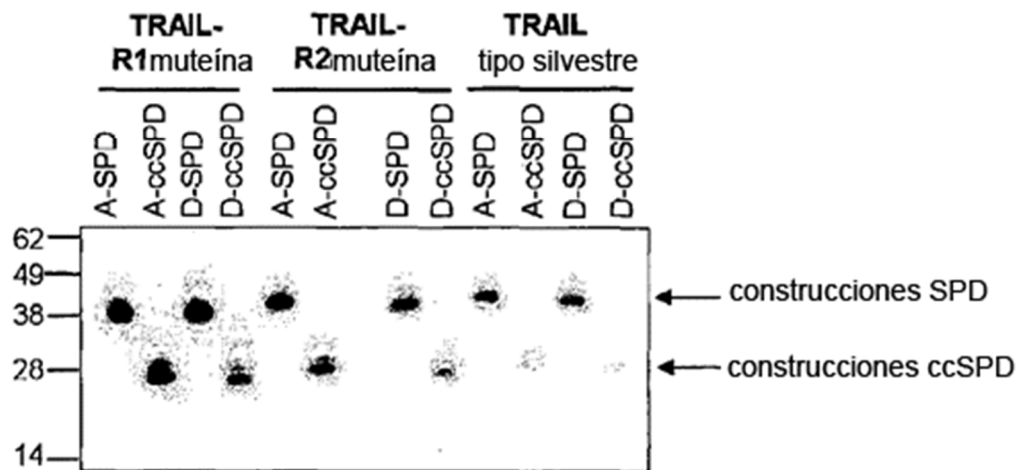


Figura 14

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

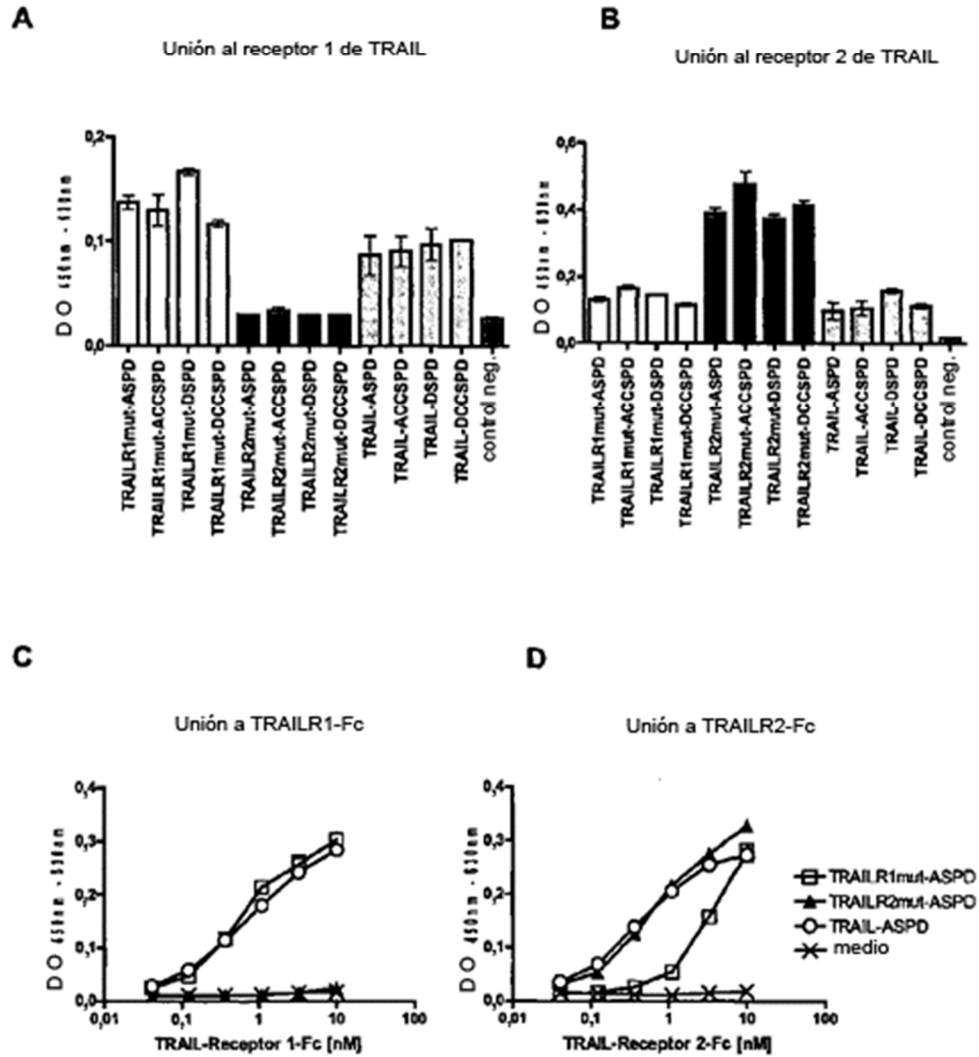


Figura 15

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

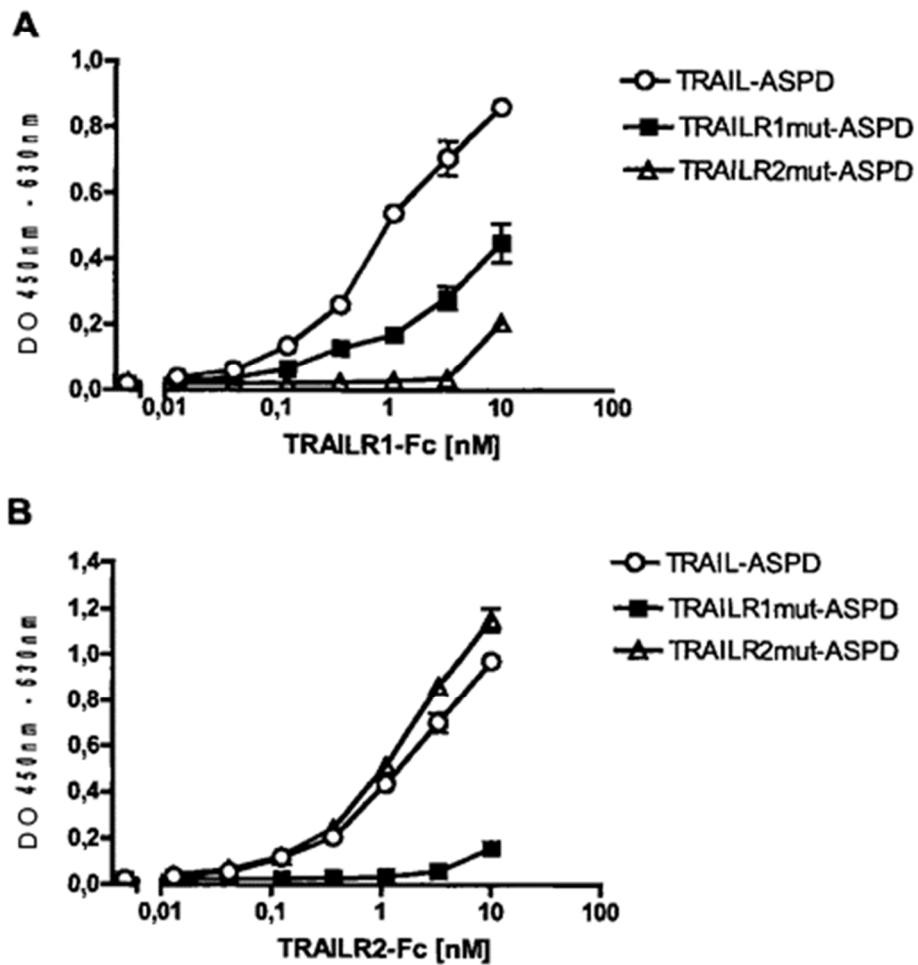


Figura 16

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1mut-ASPD
purificada por afinidad

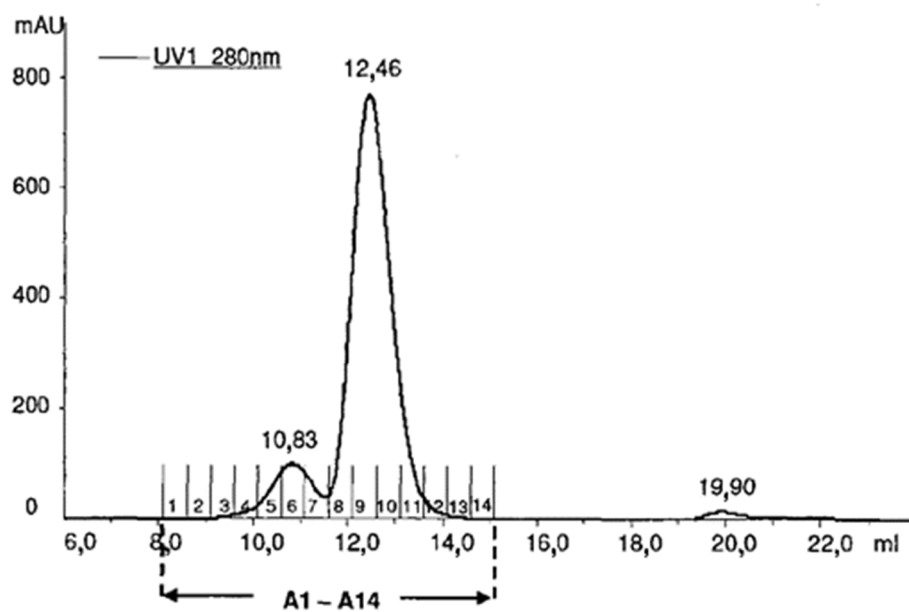


Figura 17

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

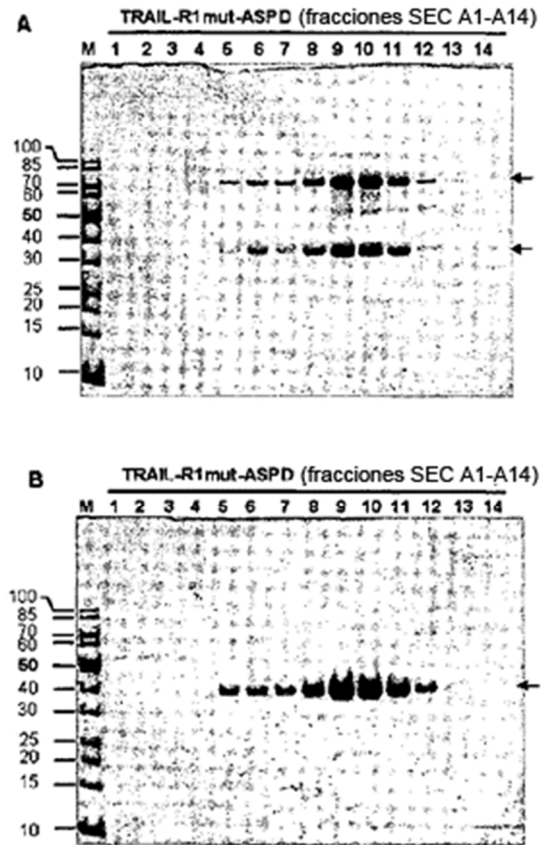


Figura 18

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

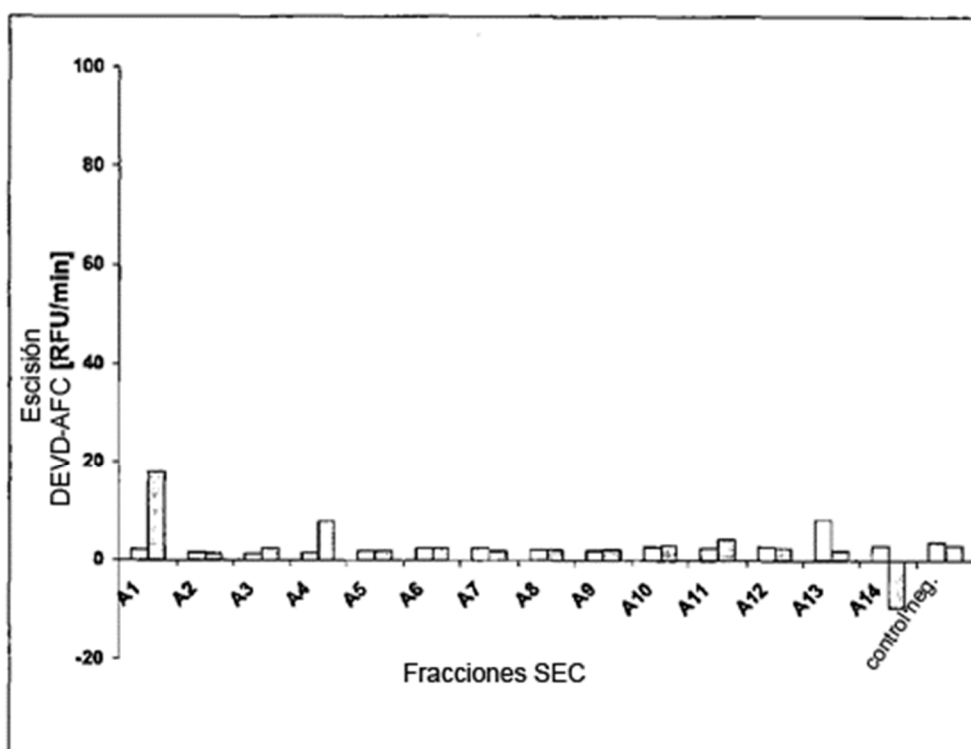


Figura 19

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

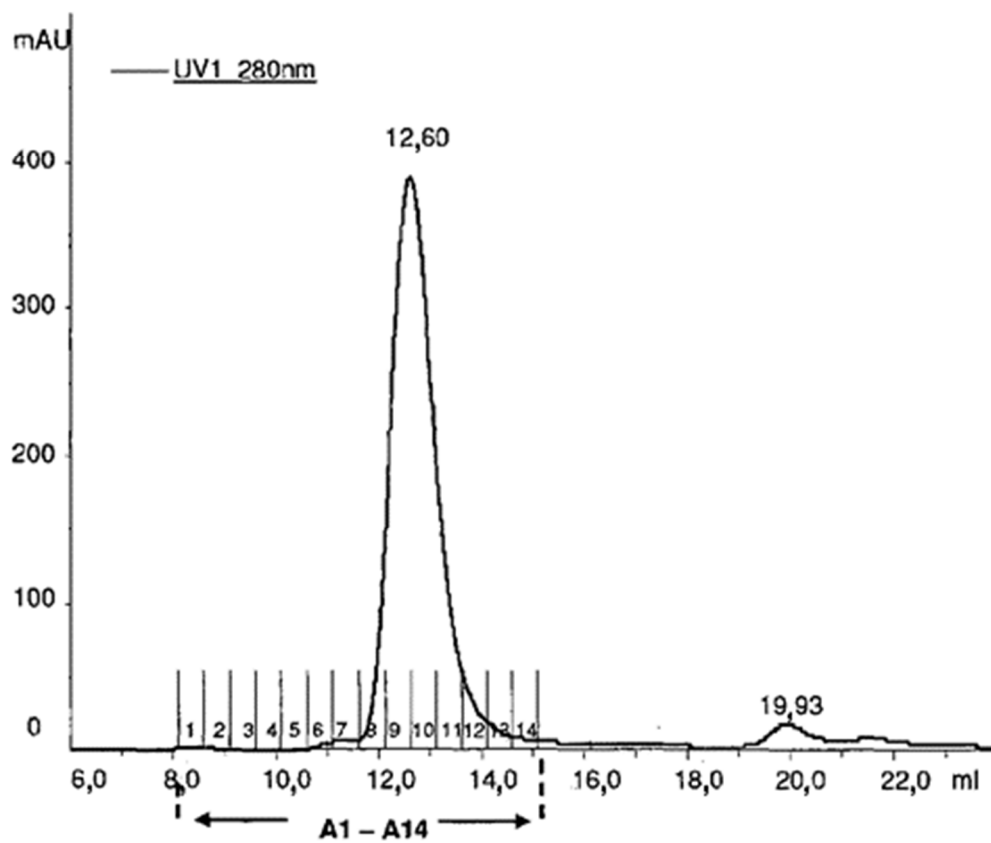


Figura 20

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

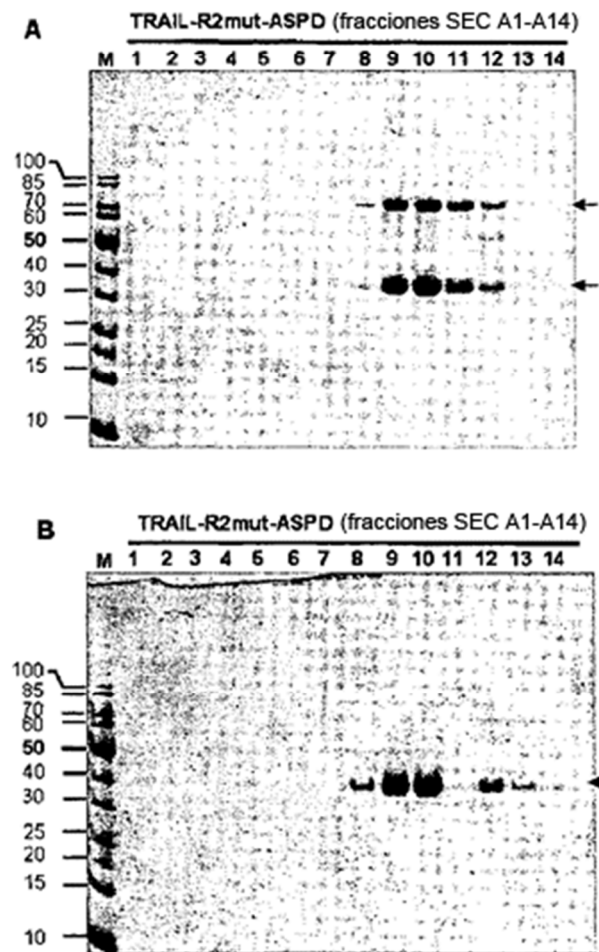


Figura 21

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

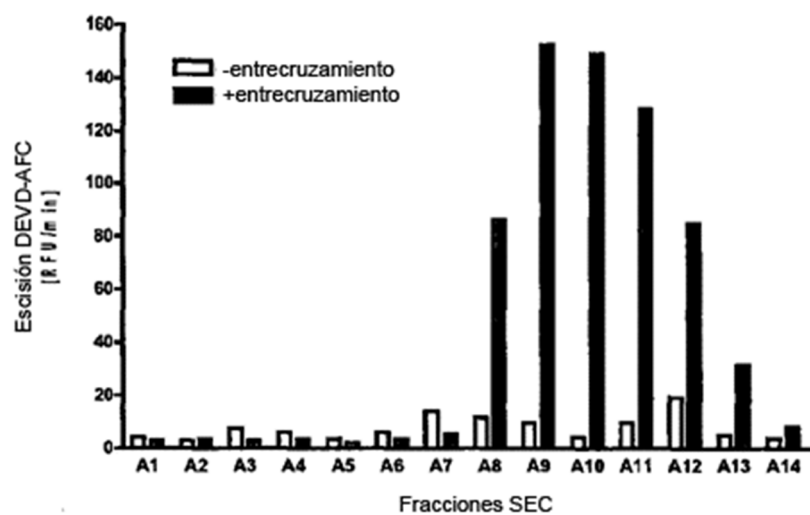


Figura 22

Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD, TRAILR1mut-ASPD y TRAILR2mut-ASPD sobre células cancerosas humanas

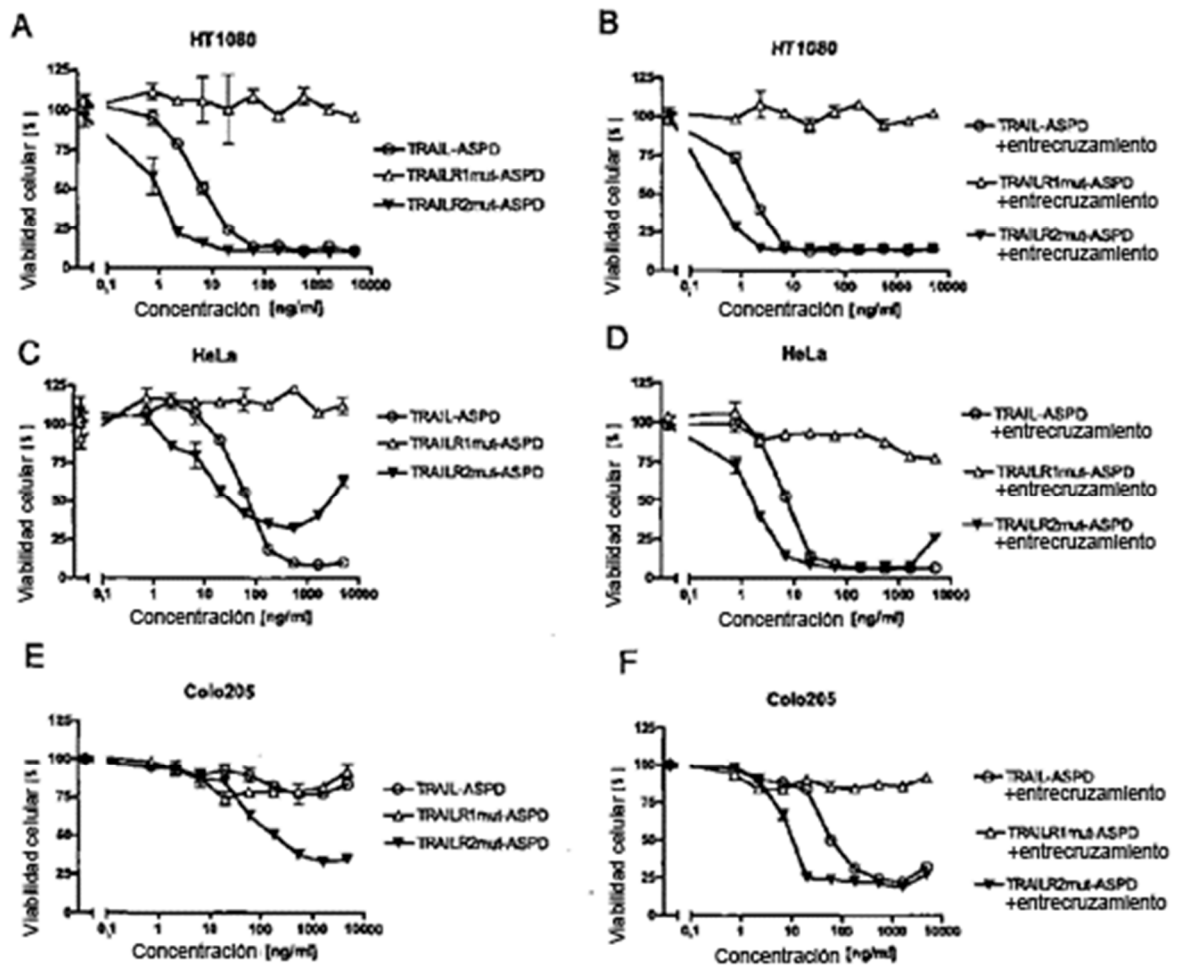


Figura 23

Proteínas TRAIL-SPD selectivas de receptor son altamente solubles

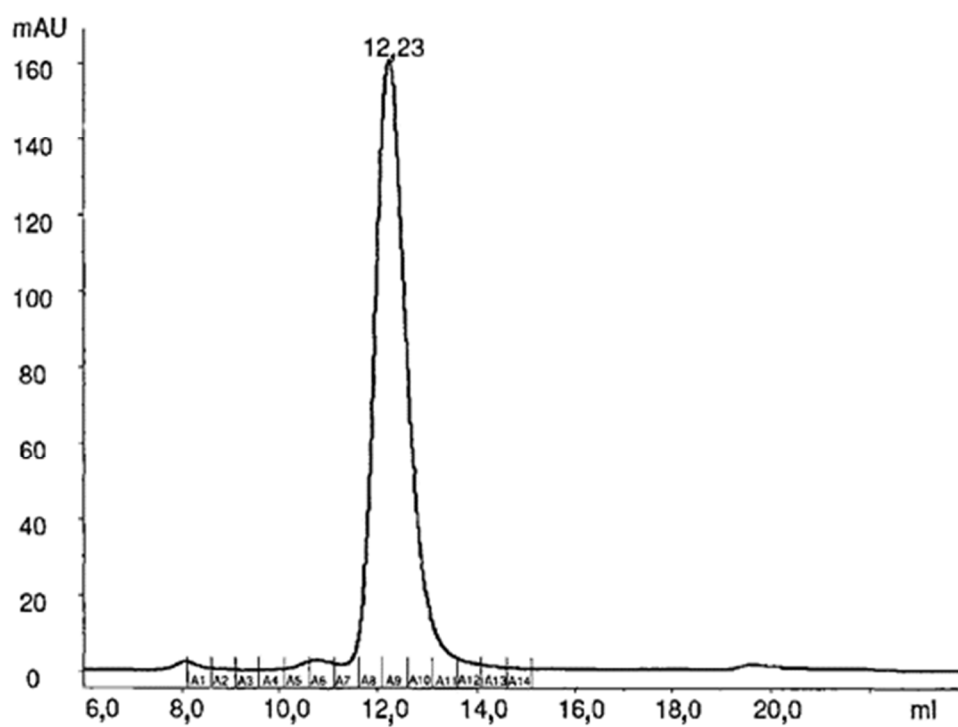


Figura 24

SEC de TRAIL-ASPD_F335A purificada por afinidad

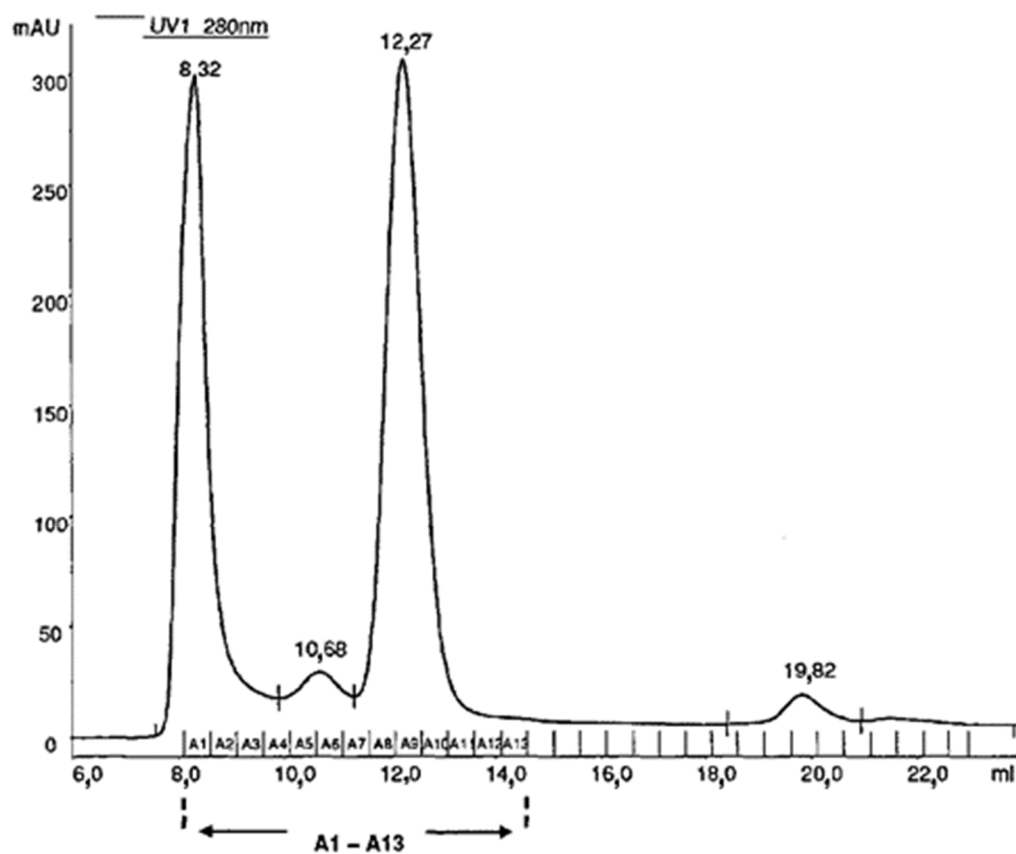


Figura 25

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

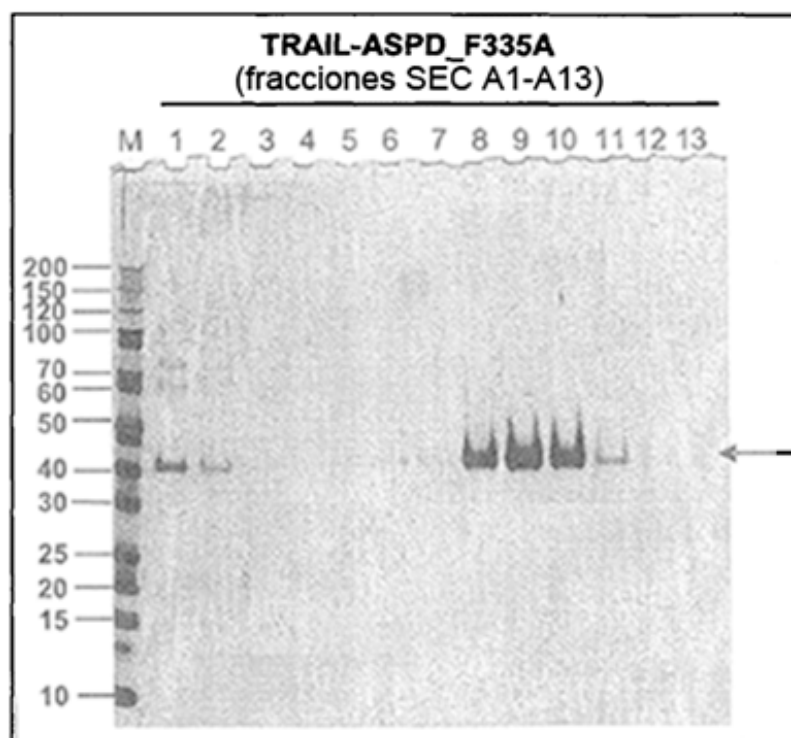


Figura 26

Efecto citotóxico de TRAIL-ASPD_F335A sobre células cancerosas humanas

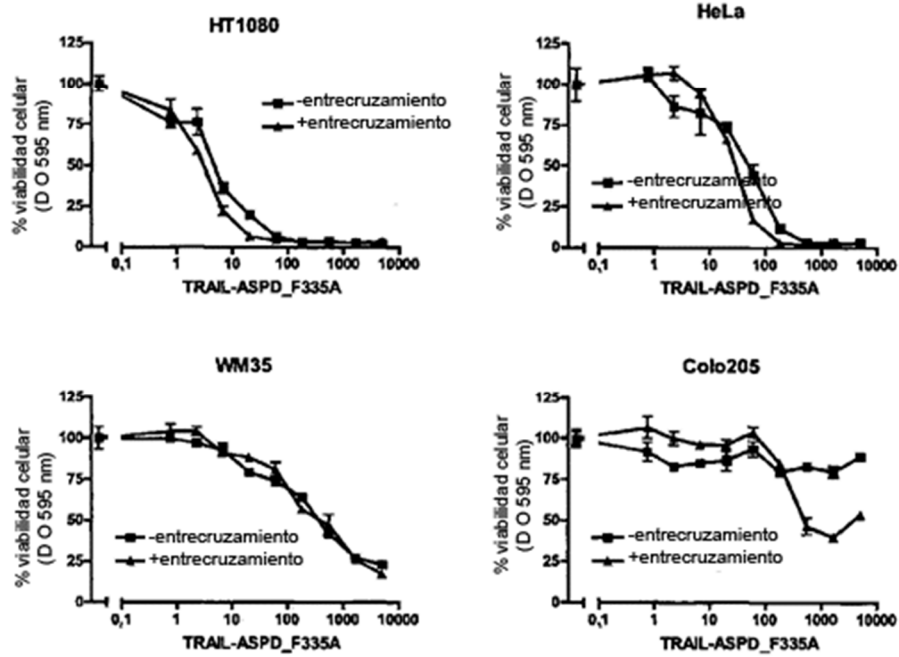


Figura 27

SEC de TRAIL-ASPD_F335D purificada por afinidad

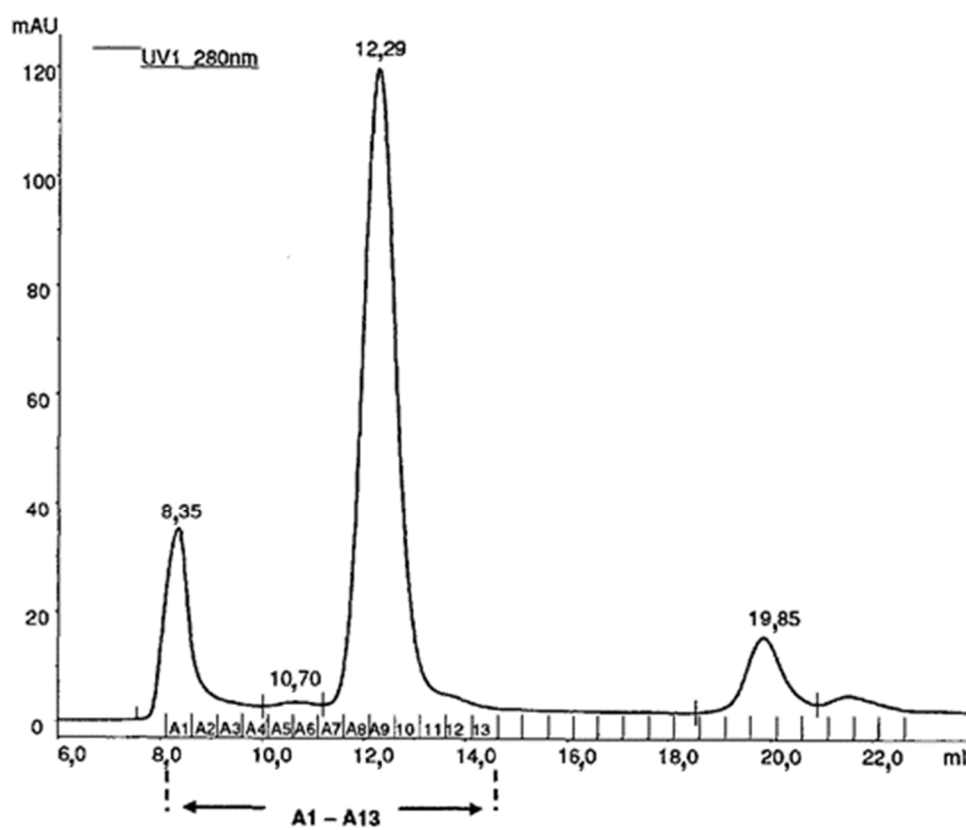


Figura 28

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

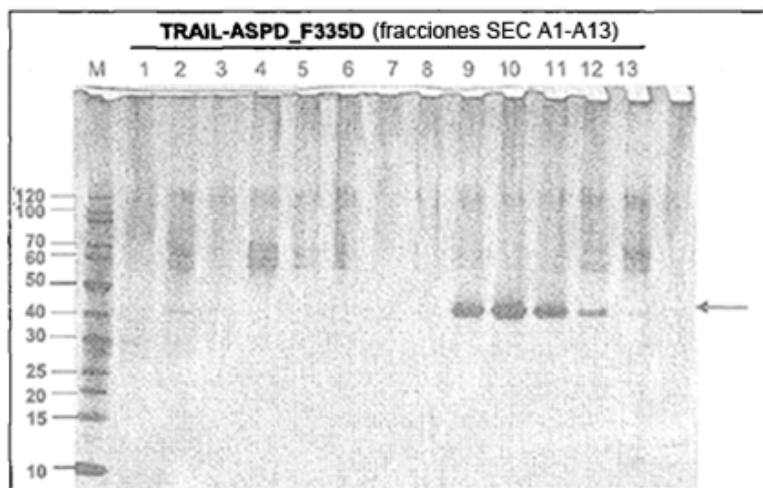


Figura 29

Efecto citotóxico de TRAIL-SPD_F335D sobre células cancerosas humanas

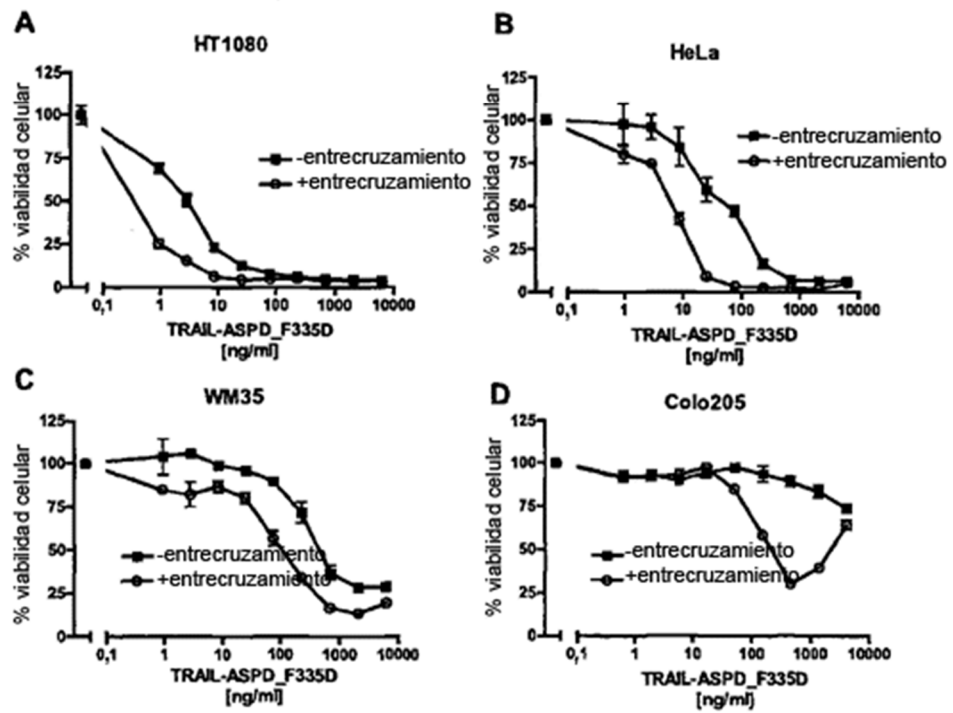


Figura 30

Unión de proteína de fusión TRAIL-ASPD a carbohidratos

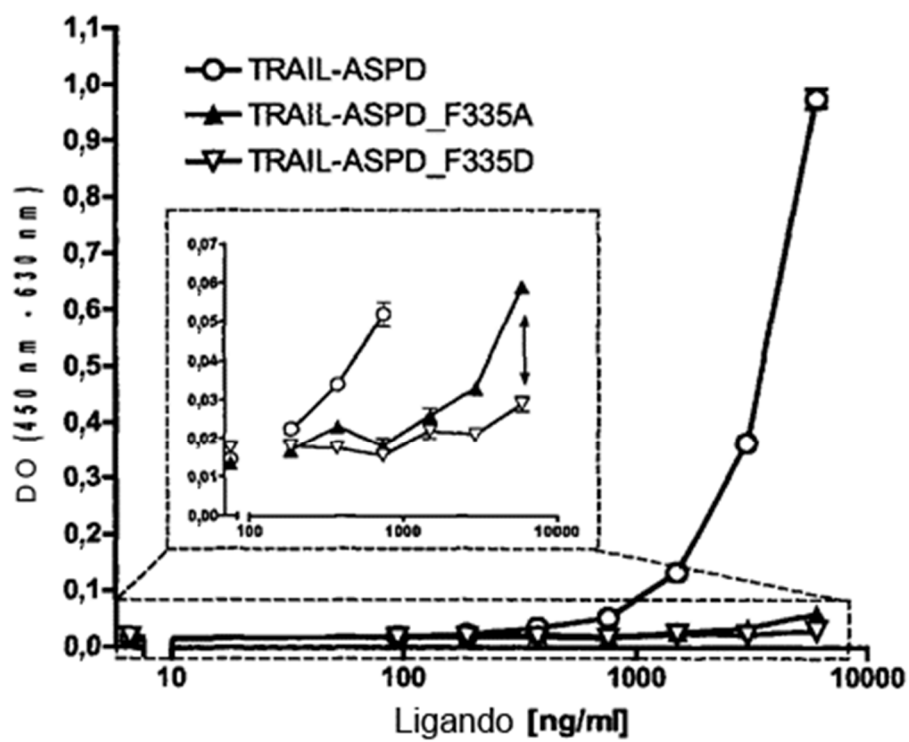


Figura 31

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

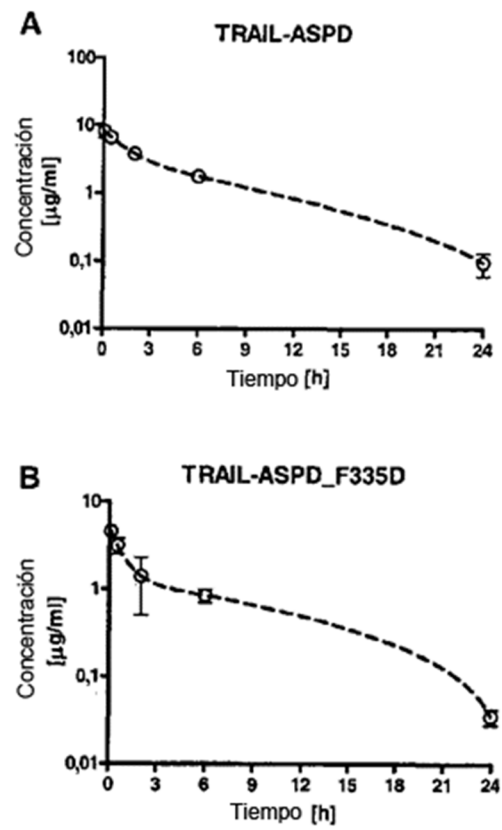


Figura 32

Actividad caspasa en hepatocitos humanos primarios

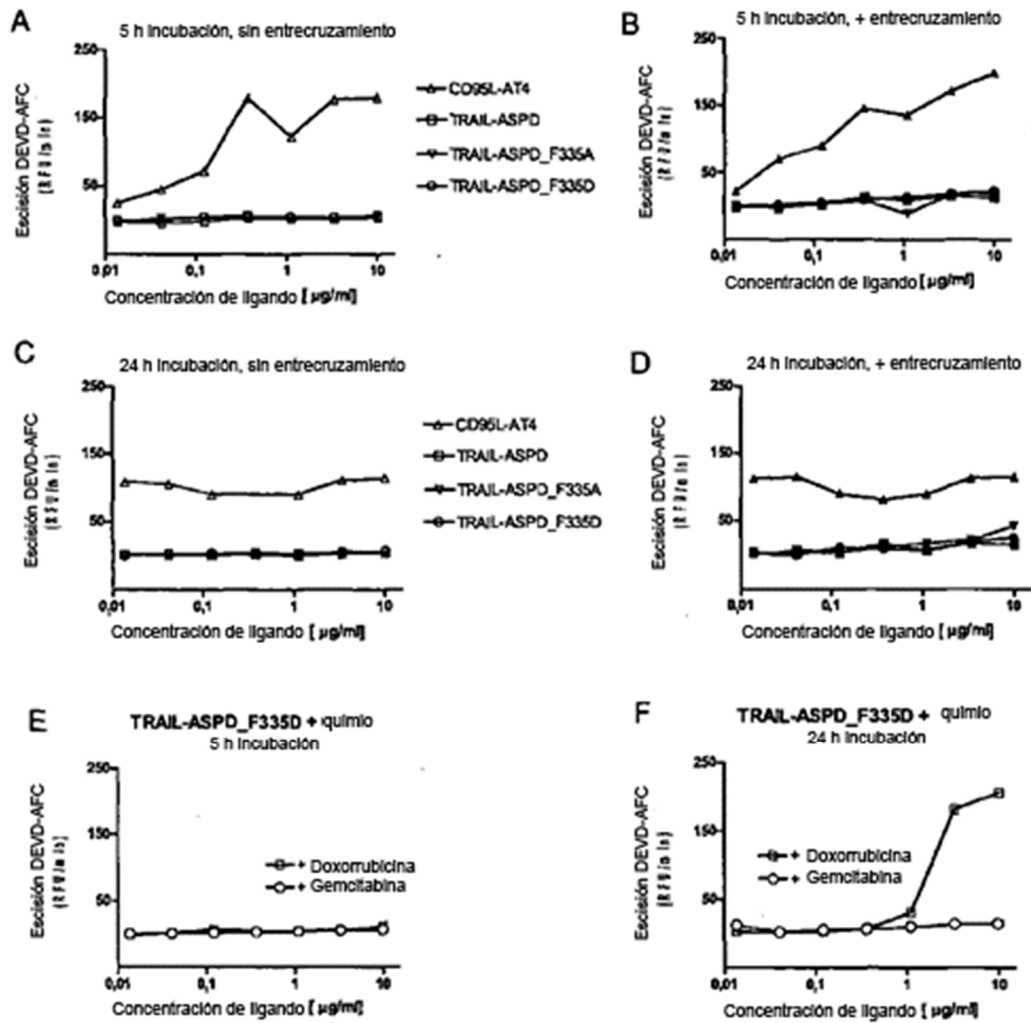


Figura 33

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

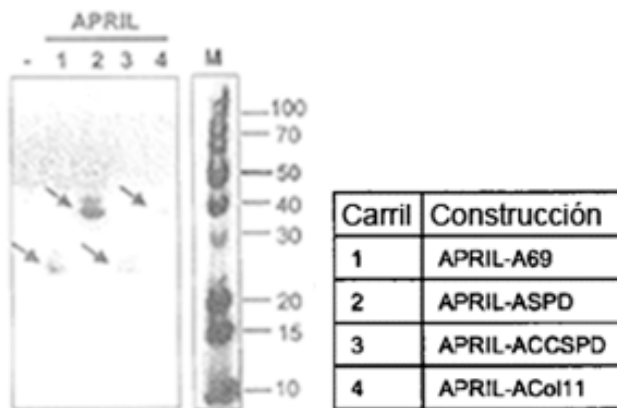


Figura 34

TACI-Fc se une a APRIL-ASPD

