

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 968**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2014 PCT/CN2014/076768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO14180288**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2014 E 14795356 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2995626**

54 Título: **Proteínas de fusión bifuncionales para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral y para activar las respuestas inmunitarias adaptativas y los genes y usos de las mismas**

30 Prioridad:

06.05.2013 CN 201310162738
06.05.2013 CN 201310163407

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

73 Titular/es:

CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY (100.0%)
No. 639 Longmian Avenue Jiangning
Nanjing, Jiangsu 211198, CN

72 Inventor/es:

WANG, SHUZHEN;
CHEN, YIJUN;
HE, DONGYANG;
LIU, NAN;
MA, CHAO y
GAO, ZHENYUE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 968 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 bifuncionales para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral y para activar las respuestas inmunitarias adaptativas y los genes y usos de las mismas

5 **Resumen:** Se desvelan proteínas de fusión bifuncionales que tienen fragmentos activos de tumstatina y regiones extracelulares CD137L. Las proteínas muestran actividades para inhibir la proliferación de las células endoteliales de la vena umbilical humana y para estimular la proliferación de los linfocitos T. Se pueden usar para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con tumores y la regulación de la angiogénesis y los efectos inmunológicos en seres humanos.

Campo de la técnica

10 La presente invención pertenece al campo de la ingeniería biomédica y terapéutica. La presente invención se refiere en general a una serie de proteínas de fusión bifuncionales (CD137L-Tumstatina) y a sus genes, en la que las proteínas tienen las funciones de inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral y activar las respuestas inmunes adaptativas. La presente invención también se refiere al vector de expresión que contiene los genes, a las cepas transformadas por el vector de expresión y al procedimiento de preparación de las proteínas de fusión
15 bifuncionales. Además, la presente invención se refiere generalmente a la aplicación de las proteínas de fusión bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L en la preparación de agentes farmacéuticos para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral y para tratar diversas enfermedades relacionadas con tumores (por ejemplo, melanoma, cáncer rectal, cáncer de pulmón y otros cánceres) mediante la activación de las respuestas inmunes adaptativas, así como todas las posibles vías de administración (por ejemplo, administración oral,
20 administración de pulverizaciones y otras).

Antecedentes de la invención

La aparición de cáncer es un proceso que abarca múltiples genes y diferentes vías de señal. En cuanto a su esencia, el cáncer es un tipo de enfermedad molecular. En la actualidad, la terapia molecular dirigida a un solo objetivo ha demostrado gradualmente muchas deficiencias, mientras que las estrategias terapéuticas que combinan
25 múltiples objetivos o múltiples mecanismos muestran mejores efectos terapéuticos.

En 1971, el profesor Folkman de la Universidad de Harvard propuso la teoría de que "el crecimiento y la metástasis de los tumores dependen de la angiogénesis en el microambiente". Postuló la hipótesis de que el crecimiento y la metástasis de los tumores podrían inhibirse suprimiendo la angiogénesis en el microambiente y cortando el suministro de nutrientes y oxígeno a los tumores. Hasta ahora, esta teoría se ha verificado mediante numerosos
30 datos clínicos y experimentales en todo el mundo, y, por tanto, recientemente se ha convertido en una nueva estrategia en el campo de la terapia del cáncer. La tumstatina, una proteína que consiste en 244 aminoácidos, es un inhibidor de la angiogénesis tumoral derivado del C-terminal de la cadena $\alpha 3$ del colágeno de tipo IV en la membrana basal vascular.

Entre todas las membranas basales vasculares, el marco reticular tridimensional formado por colágeno de tipo IV desempeña un papel predominante como endoprótesis vasculares, que pueden promover la adhesión, la migración, la diferenciación y el crecimiento de las células. Las 6 cadenas ($\alpha 1 \sim \alpha 6$) están codificadas por 6 genes distintos, formando un trímero a través de las mismas cadenas α o diferentes, formando además el marco reticular. Cada
35 cadena $\alpha 3$ de colágeno de tipo IV consiste en tres unidades funcionales (dominio 7S, región de triple hélice, dominio NC1 no colagenoso) y se distribuye en las membranas basales de los capilares glomerulares, los capilares alveolares, la cóclea, la cápsula del cristalino, los ovarios y testiculares.

La angiogénesis es una etapa crítica en el crecimiento tumoral y la metástasis, que incluye una serie de procesos complejos. La hipoxia en los tejidos tumorales produce el aumento de los factores estimulantes de la angiogénesis, estimulando así la angiogénesis en el microambiente tumoral. Estudios recientes muestran que la tumstatina puede inhibir específicamente la síntesis de las proteínas de las células endoteliales vasculares del tumor, lo que da como
45 resultado en la apoptosis de las células endoteliales y la inhibición de la angiogénesis, y, por lo tanto, inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis. Además, la tumstatina también tiene un efecto directo sobre las células tumorales para inhibir su proliferación. La acción del mecanismo de la tumstatina es inhibir la síntesis de las proteínas de las células endoteliales vasculares localizadas específicamente en el microambiente tumoral a través de la unión al receptor de la integrina $\alpha v \beta 3$ que inhibe la síntesis de proteínas en las células endoteliales vasculares del tumor; de este modo, el crecimiento y la metástasis de las células tumorales pueden inhibirse inhibiendo la
50 angiogénesis.

En el campo se ha reconocido que la inmunoterapia contra el cáncer muestra efectos ventajosos contra tumores malignos en seres humanos y animales a través de las respuestas inmunes. Las células inmunitarias de los pacientes con cáncer reconocen diferentes antígenos expresados por las células tumorales, tales como el antígeno de diferenciación tisular, el antígeno carcinoembrionario, los productos genéticos mutados y otros. Con la comprensión de los mecanismos sobre el reconocimiento de antígenos tumorales y la respuesta inmunitaria, se ha demostrado que las respuestas inmunitarias antitumorales pueden mejorarse proporcionando la señal de
55 inmunocoestimulación a través de correceptores de linfocitos T. Los linfocitos T específicos del antígeno tumoral

requieren una señal coestimuladora para ayudar a la primera señal iniciada por el antígeno para activar las células efectivas. Por lo tanto, la terapia adyuvante mediante moléculas coestimuladoras se puede usar para regular las respuestas inmunitarias dirigidas a tumores malignos.

Las moléculas coestimuladoras desempeñan un papel extremadamente importante en la respuesta inmunitaria. En general, se requieren dos señales en la activación de los linfocitos T. La primera señal es proporcionada por el receptor de linfocitos T (TCR) y el péptido antígeno-MHC presentado por las células presentadoras de antígeno (CPA), y la segunda señal es la señal coestimuladora proporcionada por las moléculas de adhesión en la superficie celular. Una de las formas importantes de mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por linfocitos T es proporcionar señales coestimuladoras para lograr la activación completa de los linfocitos T. Además de CD28/B7, CD137 y su ligando CD137L es otro par de moléculas coestimuladoras de linfocitos T importantes descubiertas recientemente.

De acuerdo con sus estructuras, las moléculas coestimuladoras se pueden dividir en dos tipos, que incluyen el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD137, un miembro del TNFR, desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Su ligando, CD137L, también es miembro de la familia de TNF, que pertenece a las proteínas transmembrana de tipo II en la superficie celular y comparte una secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal similar con otros miembros de la familia de TNF. El gen que codifica el CD137L humano se encuentra en 19p3.3, y su producto consiste en 254 aminoácidos, en el que el dominio citoplasmático consiste en 28 aminoácidos, la región transmembrana consiste en 21 aminoácidos y el dominio extracelular consiste en 205 aminoácidos. El CD137L fue descubierto por primera vez por Goodwin y col. usando la detección selectiva de la expresión de las células de timoma en ratones y más tarde se aisló en clones de linfocitos T CD4 + humanos.

Es bien sabido que la interacción entre CD137 y su ligando, CD137L, desempeña un papel importante en la activación de los linfocitos T. En linfocitos T humanos y de ratón, en presencia del anticuerpo CD3 (primera señal), CD137 puede inducir la proliferación de linfocitos T, la síntesis de citocinas (tales como IFN- α) y la supervivencia de las células activadas. La señal coestimuladora puede mejorar la función efectora aumentando la especificidad antigénica y aumentar el número de linfocitos T CD8+. En ausencia de anticuerpo CD3, la estimulación de CD137 no cambia las funciones de los linfocitos T, lo que indica que la interacción entre CD137 y CD137L solo proporciona una señal coestimuladora. El documento WO2013025846 desvela una proteína de fusión de transferrina-tumstamina con propiedades anti-angiogénicas. Los estudios de Kim y col., demostraron que la inmunidad antitumoral mediada por el anticuerpo monoclonal CD137 depende de la participación de los linfocitos T CD4+ T y CD8+. CD137 participa en la activación de NF- κ B para regular por aumento la expresión de bcl-xL y bfl-1, para extender la supervivencia de los linfocitos T CD8+ y T CD4+ y para estimular su proliferación. Utilizando el anticuerpo monoclonal CD137L murino agonista, Melero y otros llevaron a cabo la inmunoterapia dirigida a CD137. Sus resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal frente a CD137 podría eliminar la presencia de tumores sólidos P815 inoculados en ratones. De acuerdo con los efectos antitumorales del anticuerpo monoclonal agonista frente a CD137, CD137L también puede coestimular el linfocito citotóxico (CTL) y sus efectos antitumorales. El ratón CD137L -/- es una buena ilustración del importante papel del sistema CD137/CD137L en las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T contra virus y tumores, que muestra que la coestimulación de CD137/CD137L es vital en la enfermedad del injerto contra el huésped y en las respuestas de los linfocitos T antivirales.

En resumen, la señal coestimuladora proporcionada por CD137/CD137L puede cooperar con la de CD28/B7 para la activación adicional de los linfocitos T y el mantenimiento de la proliferación y supervivencia de los linfocitos T CD8+. La tumstamina puede inhibir eficazmente la angiogénesis tumoral, que puede bloquear las células tumorales frente a la supervivencia y la metástasis. Por lo tanto, para combinar las estrategias de antiangiogénesis e inmunoterapia, la proteína de fusión tumstamina-CD137L indicada en la presente invención puede suprimir el crecimiento tumoral y la metástasis mediante la combinación de dos mecanismos, que podrían evitar la resistencia a fármacos de la terapia de agente único y proporcionar una nueva terapia para el cáncer.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una proteína recombinante bifuncional según cualquiera de las reivindicaciones 1-2. La presente invención proporciona además un gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5.

En la presente invención, las proteínas bifuncionales y de doble objetivo, que poseen actividades para potenciar la inmunidad de linfocitos T e inhibir la angiogénesis, se preparan fusionando los fragmentos activos antiangiogénicos de la tumstamina con las regiones extracelulares de CD137L a través de enlaces peptídicos flexibles cortos. Diferentes fragmentos activos de la tumstamina (tumstamina 1 contiene los restos de aminoácidos de 45 a 98, tumstamina 2 contiene los restos de aminoácidos de 60 a 132, tumstamina 3 contiene los restos de aminoácidos de 60 a 98, tumstamina 7 contiene los restos de aminoácidos de 74 a 98) y las secuencia de aminoácidos extracelulares de CD137L (CD137L1 contiene los restos de aminoácidos de 46 a 254, CD137L4 contiene los restos de aminoácidos de 50 a 240, CD137L5 contiene los restos de aminoácidos de 83 a 254, CD137L6, un fragmento combinado, contiene los restos de aminoácidos de 46 a 85 y de 167 a 254, como se indica en la Figura 2) están conectados por un enlazador peptídico, y se preparan usando sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Las proteínas de fusión tienen las ventajas de la preparación simple y efectos secundarios reducidos de la tumstamina de longitud

- completa y el y CD137L, respectivamente. La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7. La presente invención también proporciona una proteína recombinante bifuncional para su uso de acuerdo con la reivindicación 8. La presente invención muestra excelentes potenciales en la preparación de agentes farmacéuticos para la inhibición de la angiogénesis, todos los tipos de enfermedades asociadas a tumores (tales como melanoma, cáncer de próstata, cáncer broncopulmonar, cáncer colorrectal y cáncer de vejiga y otros), cambios patológicos de la retina, la proliferación celular, la síntesis y secreción de citocinas y la regulación de la inmunidad, así como en la preparación de agentes farmacéuticos con diferentes formulaciones, incluyendo administración oral o mediante inyección.
- El fin de la presente invención es proporcionar proteínas que poseen ambas funciones de la tumstatina y de CD137L.
- El otro fin de la presente invención es proporcionar genes que codifican proteínas con las funciones de tumstatina y CD137L.
- Otro fin de la presente invención es proporcionar procedimientos de preparación para las proteínas que poseen las funciones de tumstatina y CD137L.
- Otro fin de la presente invención es proporcionar las aplicaciones de los genes y proteínas que poseen las funciones de tumstatina y CD137L en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la oncología (tales como melanoma, cáncer rectal, cáncer de pulmón y otros) y en las vías de administración de los agentes farmacéuticos (tales como administración oral, administración por pulverización y otros).
- El esquema técnico de la presente invención se describe de la siguiente manera:
- Las proteínas de fusión bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L, caracterizadas porque las proteínas comprenden las secuencias de aminoácidos de los fragmentos activos de tumstatina y los dominios extracelulares de CD137L, en las que las secuencias de tumstatina y CD137L se fusionan a través de enlazadores peptídicos flexibles, en las que la secuencia de aminoácidos del fragmento activo de tumstatina se selecciona de la SEQ ID NO.65 a la SEQ ID NO.68, en las que la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137L se selecciona de la SEQ ID NO.77 a la SEQ ID NO.80.
- Las secuencias de aminoácidos del enlazador peptídico descrito anteriormente se pueden diseñar con las técnicas bien conocidas en la materia y las secuencias de aminoácidos preferentes se seleccionan de la SEQ ID NO.69 a la SEQ ID NO.76.
- Las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes bifuncionales descritas en la presente invención se seleccionan de la SEQ ID NO.25 a la SEQ ID NO.48. En la Figura 1 se muestra una representación esquemática de las estructuras de las proteínas recombinantes.
- La presente invención también proporciona genes que codifican las proteínas recombinantes que poseen las funciones de la tumstatina y CD137L, que incluye el gen que codifica un fragmento activo de la tumstatina, el gen que codifica un enlazador peptídico y el gen que codifica una región extracelular de CD137L, en el que los genes que codifican la región extracelular de CD137L se seleccionan de la SEQ ID NO.61 a la SEQ ID NO.64, en los que los genes que codifican el fragmento activo de tumstatina se seleccionan de la SEQ ID NO.49 a la SEQ ID NO.52.
- El gen que codifica el enlazador peptídico descrito anteriormente se selecciona, preferentemente, de la SEQ ID NO.53 a la SEQ ID NO.60.
- La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante descrita anteriormente se selecciona, preferentemente, de la SEQ ID NO.1 a la SEQ ID NO.24.
- La presente invención también proporciona un gen que codifica una proteína recombinante tumstatina-CD137L, que tiene una homología del 70 % o más en comparación con las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente y produce una proteína recombinante descrita anteriormente, su polipéptido variante conservador, su fragmento activo o sus derivados activos.
- La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación para las proteínas recombinantes bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L, que incluye las siguientes etapas:
- (1) Diseñar y obtener las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L descritas en la presente invención;
 - (2) Construir el sistema de expresión que contiene las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, incluyendo construir el vector de expresión y transformar el vector de expresión en una célula huésped para formar células recombinantes que pueden expresar las proteínas de fusión bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L;
 - (3) Cultivar las células recombinantes obtenidas de la etapa (2);
 - (4) Aislar y purificar las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L descritas en la presente invención.

El sistema de expresión descrito anteriormente podría seleccionar un sistema de expresión procariota o un sistema de expresión eucariota. El sistema de expresión procariota se selecciona, preferentemente, de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, ambos generalmente aplicables a la expresión de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención. El vector de expresión se selecciona, preferentemente, de pET-11a o pET-22b para el sistema de expresión d *Escherichia coli*, mientras que pP43 es el vector preferido para el sistema de expresión de *Bacillus*. La levadura es el sistema de expresión eucariota preferido, el vector de expresión se selecciona, preferentemente, de pPIC9K o pPICZαA, y las células huésped se seleccionan, preferentemente, de GS115 o SMD1168.

Un procedimiento de preparación preferente descrito anteriormente incluye el proceso de doble digestión de los genes que codifican las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L con las enzimas NdeI y NheI, ligándolos con el vector de expresión pET-11a y transformando los vectores ligados en BL21(DE3) de *E. coli*. Después del cultivo de las bacterias modificadas genéticamente, las proteínas recombinantes se producen en forma de cuerpo de inclusión y se obtienen mediante renaturalización por dilución que incluye un proceso de lavado del cuerpo de inclusión mediante tampón que contiene bajas concentraciones de urea, solubilizando el cuerpo de inclusión mediante una solución desnaturalizante que contiene urea 8 M a 50 °C y renaturalización por dilución con la solución de replegamiento que contiene L-Arg a la concentración de 0,4 M. La pureza de los productos deseados es mayor que 80 %.

Otro procedimiento de preparación preferente descrito anteriormente incluye el proceso de doble digestión de los genes que codifican las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L con las enzimas PstI y HindIII, ligándolos con el vector de expresión pP43, transformando los vectores ligados en *Bacillus subtilis* WB800 por electroporación. Después del cultivo de las bacterias modificadas genéticamente, las proteínas recombinantes se producen en una forma soluble secretada. Las proteínas recombinantes descritas en la presente invención se obtienen por purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico DEAE-sephadex y la pureza es mayor que 80 %.

Otro procedimiento de preparación preferente descrito anteriormente incluye el proceso de doble digestión de los genes que codifican las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L con las enzimas EcoRI y NotI, ligándolos con el vector de expresión pPICZαA, transformando los vectores ligados en *Pichia pastoris* GS115 por electroporación. Después del cultivo de las bacterias modificadas genéticamente, las proteínas recombinantes se producen en una forma soluble secretada. Las proteínas recombinantes descritas en la presente invención se obtienen por purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico DEAE-sephadex y la pureza es mayor que 90 %.

La presente invención también proporciona las proteínas recombinantes bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L para su uso en un procedimiento para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral, tratando diversas enfermedades relacionadas con tumores (tales como melanoma, cáncer rectal, cáncer de pulmón y otros), regulando la inmunidad corporal, estimulando la proliferación de linfocitos T y sintetizando y secretando citocinas.

En las aplicaciones descritas anteriormente, las proteínas recombinantes descritas en la presente invención pueden usarse solas o en forma de composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica comprende la proteína recombinante descrita en la presente invención como un componente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende de 0,1 % a 99,9 % en peso de una proteína recombinante descrita en la presente invención como principio activo. El vehículo farmacéuticamente aceptable no interferirá con la actividad farmacéutica y la dosificación efectiva de una proteína recombinante descrita en la presente invención, lo que significa que la dosificación del vehículo no es tóxica para el cuerpo humano.

El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, aunque no de forma limitante, uno o más de los siguientes: materiales de intercambio iónico; óxido de aluminio; estearato de aluminio; lecitina; sistema de administración de fármacos autoemulsionante (SEDDS), tales como vitamina D y E, polietilenglicol 1000, succinato, Tween y otros medios de polimerización con funciones similares; otros tensioactivos farmacéuticamente aceptables; seroalbúminas, tales como seroalbúmina humana; tampones, tal como solución salina tamponada con fosfato; ácido aminoacético; ácido sórbico; ácido sórbico potásico; ácido graso vegetal saturado; mezclas de glicéridos; agua; sales; electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, geles de sílice, silicato de magnesio y otros. polivinilpirrolidona, celulosa, alcohol de polivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliácido, etileno, polioxietileno, copolímero de bloque (tales como lanolina) y ciclodextrina (tales como α-, β-, γ-ciclodextrina, derivados químicamente modificados, por ejemplo, 2- y 3-hidroxipropil-β -ciclodextrina, u otros derivados solubles) también son aplicables para la administración de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención.

También podrían incorporarse otros excipientes farmacéuticamente aceptables en las composiciones farmacéuticas, que incluyen cargas (tales como lactosa anhidra, almidón, lactosa o glucosa), aglutinantes (tales como celulosa microcristalina), agente disgregante (tal como carboximetil almidón de sodio reticulado, carboximetilcelulosa sódica reticulada, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución (L-HPC) o PVP reticulada), agentes lubricantes (tales como estearato de magnesio), potenciador de la absorción, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, diluyentes, vehículos, agentes humectantes, disolventes, solubilizantes y agentes colorantes y otros.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente podrían usarse en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvo o preparaciones líquidas, administración parenteral, tales como inyecciones, administraciones locales o supositorios, que podrían prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica o por procedimientos no convencionales tales como liposomas y otros.

Cuando las proteínas recombinantes descritas en la presente invención se usan como un agente terapéutico, la dosis diaria para adultos puede variar de 0,01 mg a 1 g, que depende de la edad, el sexo, el peso y el grado de enfermedad de los pacientes. Además, la dosis diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día.

Las proteínas recombinantes descritas en la presente invención también incluyen los derivados proteicos que se modifican mediante procedimientos bien conocidos en la materia del presente campo técnico.

En la mayoría de las circunstancias, la mayoría de los fármacos proteicos y peptídicos se pueden digerir paso a paso desde los dos extremos de los péptidos lineales mediante aminopeptidasa y carboxipeptidasa.

La modificación de los polipéptidos es un medio importante para cambiar la estructura de la cadena principal y la cadena lateral. En un gran número de estudios se ha indicado que los fármacos polipeptídicos modificados mostraron una mejor eficacia que exhibe una inmunogenicidad significativamente reducida, efectos secundarios reducidos, una mayor solubilidad en agua, semividas biológicas prolongadas in vivo y cambios en la distribución tisular, etc.

Los procedimientos de modificación descritos en la presente invención consisten en las modificaciones en restos de aminoácidos intermedios, sustituciones de aminoácidos, modificación de glicosilación y modificación de PEG y otros, cuyos principios básicos aumentan el peso molecular relativo y el impedimento estérico de las moléculas polipeptídicas y mejoran la estabilidad del polipéptido a la hidrolasa, y la reducción de la función de filtración del glomérulo.

La sustitución de aminoácidos es otro procedimiento para prolongar la semivida de los fármacos polipeptídicos posponiendo la digestión de las enzimas. Los restos del objeto generalmente son aquellos aminoácidos fácilmente digeridos. Con detalle, los restos intermedios de las proteínas recombinantes podrían estar glicosilados, fosforilados, metilados, acetilados, nitrados, sulfonados, PEG-ilados o acoplados con otras proteínas, en la que:

Para la glicosilación, N-glicosilación y O-glicosilación se usan habitualmente. Los péptidos glicosilados son, preferentemente, para unir uno o más hidroxilo oxígeno a restos de tirosina, serina o treonina o uno o más nitrógenos de la cadena lateral de asparagina de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención con glicanos.

Los péptidos fosforilados son, preferentemente, proteínas recombinantes fosforiladas descritas en la presente invención en uno o más restos de Tyr, Ser o Thr.

Los péptidos metilados incluyen péptidos metilados en la cadena lateral y metilados en N-terminal. La metilación de la cadena lateral es, preferentemente, metilato de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención en una o más cadenas laterales de Lys, Tyr o Arg, tales como Lys(For), Lys(Me), Lys(Me)₂, Lys(Me)₃, Arg(Me)₂ simétrica, D-Tyr(Me), D-Tyr(Et);

Los péptidos acetilados son, preferentemente, acetilato de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención en una o más cadenas laterales de Lys o Ser, tales como Ser (Ac) o Lys (Ac).

Los péptidos nitrados o sulfonados son, preferentemente, nitrato o sulfonato de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención en una o más cadenas laterales de Tyr, tal como, Tyr (3-NO₂), Tyr (SO₃H₂).

Los péptidos PEG-ilados son, preferentemente, PEG-ilato de las proteínas recombinantes descritas en la presente invención en una o más cadenas laterales de Lys. El peso molecular del PEG es, preferentemente, de aproximadamente 2000-10.000.

Como alternativa, uno o más restos de aminoácidos de las proteínas recombinantes o las proteínas modificadas descritas anteriormente en la presente invención podrían sustituirse con los derivados de aminoácidos o aminoácidos inusuales, tales como sustituyendo alanina por β-alanina, homofenilalanina o naftilalanina, sustituyendo prolina por hidroxiprolina, sustituyendo leucina por norleucina, sustituyendo valina por norvalina, sustituyendo treonina por alotreonina, sustituyendo isoleucina por aloisoleucina, sustituyendo asparagina por Asn(GlcNac(Ac)-β-D)), sustituyendo lisina por Lys(palmitoilo).

Como alternativa, uno o más restos de aminoácidos de las proteínas recombinantes o las proteínas modificadas descritas anteriormente en la presente invención podrían sustituirse con aminoácidos de tipo D.

El gen que codifica las proteínas recombinantes bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L (GenBank: AAF72632.1 y NP_003802.1) podría obtenerse mediante estrategias bien conocidas en la materia, tales como síntesis génica, PCR o la combinación de ellas, en las que la secuencia de nucleótidos completa de CD137L

podría obtenerse a través del procedimiento publicado (Wang Shuzhen, J Ind MicrobioBiotechnol.2012Mar; 39(3):471-6.doi:10.1007/s10295-011-1045-1).

La presente invención construye los vectores de expresión que codifican las proteínas recombinantes bifuncionales descritas anteriormente que poseen las actividades de tumstatina y CD137L, en el que el vector de expresión correcto se obtiene por amplificación por PCR, digestión y unión de rutina que incluye doble digestión del gen que codifica tumstatina-enlazador peptídico-dominio extracelular de CD137L con NdeI y NheI, ligando el fragmento de ADN obtenido anteriormente en los sitios correspondientes del vector de expresión procariota pET-11a, y el vector se secuenció para verificar.

La presente invención construye las bacterias modificadas genéticamente que contienen los vectores de expresión descritos anteriormente, que incluyen transformar un gen objetivo en BL21, cultivo líquido, y seleccionar las cepas modificadas positivamente.

La presente invención proporciona procedimientos para obtener las proteínas bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L, en donde el procedimiento es cultivar y fermentar las cepas manipuladas positivamente, inducir la expresión de una proteína bifuncional con las actividades de tumstatina y CD137L a temperatura ambiente, recolectar las células e interrumpen las células con alta presión. Después de disolver la desnaturalización y el replegamiento por dilución del precipitado centrifugado, se puede obtener una proteína bifuncional con las actividades de tumstatina y CD137L.

En la presente invención, el ensayo de actividad para las proteínas de fusión bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L se lleva a cabo mediante ensayo HUVEC y ensayo de activación de linfocitos T de ratón. Los resultados del ensayo HUVEC mostraron que la proliferación de células endoteliales se inhibía significativamente. El ensayo de activación de linfocitos T de ratón mostró que las proteínas de fusión descritas anteriormente pueden mantener la actividad biológica de CD137L y estimular la proliferación de células T mediante cooperación con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 y el anticuerpo monoclonal anti-CD28.

Las ventajas de la presente invención:

La presente invención muestra que las proteínas que poseen las actividades de tumstatina y CD137L pueden prepararse usando el sistema de expresión procariota para expresar las proteínas de fusión que comprenden los fragmentos activos de tumstatina y las regiones extracelulares de CD137L. Las proteínas recombinantes tumstatina-enlazador peptídico-CD 137L (proteínas que poseen las actividades tanto de tumstatina como de CD137L) preparadas de acuerdo con la presente invención tienen las ventajas de alta eficacia de expresión y nivel, ciclo de expresión corto, fácil purificación y otras. Paralelamente, la presente invención proporciona proteínas de fusión que podrían inhibir significativamente la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana de una manera dependiente de la dosis, y también podría estimular la proliferación de linfocitos T de ratón cooperando con el anticuerpo monoclonal anti CD3 y anti-CD28. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento novedoso y seguro para la producción a gran escala de proteínas de fusión que poseen las actividades de tumstatina y CD137L, y sienta una base sólida para la investigación y desarrollo en una nueva generación de fármacos contra el cáncer, y tiene una amplia aplicación en el tratamiento de pacientes con cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática que muestra las estructuras de las proteínas recombinantes que poseen las actividades de tumstatina y CD137L descritas en la presente invención. La secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico flexible se selecciona de una cualquiera del grupo de SEQ ID NO.69 a SEQ ID NO.76.

La Figura 2 es una vista esquemática que ilustra la ubicación de las secuencias de aminoácidos de CD137L1 (SEQ ID NO.77), CD137L5 (SEQ ID NO.78), CD137L6 (SEQ ID NO.79) y CD137L4 (SEQ ID NO.80) en la longitud completa de CD137L.

La Figura 3 muestra la expresión de las proteínas recombinantes tumstatina-enlazador peptídico-CD 13 7L en E. coli, cuyas secuencias de aminoácidos son de SEQ ID NO.25 a SEQ ID NO.48. Las calles 1-24 corresponden a las SEQ ID NO.25-48, respectivamente.

La figura 4 muestra la expresión representativa de las proteínas recombinantes tumstatina-enlazador peptídico-CD137L (SEQ ID NO.29 a SEQ ID NO.38) en Bacillus subtilis. Las calles 1-8 corresponden a las SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38, respectivamente.

La Figura 5 muestra la expresión representativa de las proteínas recombinantes Tumstatina-enlazador peptídico-CD137L (SEQ ID NO.29 a SEQ ID NO.36) en Pichia pastoris. Las calles 1-16 corresponden a las SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42, respectivamente.

La figura 6 es la SDS-PAGE de las muestras representativas renaturalizadas de Tumstatina-enlazador peptídico-CD137L por dilución. en los que, las secuencias de aminoácidos de la Calle 1-6 corresponden a la SEQ ID NO.25, 26, 27, 37, 38 y 41, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de las calles 7 y 10 corresponden a la SEQ ID NO.43; las secuencias de aminoácidos de las calles 8 y 11 corresponden a la SEQ ID NO.44; las secuencias de aminoácidos de las calles 9 y 12 corresponden a la SEQ ID NO.48; las secuencias de aminoácidos de las calles 13 y 15 corresponden a la SEQ ID NO.45; las secuencias de aminoácidos de las calles 14 y 16 corresponden a la SEQ ID NO.46; las secuencias de aminoácidos de las calles 17 y 18 corresponden a la

SEQ ID NO.47.

La figura 7 muestra los efectos de las muestras representativas de Tumstatina-enlazador peptídico-CD137L sobre la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana.

La figura 8 muestra los efectos de las muestras representativas de Tumstatina-enlazador peptídico-CD137L sobre la proliferación de linfocitos T de ratón.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

A continuación en el presente documento, la invención se explicará con más detalle por medio de los siguientes ejemplos y dibujos.

La presente invención proporciona 24 tipos de proteínas recombinantes bifuncionales que poseen actividades de Tumstatina y CD137L. Las secuencias de nucleótidos de estas proteínas se muestran de la SEQ ID NO.1 a la SEQ ID NO.24, y las secuencias de aminoácidos se muestran de la SEQ ID NO.25 a SEQ ID NO.48. Este grupo de proteínas se compone de un fragmento activo de tumstatina (tumstatina 1 contiene restos de aminoácidos de 45 a 98, tumstatina 2 contiene los restos de aminoácidos de 60 a 132, tumstatina 3 contiene los restos de aminoácidos de 60 a 98, tumstatina 7 contiene los restos de aminoácidos de 74 a 98), un dominio extracelular de CD137L (CD137L1 contiene los restos de aminoácidos de 46 a 254, CD137L4 contiene los restos de aminoácidos de 50 a 240, CD137L5 contiene los restos de aminoácidos de 83 a 254, CD137L6, un fragmento combinado, contiene los restos de aminoácidos de 46 a 85 y de 167 a 254), y un enlazador peptídico con cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO.69 a SEQ ID NO.76. En la presente invención, se diseñan dos sitios de enzimas de restricción que consisten en 5'-EcoRI y 3'-BamHI en las secuencias de nucleótidos (mostradas de SEQ ID NO.81 a SEQ ID NO.94) que contienen el fragmento activo de Tumstatina y el enlazador peptídico descrito anteriormente. Las secuencias se sintetizaron y se ligaron con el plásmido pBluescriptI SK (+) que contenía los mismos sitios de restricción de Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.

Todos los otros vectores de expresión se compraron de Novagen, y la cepa de E. coli Top 10 y BL21 (DE3) fueron de Invitrogen. El vector pMD18-T, la solución I (# D103A), la transcriptasa inversa, la ADN ligasa de T4, la endonucleasa de restricción, tal como, NdeI y NheI, se obtuvieron de TAKARA Bio. La síntesis de los cebadores y la secuenciación de nucleótidos fue completada por Shanghai Invitrogen Biotechnology Company. La urea (AR) utilizada para la desnaturalización y el repliegamiento de la dilución se adquirió de Nanjing Chemical Reagent Co., Ltd. Las células endoteliales de vena umbilical humana se adquirieron de Nanjing KGI Biological Technology Development Co., Ltd. El kit de selección negativa EasySep™ usado para el ensayo de proliferación de linfocitos T de ratón se adquirió de Stem Cell Company. El anticuerpo monoclonal anti-CD3 y anti-CD28 se adquirió de Santa Cruz Company. Otros reactivos fueron de grado analítico fabricados en China.

Ejemplo 1: La expresión de la proteína recombinante tumstatina-CD137L que posee actividades de tumstatina y CD137L en E. coli

1. Construcción de los sistemas de expresión

La presente invención proporciona 24 tipos de proteínas recombinantes bifuncionales que poseen actividades de Tumstatina y CD137L, que es una fusión de Tumstatina 1/Tumstatina 2/Tumstatina 3/Tumstatina 7 y CD137L1/CD137L4/CD137L5/CD137L6 mediante la combinación de un enlazador peptídico (Figura 1). en los que, CD137L1, CD137L4, CD137L5 y CD137L6 son los restos de aminoácidos 46-254, 50-240, 83-254, 46-85 más 167-254 del CD137L de longitud completa (Figura 2), respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de la proteína se muestran en las SEQ ID NO.1 a SEQ ID NO.24, las secuencias de aminoácidos se muestran de la SEQ ID NO.25 a la SEQ ID NO.48 y el enlace peptídico se selecciona de una de las secuencias de SEQ ID NO.69 a SEQ ID NO.76.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos del dominio extracelular de CD137 (CD137L1 contiene los restos de aminoácidos de 46 a 254, CD137L4 contiene los restos de aminoácidos de 50 a 240, CD137L5 contiene los restos de aminoácidos de 83 a 254, CD137L6, un fragmento combinado, contiene los restos de aminoácidos de 46 a 85 y de 167 a 254) se muestran de la SEQ ID NO.61 a SEQ ID NO.64, y se obtienen a partir de la amplificación por PCR. en los que, la secuencia de nucleótidos completa de CD137L podría obtenerse a través del procedimiento publicado (Wang Shuzhen, J Ind Microbiol Biotechnol.2012 Mar; 39(3):471-6, Doi: 10.1007/s10295-011-1045-1.).

Preparación del molde de CD137 usado en la presente invención empleando el procedimiento publicado descrito anteriormente. Usando el cebador aguas arriba de SEQ ID NO.61 (SEQ ID NO.95) y el cebador aguas abajo de SEQ ID NO.61 (SEQ ID NO.96) como cebadores, CD137L1 (SEQ ID NO. 61) (con dos sitios de restricción que consisten en 5'-BamHI y 3'-NotI) se obtuvo por amplificación por PCR con ADN polimerasa de rTaq y se ligó con el plásmido pMD18-T. Empleando los procedimientos tradicionales de biología molecular (tales como digestión enzimática y unión), el CD137L1 se cortó después del plásmido pMD18-T y se subclonó en el plásmido pBluescriptII SK (+), que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (SEQ ID NO. 87-SEQ ID NO.94) y fue sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd. A continuación, las secuencias de nucleótidos completas de la proteína de fusión (SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.12) se clonaron en el plásmido pBluescriptII SK (+). Utilizando la SEQ ID NO.97 como cebador aguas arriba y la SEQ ID NO.98 como cebador aguas abajo, los genes de las proteínas de

fusión con dos sitios de restricción que consisten en 5'-NheI y 3'-NdeI se amplificaron por PCR y se subclonaron en el vector de expresión pET-11a.

Preparación del molde de CD137L usado en la presente invención empleando el procedimiento publicado descrito anteriormente. Usando los cebadores aguas arriba de la SEQ ID NO.62 (SEQ ID NO.99) y el cebador aguas abajo de la SEQ ID NO.62 (SEQ ID NO.100) como cebadores, CD137L5 (SEQ ID NO. 62) (con dos sitios de restricción que consisten en 5'-BamHI y 3'-NotI) se obtuvo por amplificación por PCR con ADN polimerasa de rTaq y se ligó con el plásmido pMD18-T. Empleando los procedimientos tradicionales de biología molecular (tales como digestión enzimática y unión), el CD137L5 se cortó después del plásmido pMD18-T y se subclonó en el plásmido pBluescriptII SK (+), que contiene los genes de tumstatina y el enlazador peptídico (SEQ ID NO. 81-SEQ ID NO.96) y fue sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd. A continuación, las secuencias de nucleótidos completas de las proteínas de fusión (SEQ ID NO.1 a SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.13-SEQ ID NO.16) se clonaron en el plásmido pBluescriptII SK (+). Usando las SEQ ID NO.101-104 como cebadores aguas arriba y la SEQ ID NO.105 como cebadores aguas abajo, los genes de las proteínas de fusión con dos sitios de restricción que consisten en 5'-NheI y 3'-NdeI se amplificaron por PCR y se subclonaron en el vector de expresión pET-11a.

Preparación del molde de CD137L usado en la presente invención empleando el procedimiento publicado descrito anteriormente. Usando el cebador aguas arriba 1 de la SEQ ID NO.63 (SEQ ID NO.106) y el cebador aguas abajo 1 de la SEQ ID NO.63 (SEQ ID NO. 107), el cebador aguas arriba 2 de la SEQ ID NO.63 (SEQ ID NO.108) y el cebador aguas abajo 2 de la SEQ ID NO.63 (SEQ ID NO.109) como cebadores, se obtuvieron dos fragmentos de CD137L6 (SEQ ID NO. 63) por amplificación por PCR con ADN polimerasa de rTaq y se recuperaron del gel de agarosa. Empleando estos dos fragmentos como moldes, el cebador aguas arriba 1 de CD137L6 (SEQ ID NO. 107) y el cebador aguas abajo 2 de CD137L6 (SEQ ID NO. 109) como cebadores, CD137L6 (con dos sitios de restricción que consisten en 5'-BamHI y 3'-NotI) se obtuvo a través de la amplificación OverlapPCR y se ligó con el plásmido pMD18-T. El CD137L6 (SEQ ID NO. 63) se cortó a continuación del plásmido pMD18-T y se subclonó en el plásmido pBluescriptII SK (+), que contiene los genes de tumstatina y enlazador peptídico (SEQ ID NO.81, SEQ ID NO.82, SEQ ID NO.84 y SEQ ID NO.86) y fueron sintetizados por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd. Usando la SEQ ID NO.112-113 como cebador, los genes de las proteínas de fusión (SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.17 y SEQ ID NO.18) se obtuvieron por amplificación por PCR y se subclonaron en el vector de expresión pET-11a.

Todos los cebadores implicados en los procedimientos experimentales descritos anteriormente se enumeran de la siguiente manera: Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.61

5'-GGATCCGCCGCTCTTCTCGCCTGCC-3' (el sitio de restricción BamHI está subrayado) Cebador aguas abajo de la SEQ ID NO.61

5'-GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAGT-3' (el sitio de restricción NotI está subrayado) Cebador aguas arriba del gen de la proteína de fusión (SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.12)

5'-GCTAGCACAAATGCCATTCTTATTCTGCAATG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas abajo del gen de la proteína de fusión (SEQ ID NO.5-SEQ ID NO.12)

5'-CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAGTCCG-3' (el sitio de restricción NdeI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.62

5'-CGGGATCCGCCCTCTTGGACCTGCGCGGCAG-3' (el sitio de restricción BamHI está subrayado) Cebador aguas abajo de SEQ ID NO.62

5'-GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3' (el sitio de restricción NotI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.1

5'-GCTAGCGGTTTTTCTTTCTATTGTTCAAG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.3

5'-GCTAGCGGTTTTTCTTTCTATTGTTCAAG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.13-SEQ ID NO.14

5'-GCTAGCCAAGATTTAGGTACTTTGGGCTCTT-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.15-SEQ ID NO.16

5'-GCTAGCAAGAGCCCAAAGTACCTAAATCTTG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas abajo de SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, and SEQ ID NO.13-SEQ ID NO.16

5'-CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGAG-3' (el sitio de restricción NdeI está subrayado) cebador 1 aguas arriba de SEQ ID NO.63

5'-CGGGATCCGCCGCTCTTCTCGCCTGC-3' (el sitio de restricción BamHI está subrayado) cebador aguas abajo de SEQ ID NO.63

5'-CGCAAACATGCCCTGCCCTG-3' Cebador 2 aguas arriba de SEQ ID NO.63

5'-CAGGGCAGGGCATGTTTGCGGGTTCCAGGGCCGCTTGC-3' Cebador 2 aguas abajo de SEQ ID NO.63

5'-GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3' (el sitio de restricción NotI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.2 y SEQ ID NO.4

5'-GCTAGCGGTTTTTCTTTCTATTGTTCAAG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.17

5'-GCTAGCCAAGATTTAGGTACTTTG-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas arriba de SEQ ID NO.18

5'-GCTAGCCAAGATTTAGGTACTTTGGGCTCTT-3' (el sitio de restricción NheI está subrayado) Cebador aguas

abajo de SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.17 y SEQ ID NO.18

5'-CATAGTTCGACCTCGGTGAAGGGAG-3' (el sitio de restricción NdeI está subrayado) Las amplificaciones por PCR se realizaron usando las siguientes condiciones:

- 5 94 °C 5 min
 94 °C 1 min, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 ciclos
 72 °C 5 min
 4 °C, Retención

- 10 Después de recuperarse del gel, los productos de la PCR se ligaron con el plásmido pMD-18T en un volumen total de 20 µl que contenía 1 µl de pMD-18T, 4 µl de gen diana y 15 µl de solución. La unión se llevó a cabo a 16 °C durante 16 horas. La mezcla de unión se usó luego para transformar la cepa Top10 de E. coli mediante el procedimiento del cloruro de calcio. Después de cultivar en el medio de cultivo LB sólido con ampicilina durante 12 horas, se escogieron clones individuales. Los plásmidos extraídos se verificaron después mediante digestión enzimática doble con NdeI y NheI. Para determinar la corrección de las secuencias génicas, las colonias fueron secuenciadas por Shanghai Invitrogen Biotechnology Co. Los genes diana con las secuencias esperadas se ligaron con el vector de expresión procariota pET-11a, en el que el sistema de reacción contiene 1 µl de ligasa T4 10x tampón, 1 µl de pET-11a, 7 µl del gen diana y 1 µl de ligasa T4, y la ligadura se llevó a cabo a 16 °C durante 16 horas. Después de verificarse por digestión enzimática doble, el gen se transformó en el sistema de expresión E.coli BL21 (DE3).

2. La expresión de las proteínas recombinantes

- 20 Se inoculó 1 ml de E. coli BL21 (DE3) que llevaba un plásmido recombinante positivo a 100 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina en un banco súper limpio y se cultivó a 37 °C en un agitador de incubadora establecido a 250 rpm durante la noche. El caldo de siembra activado se transfirió a medio LB esterilizado, en el que se añadieron 100 µM de IPTG a una DO₆₀₀ de 0,9. Después, las células se recogieron mediante centrifugación (12.000 rpm, 30 minutos) a temperatura ambiente después de cultivar durante 8 h a 37 °C. Las muestras (1 g) se volvieron a suspender en 10 ml de PBS y se sometieron a lisis mediante sistemas de rotura celular de alta presión. 25 El lisado se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se descartó y el precipitado se analizó con SDS-PAGE.

El procedimiento de SDS-PAGE se describe de la siguiente manera:

- 30 1) Lavar la cantidad apropiada del precipitado con 1 ml de ddH₂O y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto. Después de descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió con 100 µl de ddH₂O.
 2) Mezclar 5 µl de 5 x tampón de carga SDS-PAGE con 20 µl de las muestras resuspendidas y calentarlas en agua hirviendo durante 5 minutos.
 3) Preparar el gel de apilamiento al 5 %, gel de separación al 12 % y tampón de carrera 1xTri-Gly de acuerdo con el "Molecular Cloning: A Laboratory Manual".
 35 4) Cargar 20 µl de las muestras preparadas en los pocillos. Ejecutar la electroforesis a 90 V durante 30 minutos y otra a 130 V durante 1 hora. Retirar el gel de SDS-PAGE y usar azul Coomassie para teñir durante 1-2 h. A continuación, el gel se lava tres veces con ddH₂O y se coloca en la solución de blanqueo durante la noche.
 5) Los resultados de la electroforesis de proteínas se muestran en dibujos complementarios. La expresión de las proteínas diana aumentó significativamente en las bacterias positivas en comparación con el control negativo.
 40 Las expresiones detalladas de las proteínas diana se muestran en la Figura 3. Se puede observar que todas las proteínas descritas anteriormente se expresaron en E. coli BL (DE3).

3. Purificación de las proteínas recombinantes

Investigación sobre la renaturalización de cuerpos de inclusión

- 45 Las células de bacterias se trituraron mediante sistemas de rotura celular de alta presión como se ha descrito anteriormente. Los precipitados se recogieron y se lavaron dos veces con la solución de lavado A y B por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos cada vez. La solución A consiste en Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, urea 2 M y 2 % de TritonX-100. La solución B consiste en Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, urea 2 M y EDTA 5 mM. Después del lavado, los precipitados se solubilizaron a 50 °C durante la noche con una solución de disolución (Tris 20 mM, pH 8,5, urea 8 M). Después de que se desnaturalizó por completo, la solución desnaturalizante se añadió a la solución de plegamiento mediante un aparato de flujo constante en una cabina de cromatografía a 4 °C, la solución se agitó al mismo tiempo y el proceso duró 12 horas. La solución de plegamiento consiste en Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, urea 2 M, L-Arg 0,4-0,6 M y EDTA 1 mM. La solución descrita anteriormente se sometió a ultrafiltración a 4.500 rpm durante 30 minutos usando unidades de concentración Amico Ultra-15 (Millipore) para concentrar a 1 ml a 4 °C. Al mismo tiempo, la solución se sustituyó en PBS (pH 7,4, 100 mM). El producto se conservó a 4 °C (Figura 6). Se 55 calculó que la pureza de los productos diana después de la renaturalización era mayor del 80 %, lo que indica que los cuerpos de inclusión desnaturalizados descritos anteriormente se volvieron a plegar bien.

Ejemplo 2: La expresión de las proteínas recombinantes tumstatina-CD137L que poseen actividades de

tumstatina y CD137L en *Bacillus subtilis*

1. Construcción del sistema de expresión

Usando el plásmido pBluescriptII SK (+) que alberga las secuencias génicas completas (SEQ ID NO.1-24) de las proteínas recombinantes construidas en el Ejemplo 1 como molde, amplificación por PCR de los diferentes genes de fusión con diferentes cebadores con PstI y HindIII en los extremos 5' y 3', respectivamente. Después de una doble digestión enzimática, los productos de PCR se subclonaron en el plásmido pP43. El procedimiento experimental para PCR, la digestión enzimática y la unión fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 1. El plásmido construido se transformó luego en *Bacillus subtilis* WB800 por electroporación (los procedimientos detallados se pueden encontrar en el manual de funcionamiento del instrumento de electroporación, Bio-Rad).

2. Expresión de la proteína recombinante

Cultivo de caldo de siembra: 10 µl de la cepa WB800 de *Bacillus subtilis* que alberga el gen diana que contiene el plásmido se incubaron en 5 ml de medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina en un banco súper limpio y se cultivaron a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm durante 12 horas. Fermentación del WB800 modificado: el caldo de semilla activado se transfirió al medio aséptico 2xYT que contenía 50 µg/ml de kanamicina con un volumen de inoculación del 10 % y se cultivó a 37 °C durante 96 horas, pH 7,0. Las células se recogieron por centrifugación a 4 °C y se analizaron mediante SDS-PAGE.

3. Purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico DEAE-sephadex (GE) con PBS, pH 8,5.

Ejemplo 3: La expresión de las proteínas recombinantes tumstatina-CD137L que poseen actividades de tumstatina y CD137L en *Pichia pastoris*

1. Construcción del sistema de expresión

Los genes (SEQ ID NO.1-24) de las proteínas recombinantes se obtuvieron por digestión enzimática doble del plásmido pPIC9K con EcoRI y NotI y se ligaron con el plásmido pPIC9K. El plásmido construido se transformó después en la cepa GS115 de *Pichia pastoris* por electroporación (los procedimientos detallados se pueden encontrar en el manual de funcionamiento del instrumento de electroporación, Bio-Rad).

2. Expresión de las proteínas recombinantes

P. pastoris se cultivó en primer lugar en medio BMGY rico y luego en medio BMMY para la inducción de la expresión de proteína diana. El primer día, las cepas modificadas por ingeniería construidas anteriormente se inocularon en medio de siembra YPD y se cultivaron a 37 °C durante la noche. El segundo día, se inoculó la cantidad apropiada de caldo de siembra se inoculó en medio BMGY y se cultivó durante 48 horas. Cuando el valor de la DO₆₀₀ alcanzó 10, el medio fue reemplazado por medio BMMY. Las cepas se cultivaron en medio BMMY durante 96 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm durante 30 minutos y se analizaron por SDS-PAGE.

3. Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de aniones DEAE-sephadex (GE) con PBS, pH 8,5. La pureza de los productos fue mayor que 80 %.

Ejemplo 4: Efectos de las proteínas recombinantes bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L sobre la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana

1) Cultivo celular: Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se cultivaron a 37 °C en humedad constante saturada con 5 % de CO₂ en medio RPMI1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin durante 2 ~ 3 días. Las células bajo crecimiento de fase exponencial se usaron para los siguientes experimentos.

2) ensayo MTT: Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 5.000 células por pocillo añadiendo 100 µl de suspensión celular a cada pocillo y se cultivaron en una incubadora de cultivo celular durante 12 horas. Después, se agregaron 100 µl de muestras de proteínas con diferentes concentraciones. Las HUVEC tratadas con TNP-470 se usaron como control positivo y se trataron con PBS como controles negativos. Las células se cultivaron por triplicado durante 48 horas. Después de iniciar los cultivos durante 44 horas, se añadieron 20 µl de MTT (5 mg/ml). A continuación, el medio se retiró suavemente a las 48 horas y se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo. Los precipitados azul-púrpura se disolvieron completamente después de agitar la placa de 96 pocillos durante 10 minutos. A continuación, se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm mediante un lector de microplacas.

Los resultados se muestran en la Figura 7, en la que, TNP-470 es el control positivo, "115" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L 5 (SEQ ID NO.25), "155" es tumstatina 1-enlazador peptídico 5-CD137L 5 (SEQ ID NO.27),

"116" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L6 (SEQ ID NO.26), "215" es tumstatina 2-enlazador peptídico 1-CD137L5 (SEQ ID NO.37), "255" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L5 (SEQ ID NO.38), "256" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L 6 (SEQ ID NO.41), "711" es tumstatina 7-enlazador peptídico 1-CD137L1 (SEQ ID NO.29), "721" es tumstatina 7-enlazador peptídico 2-CD137L1 (SEQ ID NO.30), "731" es tumstatina 7-enlazador peptídico 3-CD137L1 (SEQ ID NO.31), "741" es tumstatina 7-enlazador peptídico 4-CD137L1 (SEQ ID NO.32), "751" es tumstatina 7-enlazador peptídico 5-CD137L1 (SEQ ID NO.33), "761" es tumstatina 7-enlazador peptídico 6-CD137L1 (SEQ ID NO.34), "771" es tumstatina 7-enlazador peptídico 7-CD137L1 (SEQ ID NO.35), "781" es tumstatina 7-enlazador peptídico 8-CD137L1 (SEQ ID NO.36), "114" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.43), "214" es tumstatina 2-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.44), "314" es tumstatina 3-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.45), "154" es tumstatina 1-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.46), "254" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.47), "354" es tumstatina 3-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.48). Los resultados indicaron que estas proteínas recombinantes representativas que poseen actividades de tumstatina y CD137L podrían inhibir la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana, en las que las SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.41, SEQ ID NO.30 y SEQ ID NO.31 mostraron mejores efectos inhibidores que el control positivo.

Ejemplo 5: Efectos de las proteínas recombinantes bifuncionales que poseen las actividades de tumstatina y CD137L sobre la proliferación de linfocitos T de ratón

Los linfocitos T de ratón se purificaron a partir de suspensiones de células individuales de esplenocitos de ratón usando el kit EasySep Negative Selection Mouse T Cell Enrichment (Stemcell), de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Se sembraron en placas linfocitos T purificados a 10^5 por pocillo en 100 μ l de medio y se cultivaron en placas de 96 pocillos que se habían recubierto con anticuerpo monoclonal anti - CD3 a 7,5 μ g/ml durante la noche a 4 °C. Se diseñaron cuatro grupos: 1) Grupo en blanco sin ninguna estimulación (medio + linfocitos T); 2) el grupo de coestimulación en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD3 (7,5 μ g/ml) y anti-CD28 (2,5 μ g/ml) (CD3/CD28); 3) el grupo de coestimulación en presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD137, anti-CD3 y anti-CD28 (CD3/CD28/anti-CD137mAb); 4) el grupo de coestimulación en presencia de proteínas recombinantes, anticuerpo monoclonal anti-CD3 y anti-CD28 (CD3/CD28/Tumstatina 1-CD137L). Las células se cultivaron por triplicado durante 96 horas. Después de iniciar los cultivos durante 92 horas, se añadieron 10 μ l de azul de Alamar. Después, las absorbancias de cada pocillo a 570 nm y una longitud de onda de referencia de 600 nm se determinaron mediante un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 8, en la que "115" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L5 (SEQ ID NO.25), "155" es tumstatina 1-enlazador peptídico 5-CD137L5 (SEQ ID NO.27), "116" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L6 (SEQ ID NO.26), "215" es tumstatina 2-enlazador peptídico 1-CD137L5 (SEQ ID NO.37), "255" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L5 (SEQ ID NO.38), "256" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L6 (SEQ ID NO.41), "711" es tumstatina 7-enlazador peptídico 1-CD137L1 (SEQ ID NO.29), "721" es tumstatina 7-enlazador peptídico 2-CD137L1 (SEQ ID NO.30), "731" es tumstatina 7-enlazador peptídico 3-CD137L1 (SEQ ID NO.31), "741" es tumstatina 7-enlazador peptídico 4-CD137L1 (SEQ ID NO.32), "751" es tumstatina 7-enlazador peptídico 5-CD137L1 (SEQ ID NO.33), "761" es tumstatina 7-enlazador peptídico 6-CD137L1 (SEQ ID NO.34), "771" es tumstatina 7-enlazador peptídico 7-CD137L1 (SEQ ID NO.35), "781" es tumstatina 7-enlazador peptídico 8-CD137L1 (SEQ ID NO.36), "114" es tumstatina 1-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.43), "214" es tumstatina 2-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.44), "314" es tumstatina 3-enlazador peptídico 1-CD137L4 (SEQ ID NO.45), "154" es tumstatina 1-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.46), "254" es tumstatina 2-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.47), "354" es tumstatina 3-enlazador peptídico 5-CD137L4 (SEQ ID NO.48).

Los resultados sugirieron que estas proteínas recombinantes representativas que poseen las funciones de tumstatina y CD137L a una concentración final de 2 μ g/ml mostraron mayores efectos estimuladores sobre la proliferación de linfocitos T que el grupo coestimulante "CD3 más CD28", que demostró los efectos sinérgicos significativos entre CD137L y CD28. Por lo tanto, las proteínas recombinantes representativas que tienen las actividades de tumstatina y CD137L preparadas en la presente invención poseen buenas bioactividades en la estimulación de la proliferación de linfocitos T.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en este documento son solo para fines ilustrativos adicionales. Además, los ejemplos mostraron solo varios tipos de uniones entre diferentes fragmentos activos de tumstatina y las regiones extracelulares de CD137L.

Listado de secuencias

<110> China Pharmaceutical University
 <120> Proteína de fusión que tiene funciones dobles para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral y activar la respuesta inmunitaria adaptativa y el gen y el uso de la misma
 <130> U30692WOEP
 <140> PCT/CN2014/076768
 <141> 05/05/2014
 <150> CN201210162738.3, CN201310163407.1
 <151> 06/05/2013
 <150> CN201310163407.1

<151> 06/05/2013

<160> 113

<210> 1

<211> 729

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

10 <400> 1

```

ggttttttctt tcttatttgt tcaaggcaat cagcgtgctc atggacaaga tttggggact
cttggttcct gtctccagcg cttcaccaca atgccttttc tattctgcaa cgtcaatgac
gtatgtaact ttgcctcacg aaatgattat tcgtactggc tgggaggtgg tggatcaggt
ggaggtggat ctggtggagg tggaagtgga tccggcctct tggacctgcg gcagggcatg
tttgcgcagc tgggtggcca aaatgttctg ctgatcgatg ggcccctgag ctggtacagt
gacccagggc tggcaggcgt gtccctgacg gggggcctga gctacaaaga ggacacgaag
gagctggtgg tggccaaggc tggagtctac tatgtcttct ttcaactaga gctgcggcgc
gtggtggccg gcgagggctc aggctccgtt tcaattgcgc tgcacctgca gccactgcgc
tctgctgctg gggccgcccgc cctggctttg accgtggacc tgccaccgcg ctccctccgag
gctcggaaact cggccttcgg tttccagggc cgcttgctgc acctgagtgc cggccagcgc
ctgggcgtcc atcttcacac tgaggccagg gcacgccatg cctggcagct taccagggc
gccacagtct tgggactctt ccgggtgacc ccgaaatcc cagccggact cccttcaccg
aggtcggaa

```

<210> 2

<211> 597

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L6)

<400> 2

```

ggttttttctt tcttatttgt tcaaggcaat cagcgtgctc atggacaaga tttggggact
cttggttcct gtctccagcg cttcaccaca atgccttttc tattctgcaa cgtcaatgac
gtatgtaact ttgcctcacg aaatgattat tcgtactggc tgggaggtgg tggatcaggt
ggaggtggat ctggtggagg tggaagtgga tccggcctct tcctcgctct cccctgggccc
gtgtccgggg ctgcgcctc gccggcctcc gcggccagcc cgagactccg cgagggtccc
gagcttttcg cgcacgatcc cgccggcctc ttgctgcagc cactgcgctc tgctgctggg
gccgccgccc tggctttgac cgtggacctg ccaccgcct cctccgaggc tcggaactcg
gccttcggtt tccagggccg cttgctgcac ctgagtgccg gccagcgcct gggcgtccat
cttcacactg aggccagggc acgccatgcc tggcagctta cccagggcgc cacagtcttg
20 ggactcttcc gggtgacccc cgaaatccca gccggactcc cttcaccgag gtcggaa

```

<210> 3

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 3

ggtttttctt tcttatttgt tcaaggcaat cagcgtgctc atggacaaga tttggggact
cttgggttcct gtctccagcg cttcaccaca atgccttttc tattctgcaa cgtcaatgac

gtatgtaact ttgcctcacg aaatgattat tcgtactggc tggctgaagc tgctgcaaaa
gaagccgctg ctaaggaagc agctgccaag gaagccgctg ccaaggccgg atccggcctc
ttggacctgc ggcagggcat gtttgccgag ctgggtggcc aaaatgttct gctgatcgat
ggggccctga gctggtacag tgacccaggc ctggcagggc tgcctctgac ggggggctg
agctacaaaag aggacacgaa ggagctggtg gtggccaagg ctggagtcta ctatgtcttc
tttcaactag agctgcggcg cgtggtggcc ggcgagggct caggctccgt ttcacttgcg
ctgcacctgc agccactgcg ctctgctgct ggggccggcg ccctggcttt gaccgtggac
ctgccacccg cctcctccga ggctcggaac tcggccttcg gtttccaggg ccgcttgctg
cacctgagtg ccggccagcg cctgggcgtc catcttcaca ctgaggccag ggcacgccat
gcctggcagc ttacccaggg cgccacagtc ttgggactct tccgggtgac ccccgaaatc
ccagccggac tcccttcacc gaggtcggaa

<210> 4

<211> 618

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 4

ggtttttctt tcttatttgt tcaaggcaat cagcgtgctc atggacaaga tttggggact
cttgggttcct gtctccagcg cttcaccaca atgccttttc tattctgcaa cgtcaatgac
gtatgtaact ttgcctcacg aaatgattat tcgtactggc tggctgaagc tgctgcaaaa
gaagccgctg ctaaggaagc agctgccaag gaagccgctg ccaaggccgg atccggcctc
ttcctcgctt gcccctgggc cgtgtccggg gctcgcgcct cgcccggtc cgcgccagc
ccgagactcc gcgaggggtc cgagctttcg cccgacgac cgcgccgct cttgctgcag
ccactgcgct ctgctgctgg ggccgcccgc ctggctttga ccgtggacct gccaccgccc
tcctccgagg ctcggaactc ggcccttcggg ttccagggcc gcttgctgca cctgagtgcc
ggccagcgcc tgggcgtcca tcttcacact gaggccaggg cagccatgc ctggcagctt
accagggcg ccacagtctt gggactcttc cgggtgacct ccgaaatccc agccggactc
ccttcaccga ggtcggaa

<210> 5

<211> 747

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 1-CD137L1)

<400> 5

acaatgccat tcttatttctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tcgtaatgat
tattcatact ggctgggagg tgggtggatca ggtggagggt gatctggtgg aggtggaagt
gccgtcttcc tcgcctgccc ctgggcccgt tccggggctc gcgcctcgcc cggctccgcg
gccagcccga gactccgca ggtcccagag ctttcgccc acgatcccgc cggcctcttg
gacctgcggc agggcatgtt tgcgcagctg gtggcccaaa atgttctgct gatcgatggg
cccctgagct ggtacagtga cccaggcctg gcaggcgtgt ccctgacggg gggcctgagc
tacaaaagagg acacgaagga gctggtggtg gccaaggctg gagtctacta tgtcttcttt
caactagagc tgcggcgctt ggtggccggc gagggtcag gctccgtttc acttgcgctg
cacctgcagc cactgcgctc tgctgctggg gccgcccgc tggctttgac cgtggacctg
ccaccgcct cctccgaggc tcggaactcg gccttcgggt tccagggccg cttgctgcac
ctgagtgccg gccagcgctt gggcgtccat cttcacactg aggccagggc acgccatgcc
tggcagctta cccagggcgc cacagtcttg ggactcttcc gggtgacccc cgaaatccca
gccggactcc cttcaccgag gtcggaa

<210> 6

<211> 759

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 2-CD137L1)

<400> 6

5

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcatc tcgtaatgat
tattcatact ggctgggagg tggatggatca ggtggagggtg gatctgggtg aggtggatct
ggtggaggat ccgccgtctt cctcgccctgc ccctgggccg tgtccggggc tcgcgcctcg
cccggtccg cgccagccc gagactccgc gaggggtccc agctttcgcc cgacgatccc

gccggcctct tggacctgcg gcagggcatg tttgcgcagc tggatggccca aaatgttctg
ctgatcgatg ggcacctgag ctggtacagt gacctaggcc tggcaggcgt gtccctgacg
gggggcctga gctacaaaga ggacacgaag gagctgggtg tggccaaggc tggagtctac
tatgtcttct ttcaactaga gctgcggcgc gtggtggccg gcgagggctc aggctccgtt
tcacttgccg tgcacctgca gccactgcgc tctgctgctg gggccgccgc cctggctttg
accgtggacc tgccacccgc ctctccgag gctcggaact cggccttcgg tttccagggc
cgcttgctgc acctgagtgc cggccagcgc ctgggcgtcc atcttcacac tgaggccagg
gcacgccatg cctggcagct taccagggc gccacagtct tgggactctt ccgggtgacc
cccgaaatcc cagccggact cccttcaccg aggtcgga

```

<210> 7

<211> 735

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 3-CD137L1)

<400> 7

15

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcatc tcgtaatgat
tattcatact ggctgggagg tggatggatca ggtggagggtc ctggatccgc cgtcttctc
gcctgcccct ggccgtgtc cggggctcgc gcctcgcccg gctccgcggc cagcccagaga
ctccgcgagg gtcccgagct ttcccccgc gatcccgccg gcctcttgga cctgcggcag
ggcatgtttg cgcagctggg ggcacaaat gttctgctga tcgatgggccc cctgagctgg
tacagtgacc caggcctggc aggcgtgtcc ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac
acgaaggagc tggatggggc caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg
cggcgctggg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcgctgca cctgcagcca
ctgcgctctg ctgctggggc cgccgccctg gctttgaccg tggacctgcc accgcctcc
tccgaggctc ggaactcggc ctccggtttc cagggccgct tgctgcacct gagtgcggc
cagcgcttg gcgtccatct tcacactgag gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc
cagggcgcca cagtcttggg actcttcggg gtgacccccg aaatcccagc cggactccct
tcaccgaggt cgga

```

<210> 8

<211> 750

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 4-CD137L1)

<400> 8

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tcgtaaatgat
tattcatact ggctgggagg tgggtggatca ggtggagggtc ctggatcagg tggagggtgga
tccgccgtct tcctcgccctg cccctggggcc gtgtccgggg ctccgcgcctc gcccggtctc
gcggccagcc cgagactccg cgaggggtccc gagctttcgc ccgacgatcc cgcgggcctc
ttggacctgc ggcaggggcat gtttgcgcag ctgggtggccc aaaatgttct gctgatcgat
ggggccctga gctggtacag tgacccaggc ctggcaggcg tgtccctgac ggggggcctg
agctacaaag aggacacgaa ggagctggtg gtggccaagg ctggagtcta ctatgtcttc
tttcaactag agctgcggcg cgtggtggcc ggcgagggtc caggctccgt ttcacttgcg
ctgcacctgc agccactgcg ctctgctgct ggggccgccg ccctggcttt gaccgtggac
ctgccaccgg cctcctccga ggctcggaac tcggccttcg gtttccaggg ccgcttgctg
cacctgagtg ccggccagcg cctgggcgtc catcttcaca ctgaggccag ggacgccat
gcctggcagc ttacccaggg cgccacagtc ttgggactct tccgggtgac ccccgaaatc
ccagccggac tcccttcacc gaggtcgga

```

<210> 9

<211> 774

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 5-CD137L1)

<400> 9

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tcgtaaatgat
tattcatact ggctggctga agctgctgcc aaagaagccg ctgctaagga agcagctgcc
aagggaagccg ctgccaaaggc cggatccgcc gtcttcctcg cctgcccctg ggccgtgtcc
ggggctcgcg cctcgcccgg ctccgcggcc agcccgagac tccgcgaggg tcccagctt

```

```

tcgcccagcg atccccccgg cctcttgagg ctgcggcagg gcatgtttgc gcagctggtg
gccccaaatg ttctgctgat cgatggggccc ctgagctggt acagtgacct aggcctggca
ggcgtgtccc tgacgggggg cctgagctac aaagaggaca cgaaggagct ggtggtggcc
aaggctggag tctactatgt cttctttcaa ctagagctgc ggcgcgtggt ggccggcgag
ggctcaggct ccgtttcact tgcgctgcac ctgcagccac tgcgctctgc tgcgtgggccc
gccgccctgg ctttgacctg ggacctgcca cccgcctcct ccgaggctcg gaactcggcc
ttcggtttcc agggccgctt gctgcacctg agtgccggcc agcgctggg cgtccatctt
cacactgagg ccagggcacg ccatgcctgg cagcttacct agggcgccac agtcttggga
ctcttcgggg tgacccccga aatcccagcc ggactccctt caccgaggtc ggaa

```

<210> 10

<211> 789

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 6-CD137L1)

<400> 10

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tcgtaaatgat
tattcatact ggctggctga agctgctgcc aaagaagccg ctgctaagga agcagctgcc
aagggaagccg ctgccaaaggc cgctgcagcc aaggctggat ccgccgtctt cctcgccctgc
ccctggggccg tgtccggggc tcgcgcctcg cccggctccg cggccagccc gagactccgc
gaggggtccc agctttcgcg cgacgatccc gccggcctct tggacctgcg gcagggcatg
tttgcgcagc tgggtggcca aaatgttctg ctgatcgatg ggcccctgag ctggtacagt
gacccaggcc tggcaggcgt gtccctgacg gggggcctga gctacaaaga ggacacgaag
gagctggtgg tggccaaggc tggagtctac tatgtcttct ttcaactaga gctcgggcgc
gtggtggccc gcgagggtc aggctccgtt tccacttgcg tgcacctga gccactgcgc
tctgctgctg gggccggccc cctggccttg accgtggacc tgccaccgcg ctccctccgag
gctcggaact cggccttcgg tttccagggc cgcttgctgc acctgagtgc cggccagcgc
ctgggcgtcc atcttcacac tgaggccagg gcacgccatg cctggcagct taccaggggc
gccacagtct tgggactctt ccgggtgacc cccgaaatcc cagccggact cccttcaccg
aggtcggaa

```

<210> 11

<211> 759

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 7-CD137L1)

<400> 11

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tgcgaatgat
tattcatact ggctggctga agctgctgcc aaagaagccg ctgctaagga agcagctgcc
aaggctggat ccgccgtctt cctcgctgc ccctgggccc tgtccggggc tcgcgcctcg
cccggctccg cggccagccc gagactccgc gaggggtccc agctttcgcc cgacgatccc
gccggcctct tggacctgcg gcagggcatg tttgcgcagc tgggtggccc aaatgttctg
ctgatcgatg ggcccctgag ctggtacagt gacctaggcc tggcaggcgt gtccctgacg
gggggcctga gctacaaaga ggacacgaag gagctggtgg tggccaaggc tggagtctac
tatgtcttct ttcaactaga gctgcggcgc gtggtggccc gcgagggtc aggtccggtt
tcacttgccg tgcacctgca gccactgcgc tctgctgctg gggccgcgc cctggctttg
accgtggacc tgccaccgcg ctctccgag gctcggaact cggccttcg tttccagggc
cgcttgctgc acctgagtgc cggccagcgc ctgggctgct atcttcacac tgaggccagg
gcacgccatg cctggcagct taccagggc gccacagtct tgggactctt ccgggtgacc
cccgaatcc cagccggact cccttcaccg aggtcggaa

```

<210> 12

10 <211> 777

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 8-CD137L1)

<400> 12

```

acaatgccat tcttattctg caatgtcaat gatgtatgta attttgcac tgcgaatgat
tattcatact ggctggctga agctgctgcc aaagaagccg ctgctaagga agcagctgcc
aagggaagccg ctgccaaggc ccctggatcc gccgtcttcc tcgcctgccc ctgggcccgtg

```

```

tccgggggtc gcgcctcgcc cggctccgcg gccagcccga gactccgcga ggggtcccag
ctttcgcccg acgatccgcg cggcctcttg gacctgcggc agggcatgtt tgcgcagctg
gtggcccaaa atgttctgct gatcgatggg ccctgagct ggtacagtga cccaggcctg
gcaggcgtgt ccctgacggg gggcctgagc taaaaagagg acacgaagga gctggtggtg
gccaaggctg gagtctacta tgtcttcttt caactagagc tgcggcgcgt ggtggccggc
gagggctcag gctccgtttc acttgcgctg cactgcgctc tgcgtgctgg
gccgccgccc tggctttgac cgtggacctg ccaccgcct cctccgaggc tcggaactcg
gccttcggtt tccaggggccg cttgctgcac ctgagtgcg gccagcgcct gggcgtccat
cttcacactg aggccagggc acgccatgcc tggcagctta cccagggcgc cacagtcttg
ggactcttcc gggtgacccc cgaaatccca gccggactcc cttcaccgag gtcggaa

```

<210> 13

20 <211> 786

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

<400> 13

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcggtttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcggttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgaggggcccgcctatagccggaggtggtgga
tcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagtggatccggcctcttgacctgcccagggcatgtttgcgcagct
ggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccagggcctggcagggcgtgtccctga
cggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttcttcaa
ctagagctgcccgcgtggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctc
tgctgctggggccgcccctggctttgaccgtggacctgccaccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcg
gtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgcctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgc
catgcctggcagcttaccagggcgccacagctctgggactcttccgggtgacccccgaaatcccagccggactccc
ttcaccgaggtcggaa

<210> 14

<211> 807

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 14

Caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcggtttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcggttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgaggggcccgcctatagccgctgaagctgct
gccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaaggaagccgctgccaaaggccgcatccggcctcttgacctgcg
gcagggcatgtttgcgcagctggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccag
gcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctgga
gtctactatgtcttcttcaactagagctgcccgcgtggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgct
gcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccctggctttgaccgtggacctgccaccgcctcctccg
aggctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgcctgggctccatctt
cacactgaggccagggcacgcatgcctggcagcttaccagggcgccacagctcttgggactcttccgggtgacccc
cgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa

10

<210> 15

<211> 684

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

<400> 15

Caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcggtttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctaggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggag
gtggaagtggatccggcctcttgacctgcccagggcatgtttgcgcagctggtggcccaaatgttctgctgatc
gatgggcccctgagctggtacagtgaccagggcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagagga
cacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttcttcaactagagctgcccgcgtggtggccg
gcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccctggct
ttgaccgtggacctgccaccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgctgcacct

gagtgccggccagcgcctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgcatgcctggcagcttaccagggcg
ccacagctcttgggactcttccgggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa

20

<210> 16

<211> 705

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 16

caagat ttaggtact tttgggctcttgtcttcagcg ttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgcgaacgattattcatactggctagctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaag
cagctgccaaggaagccgctgccaaggccggatccggcctcttggacctgcggcagggcatgtttgcgacgtggtg
gccccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgacctcagcctggcagggcgtgtccctgacggg
gggctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactag
agctgcgggcgctggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgct
gctggggccgcccgcctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggttt
ccagggccgcttgcctgcacctgagtgccggccagcgctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgccatg
cctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttccgggtgacccccgaaatcccagccggactcccttca
ccgaggtcggaa

<210> 17

<211> 675

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 17

caagat ttaggtact tttgggctcttgtcttcagcg ttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgcgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcgcttagaaccttatatcagtcgggtgcacctatgtgaggggcccgtatagccgctgaagctgct
gccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaaagccgctgccaaggccggatccgcctcttccctcgctg
ccccctgggcccgtgtccggggctcgccctcgcccggctccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccagacttt
cgcccagcagatcccgcggcctcttgcctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccgcctggctttgaccgtg
gacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgcctgcacctgagtgccgg
ccagcgctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtct
tgggactcttccgggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa

<210> 18

<211> 573

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 18

caagat ttaggtact tttgggctcttgtcttcagcg ttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgcgaacgattattcatactggctagctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaag
cagctgccaaggaagccgctgccaaggccggatccggcctcttccctcgctgcccctgggcccgtgtccggggctcgc
gcctcgcccggctccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccagctttcgcccagcagatcccgcggcctctt
gctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccgcctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgagg
ctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgcctgcacctgagtgccggccagcgctgggctccatcttcac
actgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttccgggtgacccccga
aatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa

<210> 19

<211> 786

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee
las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 19

ggtttttctttcttatttgttcaaggcaatcagcgtgctcatggacaagatttggggactcttggttcctgtctcca

gcgcttcaccacaatgccttttctattctgcaacgtcaatgacgtatgtaactttgcctcacgaaatgattattcgt
actggctgggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagtggatccgcctgcccctgggcccgtg
tccggggctcgccgctcgcccggctccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccagctttcgcccgcagatcc
cgccggcctcttggacctgcggcagggcatgtttgcgcagctggtggccaaaatgttctgctgatcgatgggccc
tgagctggtacagtgacccaggcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggag
ctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttcttcaactagagctgcggcgctggtggccggcgagggctc
aggctccgtttcacttgcgtgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccctggctttgacctgg
acctgccacccgctcctccgaggtcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgcggc
cagcgcctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagctct
gggactcttccgggtg

<210> 20

<211> 843

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 20

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcgttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgagggggccgctatagccggaggtggtgga
tcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagtggatccgcctgcccctgggcccgtgtccggggctcgccgctcgcc
cggtccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccagctttcgcccgcagatccgcgggcctcttggacctgc
ggcagggcatgtttgcgcagctggtggccaaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccca
ggcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctgg
agtctactatgtcttcttcaactagagctgcggcgctggtggccggcgagggctcaggtccgtttcacttgcgc
tgacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccctggctttgacctggacctgccacccgcctcctcc
gaggtcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgcgggccagcgccctgggctccatct
tcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagctcttgggactcttccgggtg

10

<210> 21

<211> 741

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 21

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctaggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggag
gtggaagtggatccgcctgcccctgggcccgtgtccggggctcgccgctcgcccggctccgcggccagcccagactc
cgcgaggggtcccagctttcgcccgcagatccgcgggcctcttggacctgcggcagggcatgtttgcgcagctggt
ggccaaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccaggcctggcagggcgtgtccctgacgg
gggcccctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttcttcaacta
gagctgcggcgctggtggccggcgagggctcaggtccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgc
tgctggggccgcccctggctttgacctggacctgccacccgcctcctccgaggtcggaactcggccttcggtt
tccagggccgcttgctgcacctgagtgcgggccagcgccctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgccat
gcctggcagcttaccagggcgccacagctcttgggactcttccgggtg

20

<210> 22

<211> 807

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 22

gggtttttctttcttattttgttcaaggcaatcagcgtgctcatggacaagatttggggactcttggttctgtctcca
gagcttcaccacaatgcctttttctattctgcaacgtcaatgacgtatgtaactttgcctcacgaaatgattattcgt
actggctggctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccgga
tccgcctgcccctgggccgtgtccggggctcgccctcgcccgctccgcccagcccgagactccgcgaggggtcc
cgagctttcgcccgacgatcccgccggcctcttgacgtgctggcagggcatgtttgagcagctggtggcccaaatg
ttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgacccaggcctggcagggctgtccctgacggggggcctgagc
tacaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcccgcg
cgtggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgtgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccg

ccgcccctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcgcccttcggtttccagggccgc
ttgctgcacctgagtgccggccagcgctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagct
taccagggcgccacagtcttgggactcttcgggtg

<210> 23

<211> 864

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 23

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcgttagaaccttatatcagtcgggtgcaccgtatgtgagggggccgctatagccgctgaagctgct
gccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccggatccgcctgcccctgggccgt
gtccggggctcgccctcgcccggtccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccgagctttcgcccgacgatc
ccgcgggcctcttgacctgcggcagggcatgtttgagcagctggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggccc
ctgagctggtacagtgacccaggcctggcagggctgtccctgacggggggcctgagctacaagaggacacgaagga
gctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcccgcgctggtggccggcgagggct
caggctccgtttcacttgcgtgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccgcctggctttgaccgtg
gacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcgcccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccgg
ccagcgctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtct
tgggactcttcgggtg

10

<210> 24

<211> 762

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Un gen que codifica una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 24

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctagctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaag
cagctgccaaggaagccgctgccaaggccggatccgcctgcccctgggccgtgtccggggctcgccctcgcccggc
tccgcggccagcccagactccgcgaggggtcccgagctttcgcccgacgatccgcgggcctcttgacctgcggca
gggcatgtttgcgcagctggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccaggcc
tggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtc
tactatgtcttctttcaactagagctgcggcgctggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgtgca
cctgcagccactgcgtctgctgctggggccgcccgcctggctttgacctggacctgccacccgcctcctccgagg
ctcggaactcgcccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgctgggctccatcttcac
actgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttcgggtg

20

<210> 25

<211> 243

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

<400> 25

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

<210> 26
<211> 197
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L6)
<400> 26

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

<210> 27

<211> 250

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 27

Gly	Phe	Ser	Phe	Leu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Gln	Arg	Ala	His	Gly	Gln
1				5					10					15	
Asp	Leu	Gly	Thr	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Gln	Arg	Phe	Thr	Thr	Met	Pro

10

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

<210> 28

<211> 204

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 28

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

<210> 29

<211> 249

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 1-CD137L1)

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 253

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de
tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 2-CD137L1)

<400> 30

```

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

```

		115					120				125				
Thr	Lys	Glu	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Val	Phe	Phe
	130					135					140				
Gln	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Val
145					150					155					160
Ser	Leu	Ala	Leu	His	Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala
				165					170					175	
Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg
			180					185					190		
Asn	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Gly
	195					200					205				
Gln	Arg	Leu	Gly	Val	His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala
210					215					220					
Trp	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Thr
225				230					235						240
Pro	Glu	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Glu			
				245					250					255	

<210> 31

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 3-CD137L1)

<400> 31

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

<210> 32

<211> 250

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 4-CD137L1)

<400> 32

```

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

```

5

<210> 33

<211> 258

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 5-CD137L1)

<400> 33

10

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

<210> 34

<211> 263

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 6-CD137L1)

<400> 34

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

<210> 35

<211> 253

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 7-CD137L1)

<400> 35

ES 2 686 968 T3

```

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

```

<210> 36

<211> 259

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (tumstatina 7-Enlazador peptídico 8-CD137L1)

<400> 36

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

<210> 37

<211> 262

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

<400> 37

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

<210> 38

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 38

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

10

```

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

```

<210> 39

<211> 228

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 1-CD137L5)

<400> 39

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

<210> 40

<211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L5)

<400> 40

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

<210> 41

<211> 225

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 41

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

10

Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly
				85					90					95	
Ser	Ala	Val	Phe	Leu	Ala	Cys	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Gly	Ala	Arg	Ala
			100					105					110		
Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu
		115					120					125			
Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala
	130					135					140				
Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser
145					150					155					160
Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His
			165					170						175	
Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val	His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg
			180				185						190		
Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu
		195				200						205			
Phe	Arg	Val	Thr	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser
	210					215					220				
Glu															
225					230					235					240

<210> 42

<211> 191

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L6)

<400> 42

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

<210> 43

<211> 263

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 43

```

Met Gly Phe Ser Phe Leu Phe Val Gln Gly Asn Gln Arg Ala His Gly
1      5      10      15
Gln Asp Leu Gly Thr Leu Gly Ser Cys Leu Gln Arg Phe Thr Thr Met

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

```

<210> 44

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 44

```

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

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
195     200     205
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
210     215     220
Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
225     230     235     240
Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
245     250     255
His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
260     265     270
Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
275     280

```

<210> 45

<211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 1-CD137L4)

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 270

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 1-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 46

```

Met Gly Phe Ser Phe Leu Phe Val Gln Gly Asn Gln Arg Ala His Gly
1      5      10      15
Gln Asp Leu Gly Thr Leu Gly Ser Cys Leu Gln Arg Phe Thr Thr Met
10

```

ES 2 686 968 T3

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

<210> 47

<211> 289

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 2-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 47

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

Phe	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	His	Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly
	210					215					220				
Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu
225					230					235					240
Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser
				245					250					255	
Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val	His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg
			260					265					270		
His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg
		275					280					285			

Val

<210> 48

<211> 255

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5-CD137L4)

<400> 48

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

<210> 49
 <211> 162
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tumstatina 1
 <400> 49

ggttttttctttcttattttgttcaaggcaatcagcgtgctcatggacaagatttggggactcttggttcctgtctcca
 gcgcttcaccacaatgcctttttctattctgcaacgtcaatgacgtatgtaactttgcctcacgaaatgattattcgt
 actggctg

<210> 50
 <211> 219
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tumstatina 2
 <400> 50

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
 ctgtaatttcgcttcccgcaacgattattcactactggctatcgacgcccgccctgatgccaatgaatattggcaccga
 ttactggacgagcgttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgaggggcccgctatagcc

<210> 51
 <211> 117
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Tumstatina 3
 <400> 51

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgcgaacgattattcatactggcta

5 <210> 52
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Tumstatina 7
<400> 52
acaatgccattcttattctgcaatgtcaatgatgtatgtaatttgcactcgtaatgattattcatactggctg
10 <210> 53
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Enlazador peptídico 1
<400> 53
ggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagt
<210> 54
<211> 51
20 **<212> ADN**
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador peptídico 2
<400> 54
25 ggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctggtgga
<210> 55
<211> 27
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador peptídico 3
<400> 55
ggaggtggtggatcaggtggaggtcct
35 <210> 56
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador peptídico 4
40 <400> 56
ggaggtggtggatcaggtggaggtcctggatcaggtggaggt
<210> 57
<211> 66
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Enlazador peptídico 5
<400> 57
gctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggcc
50 <210> 58
<211> 81
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Enlazador peptídico 6
<400> 58

gctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccgctgcagccaa
ggct

60 <210> 59
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico 7
 <400> 59
 gctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggct
 5 <210> 60
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Enlazador peptídico 8
 <400> 60
 gctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccct
 <210> 61
 <211> 627
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD137L1
 <400> 61
 gccgtcttcctcgccctgccctgggccgtgtccggggctcgcgccctcgcccggctccgcgggccagcccagactccg
 cgaggggtcccagactttcgcccgacgatcccgccggcctcttgacactcgggcagggcatgtttgcgagctggtgg
 cccaaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgacccaggcctggcagggcgtgtccctgacgggg
 ggccctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactaga
 gctgcggcgcggtggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctg
 ctggggccgcccctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttc
 cagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgccctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgc
 ctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttcggggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcac
 20 cgaggtcggaa
 <210> 62
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CD137L5
 <400> 62
 ggccctcttgacactcgggcagggcatgtttgcgagctggtggccaaaatgttctgctgatcgatgggcccctgag
 ctggtacagtgacccaggcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctgg
 tggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcggcgcggtggtggccggcgagggctcagggc
 tccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctggtggggccgcccctggctttgaccgtggacct
 gccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttcagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagc
 gcctgggcgtccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtcttggga
 ctcttcggggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa
 <210> 63
 30 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD137L6
 35 <400> 63
 gccgtcttcctcgccctgccctgggccgtgtccggggctcgcgccctcgcccggctccgcgggccagcccagactccg
 cgaggggtcccagactttcgcccgacgatcccgccggcctcttgctgcagccactgcgctctgctgctggggccgccc
 ccctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttcagggccgcttg
 ctgcacctgagtgccggccagcgccctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttac
 ccagggcgccacagtcttgggactcttcggggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaa
 <210> 64
 <211> 573
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD137L4

<400> 64

gcctgccccctgggcccgtgtccggggctcgcgccctcgcccggctccgcggccagcccagagactccgcgaggggtcccga
gcttttcgcccgcagatcccgcgggctcttggacctgcggcagggcatgtttgcgcagctgggtggccaaaatgttc
tgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgacccaggcctggcagggcgtgtccctgacggggggcctgagctac
aaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcggcgcgct
ggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgccc
ccctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttg
ctgcacctgagtgccggccagcgctggcgctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttac
ccagggcgccacagtcttgggactcttccgggtg

<210> 65

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tumstatina 1

<400> 65

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

<210> 66

<211> 73

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tumstatina 2

<400> 66

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

<210> 67

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tumstatina 3

<400> 67

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

<210> 68

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Tumstatina 7
 <400> 68

 Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
 20 25 30

 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico 1
 <400> 69

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador peptídico 2
 <400> 70

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly
 20 25 30

 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico 3
 30 <400> 71

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro
 1 5 10 15

 <210> 72
 <211> 14
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico 4
 <400> 72

 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Pro Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 40 <210> 73
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Enlazador peptídico 5
 <400> 73

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20

<210> 74

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Enlazador peptídico 6

<400> 74

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Ala
20 25

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Enlazador peptídico 7

<400> 75

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 76

 $\langle 211 \rangle$ 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Enlazador peptídico 8

<400> 76

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Pro
20 25 30

<210> 77

<211> 209

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> CD137L1

<400> 77

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

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
165 170 175
Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
180 185 190
Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
195 200 205
Glu
210 215 220

<210> 78
<211> 172
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> CD137L5
<400> 78

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

10 <210> 79
<211> 128

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD137L6
 <400> 79

5

```

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

<210> 80
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CD137L4
 <400> 80

10

```

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

<210> 81
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 1-

15

20

ES 2 686 968 T3

Enlazador peptídico 1) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 81

gggtttttctttcttattttgttcaaggcaatcagcgtgctcatggacaagatttggggactcttggttcctgtctcca
gcgcttcaccacaatgccttttctattctgcaacgtcaatgacgtatgtaactttgcctcacgaaatgattattcgt
actggctgggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagt

5 <210> 82
<211> 228
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

10 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 5-
Enlazador peptídico 1) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 82

gggtttttctttcttattttgttcaaggcaatcagcgtgctcatggacaagatttggggactcttggttcctgtctcca
gcgcttcaccacaatgccttttctattctgcaacgtcaatgacgtatgtaactttgcctcacgaaatgattattcgt
actggctggctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggcc

15 <210> 83
<211> 264
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 2-
Enlazador peptídico 1) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 83

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcgttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgagggggcccgctatagccggaggtggtgga
tcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagt

25 <210> 84
<211> 285
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 2-
Enlazador peptídico 5) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 84

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctatcgacgcccgcctgatgccaatgaatatggcaccga
ttactggacgagcgttagaaccttatatcagtcggtgcaccgtatgtgagggggcccgctatagccgctgaagctgct
gccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggcc

30 <210> 85
<211> 162
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

35 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 3-
Enlazador peptídico 1) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 85

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcatactggctaggaggtggtggatcaggtggaggtggatctggtggag
gtggaagt

40 <210> 86
<211> 183
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 3-Enlazador peptídico 5) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 86

caagatttaggtactttgggctcttgtcttcagcgcttttaccacaatgcctttcctcttttgcaatgttaacgacgt
ctgtaatttcgcttcccgaacgattattcactactggctagctgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaag
cagctgccaaggaagccgctgccaaggcc

5 <210> 87
<211> 120
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

10 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 1) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 87

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcactactggctggg
agtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggaagt

15 <210> 88
<211> 126
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

20 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 2) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 88

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcactactggctggg

agtggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctggtgga

25 <210> 89
<211> 102
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

30 <223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 3) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 89

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcactactggctggg
agtggtggatcaggtggaggtcct

35 <210> 90
<211> 117
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 4) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 90

40 acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcactactggctggg
agtggtggatcaggtggaggtcctggatcaggtggaggt

45 <210> 91
<211> 141
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 5) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.
<400> 91

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcatactggctggc
tgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggcc

<210> 92

<211> 156

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 6) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.

<400> 92

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcatactggctggc
tgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccgctgcagccaagg
ct

<210> 93

<211> 126

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 7-Enlazador peptídico 7) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.

<400> 93

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcatactggctggc
tgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggct

<210> 94

<211> 144

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia de nucleótidos que contiene el gen de tumstatina y el enlazador peptídico (Tumstatina 8-Enlazador peptídico 7) sintetizado por Shanghai Generay Biological Engineering CO. Ltd.

<400> 94

acaatgccattcttatttctgcaatgtcaatgatgtatgtaattttgcatctcgtaatgattattcatactggctggc
tgaagctgctgccaagaagccgctgctaaggaagcagctgccaaggaagccgctgccaaggccct

<210> 95

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador aguas arriba de SEQ ID NO. 49

<400> 95

5'-GGATCCGCGTCTTCCTCGCCTGCC-3'

<210> 96

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador aguas abajo de SEQ ID NO. 49

<400> 96

5'-GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAGT-3'

<210> 97

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador aguas arriba del gen de fusión (SEQ ID NO.5- SEQ ID NO.12)

<400> 97

5'-CGCTAGCACAAATGCCATTCTTATTCTGCAATG-3'

<210> 98

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas abajo del gen de fusión (SEQ ID NO.5- SEQ ID NO.12)
 <400> 98
 5 5_i⁻CCATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAGTCCG-3_i⁻
 <210> 99
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de SEQ ID NO. 50
 <400> 99
 5_i⁻CGGGATCCGCCTCTTGGACCTGCGGCAG-3_i⁻
 <210> 100
 15 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas abajo de SEQ ID NO. 50
 20 <400> 100
 5_i⁻GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3_i⁻
 <210> 101
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.1
 <400> 101
 5_i⁻GCTAGCGGTTTTCTTTCTTATTTGTTCAAG-3_i⁻
 30 <210> 102
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.3
 <400> 102
 5_i⁻GCTAGCGGTTTTCTTTCTTATTTGTTCAAG-3_i⁻
 <210> 103
 <211> 31
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.13- SEQ ID NO.14
 <400> 103
 45 5_i⁻GCTAGCCAAGATTAGGTACTTTGGGCTCTT-3_i⁻
 <210> 104
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.15- SEQ ID NO.16
 <400> 104
 5_i⁻GCTAGCAAGAGCCCAAAGTACCTAAATCTTG-3_i⁻
 <210> 105
 55 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas abajo de la SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.13- SEQ ID NO.16
 60 <400> 105
 5_i⁻CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3_i⁻
 <210> 106
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 1 aguas arriba de la SEQ ID NO.51
 <400> 106
 5 5j⁻-CGGGATCCGCCGTCTTCCTCGCCTGC-3j⁻
 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador aguas abajo 1 de la SEQ ID NO.51
 <400> 107
 5j⁻-CGCAAACATGCCCTGCCCTG-3j⁻
 <210> 108
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 2 aguas arriba de la SEQ ID NO.51
 20 <400> 108
 5j⁻-CAGGGCAGGGCATGTTTGCGGGTTTCCAGGGCCGCTTGC-3j⁻
 <210> 109
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas abajo 2 de la SEQ ID NO.51
 <400> 109
 5j⁻-GCGGCCGCTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3j⁻
 30 <210> 110
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223>Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.2- SEQ ID NO.4
 <400> 110
 5j⁻-GCTAGCGGTTTTCTTTCTTATTTGTTCAAG-3j⁻
 <210> 111
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.17
 <400> 111
 45 5j⁻-GCTAGCCAAGATTAGGTACTTTG-3j⁻
 <210> 112
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador aguas arriba de la SEQ ID NO.18
 <400> 112
 5j⁻-GCTAGCCAAGATTAGGTACTTTGGGCTCTT-3j⁻
 <210> 113
 55 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas abajo de la SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.17 y SEQ ID NO.18
 60 <400> 113
 5j⁻-CATATGTTCCGACCTCGGTGAAGGGAG-3j⁻

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L, **caracterizada porque** la proteína comprende las secuencias de aminoácidos de los fragmentos activos de tumstatina y la región extracelular de CD137L, en la que las secuencias de tumstatina y CD137L se fusionan a través de un enlazador peptídico flexible, en la que la secuencia de aminoácidos del fragmento activo de tumstatina se selecciona de la SEQ ID NO.65 a la SEQ ID NO.68, en la que la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico se selecciona de la SEQ ID NO.69 a la SEQ ID NO.76, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137L se selecciona de la SEQ ID NO.77 a la SEQ ID NO.80.
2. Una proteína recombinante bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la proteína contiene la secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO.25 a SEQ ID NO.48.
3. Un gen que codifica la proteína recombinante bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen comprende el gen que codifica el fragmento activo de tumstatina, el enlazador peptídico y la región extracelular de CD137L, en el que el gen que codifica el fragmento activo de tumstatina se selecciona de la SEQ ID NO.49 a la SEQ ID NO.52, en el que el gen que codifica el enlazador peptídico se selecciona de la SEQ ID NO.53 a la SEQ ID NO.60, en el que el gen que codifica la región extracelular de CD137L se selecciona de la SEQ ID NO.61 a la SEQ ID NO.64.
4. Un gen que codifica la proteína recombinante bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el gen contiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de la SEQ ID NO.1 a la SEQ ID NO.24.
5. Un gen que codifica la proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L, caracterizado porque tiene una homología del 70 % o superior en comparación con la secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.
6. Un procedimiento de preparación para la proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el procedimiento incluye las siguientes etapas:
 - (1) Diseñar y obtener una secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5;
 - (2) Construir un sistema de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que incluye construir el vector de expresión y transformar el vector de expresión en una célula huésped para formar una célula recombinante que puede expresar la proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L de acuerdo con la reivindicación 1;
 - (3) Cultivar la célula recombinante obtenida de la etapa (2);
 - (4) Aislar y purificar la proteína recombinante bifuncional que posee las actividades de tumstatina y CD137L de acuerdo con la reivindicación 1.
7. Un procedimiento de preparación de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque el sistema de expresión es un sistema de expresión procariota o un sistema de expresión eucariota, en el que el sistema de expresión procariota se selecciona de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, en el que el sistema de expresión eucariota se selecciona de levadura.
8. La proteína recombinante bifuncional de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de inhibición de la angiogénesis en el microambiente tumoral, tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con tumores, regulación de la inmunidad corporal, estimulación de la proliferación de linfocitos T y síntesis y secreción de citocinas.

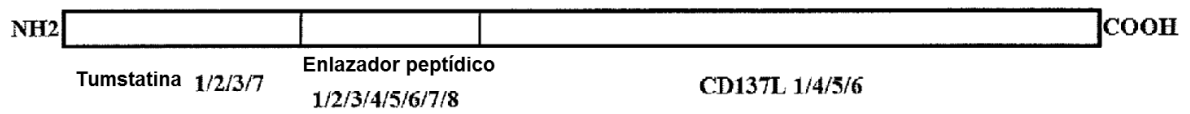


Figura 1



Figura 2

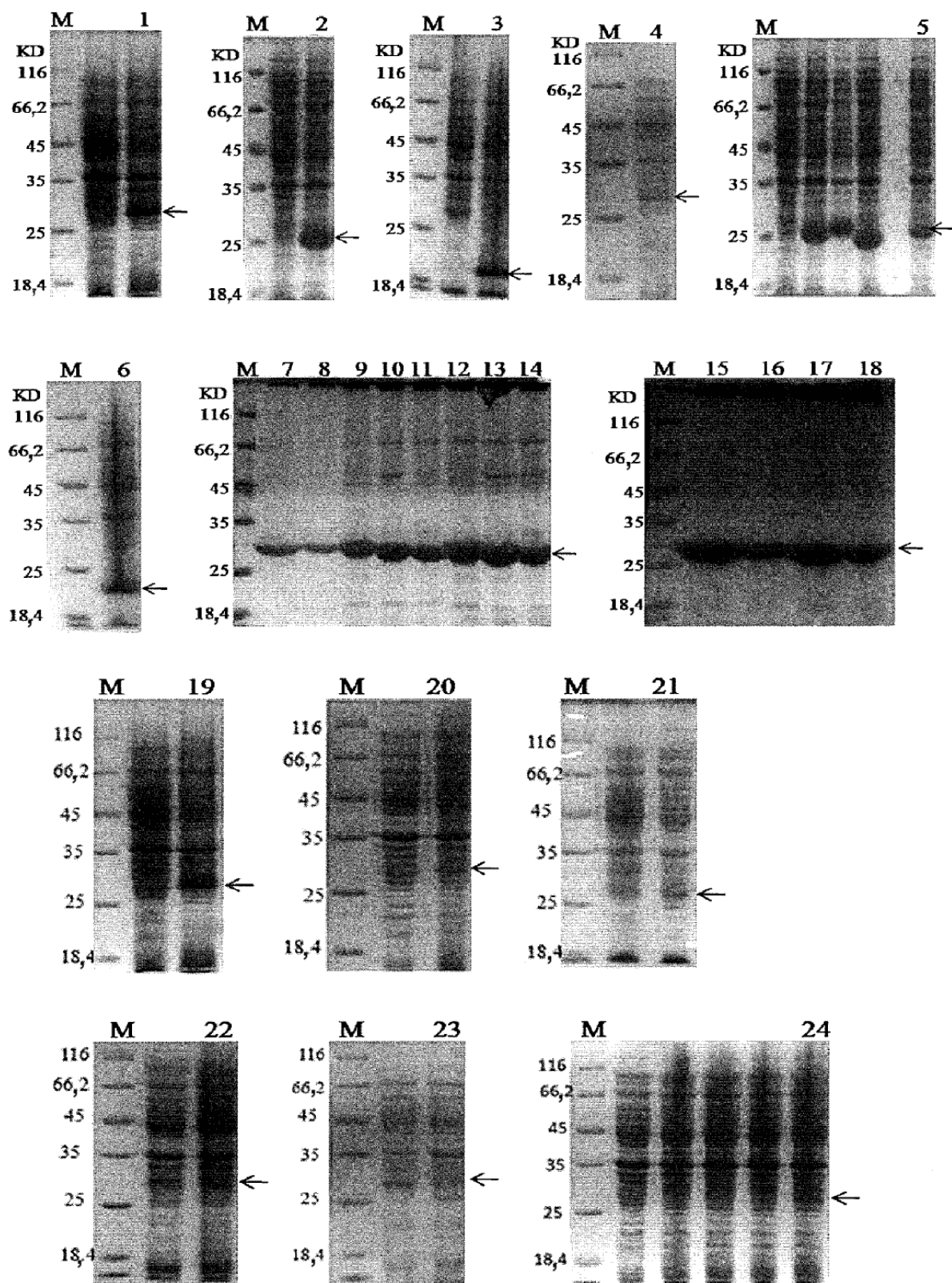


Figura 3

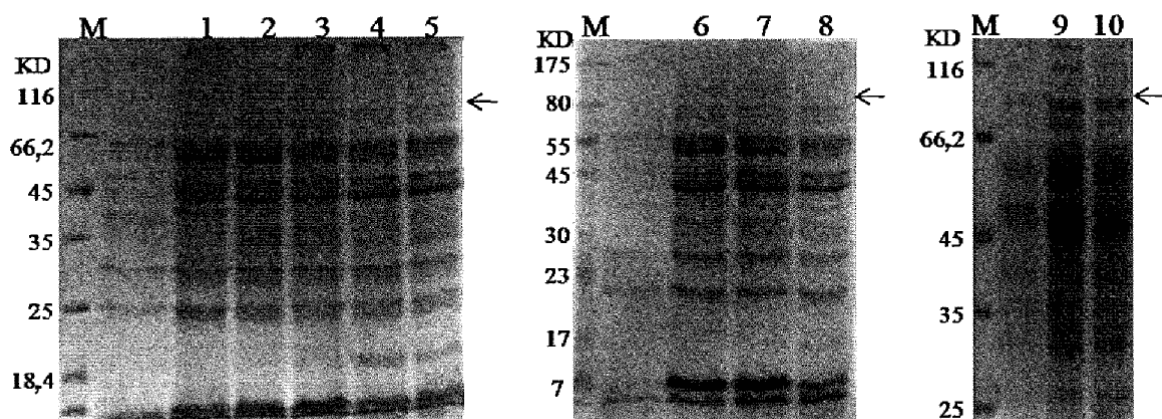


Figura 4

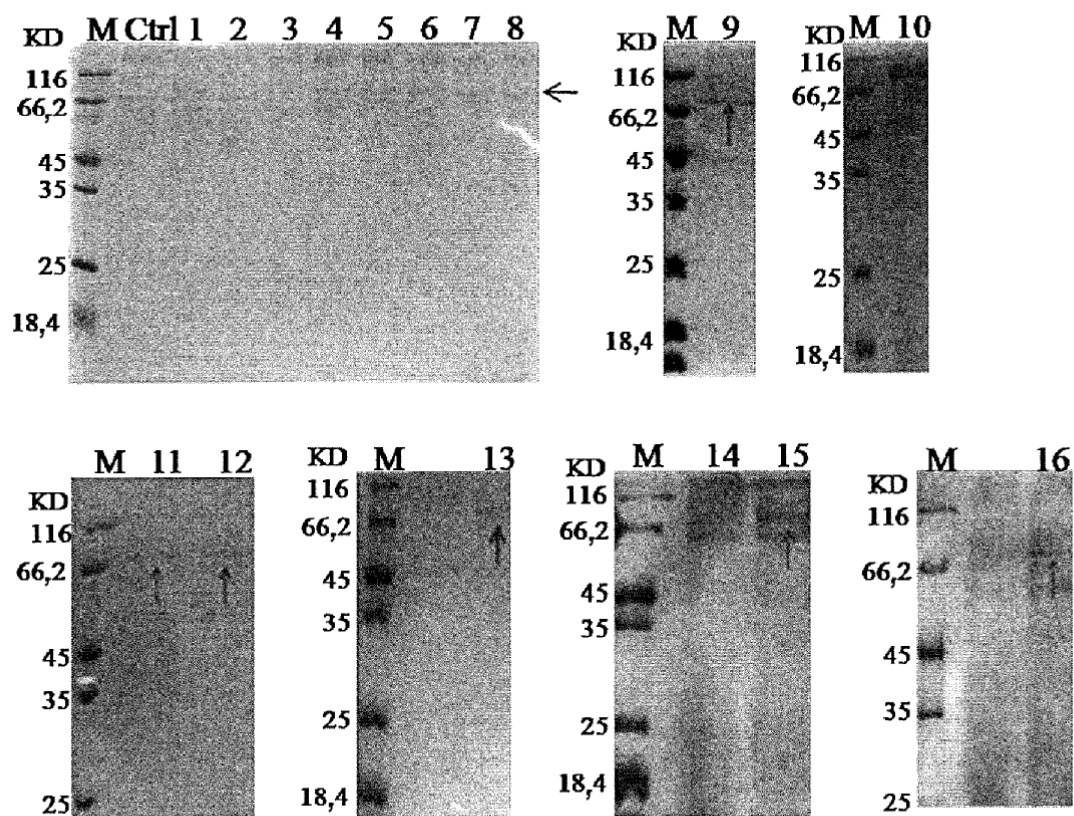


Figura 5

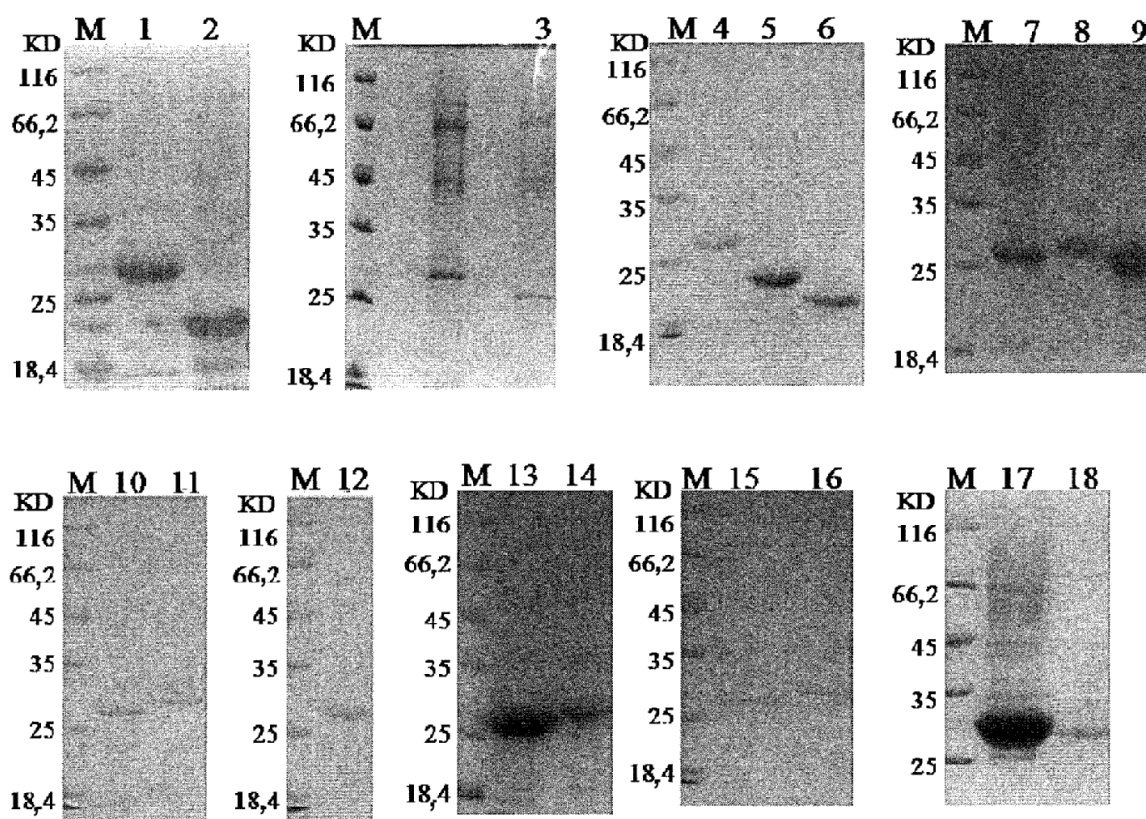


Figura 6

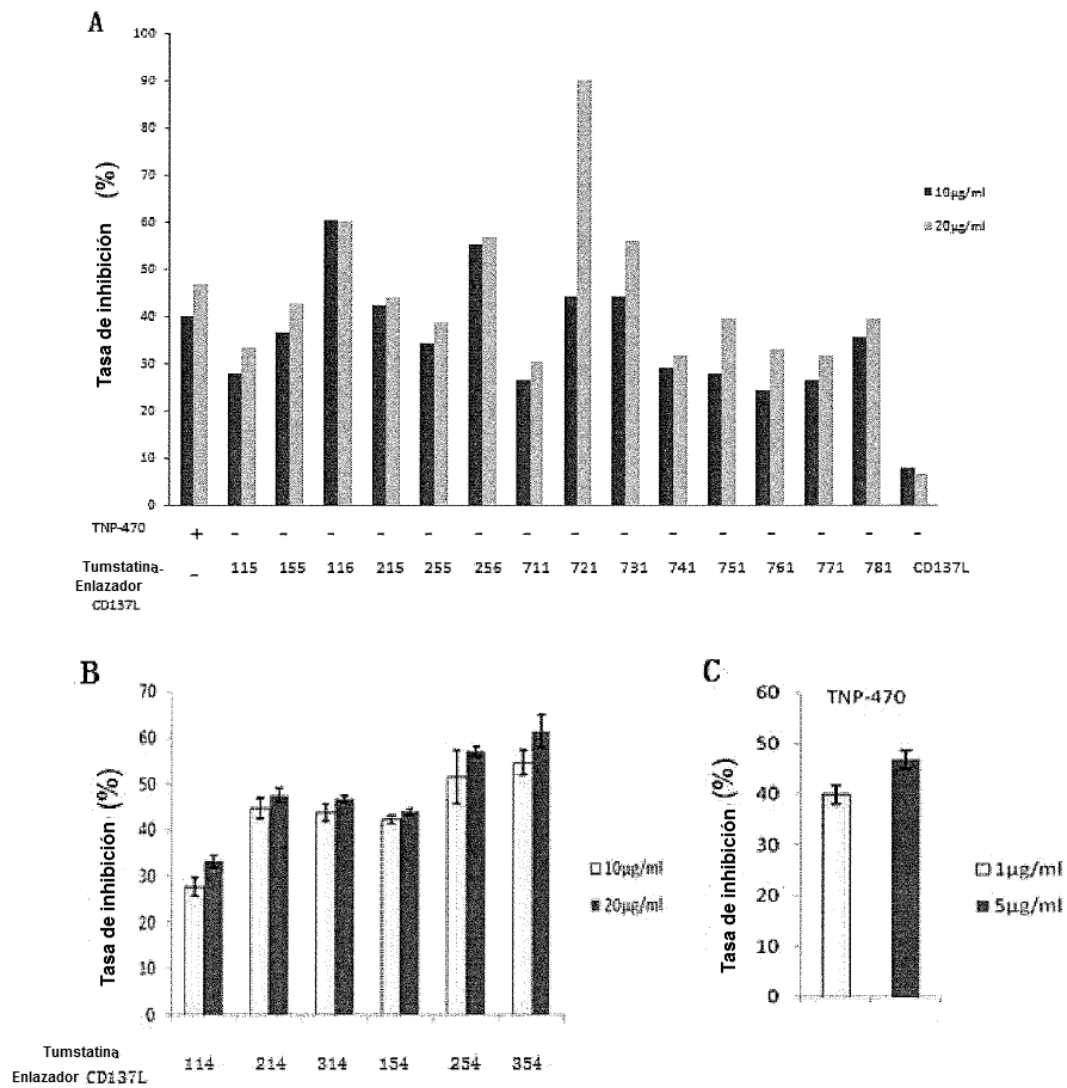


Figura 7

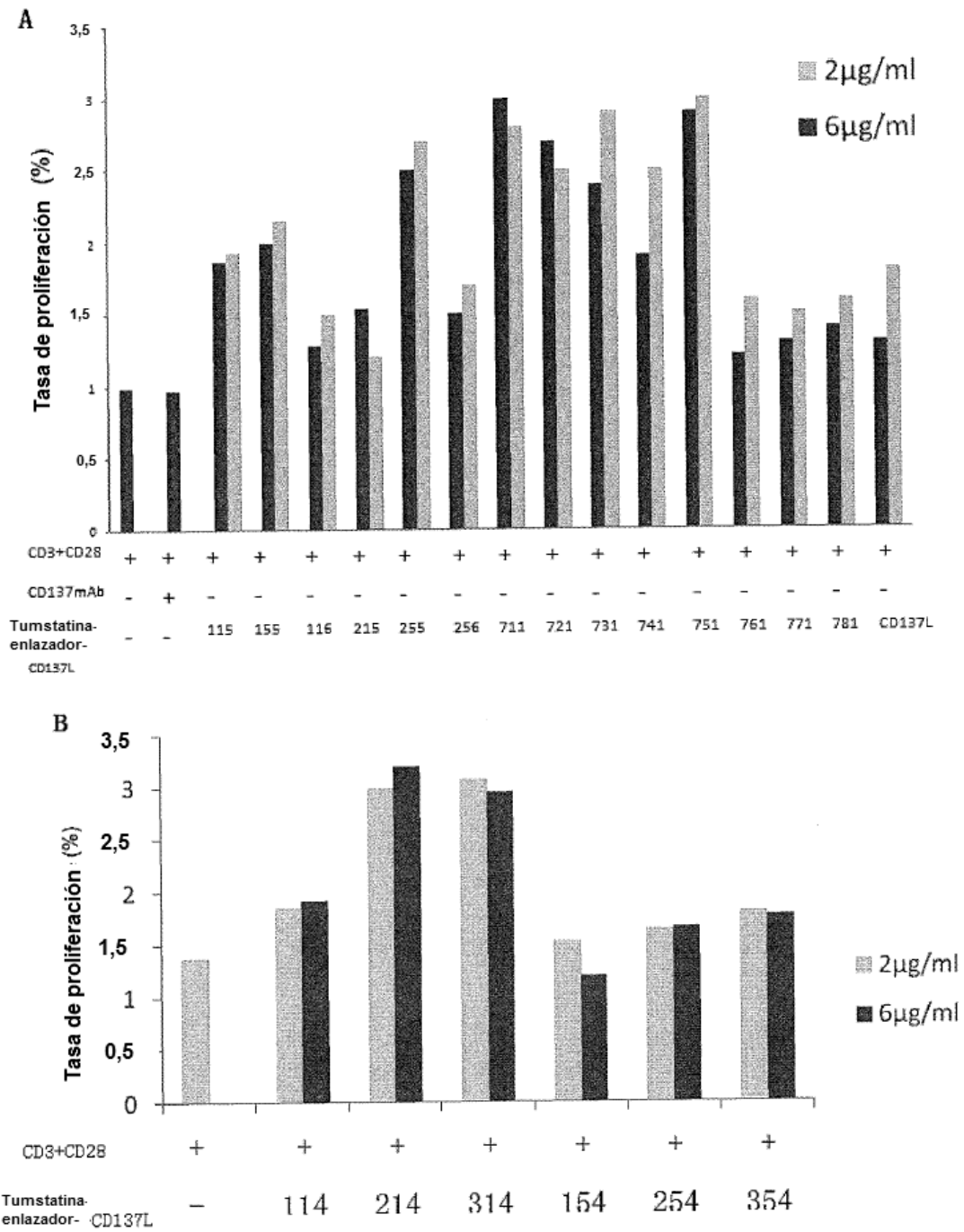


Figura 8