

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 704**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/525** (2006.01)

**C12N 15/28** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008** **E 12166865 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016** **EP 2484691**

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

30 Prioridad:

**10.07.2007 EP 07013506**

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

**26.04.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 567 704 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de colectina de la superfamilia de TNF

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende (i) una citoquina LIGHT, o un dominio de unión a receptor de la misma, y (ii) un dominio de trimerización de colectina que comprende la proteína tensioactiva D o el dominio de cuello y de unión a carbohidrato de la proteína tensioactiva D, donde (i) comprende los aminoácidos 91-240 de la SEC ID N.º 16, y donde (ii) comprende los aminoácidos 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y donde (ii) está localizado de manera C-terminal de (i), a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, y a una célula que comprende la molécula de ácido nucleico. La proteína de fusión está presente como un complejo trimérico o como un oligómero del mismo. La proteína de fusión, el ácido nucleico, y la célula son adecuados como composición farmacéutica o para aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y/o investigación como se describe en este documento.

Estado de la técnica

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

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

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

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

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

Shiraishi et al. (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004), 197-202) describe que el dominio de unión a receptor de CD95L puede estabilizarse por motivos superenrollados de  $\alpha$ -hélice (cremallera de leucina) artificiales posicionados de forma N-terminal. Se descubrió, sin embargo, que la orientación de las cadenas polipeptídicas entre sí, por ejemplo, orientación paralela o antiparalela, apenas puede predecirse. Además, la cantidad óptima de repeticiones

hepta-d en el motivo de cremallera superenrollada es difícil de determinar. Además, las estructuras superenrolladas tienen tendencia a formar agregados macromoleculares después de alteración del pH y/o la fuerza iónica.

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

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

El documento WO 03/086301 describe proteínas de fusión basadas en la proteína tensioactiva pulmonar D fusionada a TR2 (=LIGHT).

El documento WO 02/090553 describe proteínas de fusión recombinantes que tienen una función de ligando y un dominio para trimerización. El dominio para trimerización puede comprender la proteína tensioactiva D.

El documento US 2004/247563 describe un método para el tratamiento de un individuo que padece de o en riesgo de una enfermedad infecciosa. También se describen proteínas oligoméricas basadas en la proteína tensioactiva D..

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

#### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende (i) una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma, y (ii) un dominio de trimerización de colectina. La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende (i) TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo, y (ii) un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello o el dominio de cuello y de unión a carbohidrato de la proteína tensioactiva D, donde (i) comprende los aminoácidos 120-281 de la SEC ID N.º 10, y donde (ii) comprende los aminoácidos 219-375 o 219-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y donde (ii) está localizado de manera C-terminal de (i).

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

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

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

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se define por el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

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

También se describe en este documento un componente (i) de la proteína de fusión que es una citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma. Preferiblemente, el componente (i) es una citoquina de mamífero, particularmente humana o un dominio de unión a receptor de la misma incluyendo variantes alélicas y/o derivados del mismo. Además, se prefiere que la citoquina de TNF sea un dominio de unión a receptor de la misma capaz de unirse al correspondiente receptor de citoquinas y preferiblemente con capacidad de activación del receptor, mediante la cual puede causarse actividad apoptótica o proliferativa. La citoquina puede seleccionarse, por ejemplo, entre miembros de la superfamilia de TNF, por ejemplo TNFSF-1 a 18 humano como se indica en la Tabla 1, preferiblemente entre LTA (SEC ID N.º 1), TNF $\alpha$  (SEC ID N.º 2), LTB (SEC ID N.º 3), OX40L (SEC ID N.º 4), CD40L (SEC ID N.º 5), CD95L (SEC ID N.º 6), CD27L (SEC ID N.º 7), CD30L (SEC ID N.º 8), CD137L (SEC ID N.º 9), TRAIL (SEC ID N.º 10), RANKL (SEC ID N.º 11), TWEAK (SEC ID N.º 12), APRIL 1 (SEC ID N.º 13), APRIL 2 (SEC ID N.º 14), BAFF (SEC ID N.º 15), LIGHT (SEC ID N.º 16), TL1A (SEC ID N.º 17), GITRL (SEC ID N.º 18), EDA-A1 (SEC ID N.º 19), EDA-A2 (SEC ID N.º 20), o un dominio de unión a receptor de los mismos. Los dominios preferidos de unión a receptor de las proteínas respectivas se indican en la Tabla 1 (NH<sub>2</sub>-aa a COOH-aa) y comprenden, por ejemplo, los aminoácidos 59-205 o 60-205 de LTA (SEC ID N.º 1), 86-233 de TNF $\alpha$  (SEC ID N.º 2), 82-244 o 86-244 de LTB (SEC ID N.º 3), 52-183 o 55-183 de OX40L (SEC ID N.º 4), 112-261 o 117-261 de CD40L (SEC ID N.º 5), 51-193 o 56-193 de CD27L (SEC ID N.º 7), 97-234, 98-234 o 102-234 de CD30L (SEC ID N.º 8), 86-254 de CD137L (SEC ID N.º 9), 161-317 de RANKL (SEC ID N.º 11), 103-249, 104-249 o 105-249 de TWEAK (SEC ID N.º 12), 112-247 o 113-247 de APRIL 1 (SEC ID N.º 13), 112-250 o 113-250 de APRIL 2 (SEC ID N.º 14), 140-285 de BAFF (SEC ID N.º 15), 91-240 de LIGHT (SEC ID N.º 16), 91-251 o 93-251 de TL1A (SEC ID N.º 17), 52-177 de GITRL (SEC ID N.º 18), 245-391 de EDA-A1 (SEC ID N.º 19), 245-389 de EDA-A2 (SEC ID N.º 20).

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

Además, se describe que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma de la proteína de fusión se selecciona de CD95L humano (SEC ID N.º 6), particularmente los aminoácidos 142-281 o 144-281 de CD95L humano.

Además, se describe en este documento que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma de la proteína de fusión se selecciona de TRAIL humano (SEC ID N.º 10), particularmente los aminoácidos 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano. En otra realización preferida, TRAIL humano comprende cualquier aminoácido de 95-120 como aminoácido inicial - aminoácido 281 de la SEC ID N.º 10.

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

El mutante puede generarse mediante cualquier técnica y es conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, las técnicas descritas en van der Sloot et al. (PNAS, 2006, 103:8634-8639), Kelley et al. (J. Biol. Chem., 2005, 280:2205-2215), o MacFarlane et al. (Cancer Res., 2005, 65: 11265-11270) y puede comprender cualquier tipo de mutaciones estructurales, por ejemplo, sustitución, delección, duplicación y/o inserción de un aminoácido. Una realización preferida es la generación de sustituciones. La sustitución puede afectar a al menos un aminoácido de la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. En una realización preferida, la sustitución puede afectar a al menos uno de los aminoácidos de TRAIL, por ejemplo, TRAIL humano (por ejemplo, la SEC ID N.º 10). Sustituciones preferidas a este respecto afectan a al menos uno de los siguientes aminoácidos de TRAIL humano de la SEC ID N.º 10: R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269. Las sustituciones preferidas de aminoácido de TRAIL humano de la SEC ID N.º 10 son al menos una de las siguientes sustituciones: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R, o D269K.

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



actividad de TRAILR1 y/o TRAILR2 puede verse afectada negativamente, es decir, unión más débil, menos selectiva o específica y/o menos activación o ausencia de activación del receptor.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o actividad tanto de TRAILR1 como de TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las dos siguientes sustituciones de aminoácido de la SEC ID N.º 10 Y213W y S215D o la siguiente sustitución única de aminoácido Y189A.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o actividad de TRAILR1 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las cuatro siguientes sustituciones de aminoácido de la SEC ID N.º 10 N199V, K201R, Y213W y S215D o las cinco siguientes sustituciones de aminoácido Q193S, N199V, K201R, Y213W y S215D o en la Tabla 2 de Kelley et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las seis siguientes sustituciones de aminoácido Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199V, y K201R o Y213W, S215D, Y189A, Q193S, N199R, y K201R.

Ejemplos de mutantes de TRAIL con una o más sustituciones de aminoácido que afectan a la unión y/o actividad de TRAILR2 pueden encontrarse, por ejemplo, en la Tabla 1 de MacFarlane et al. (cf. anteriormente) o en la Tabla 2 de Kelley et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con las seis siguientes sustituciones de aminoácido de la SEC ID N.º 14 Y189Q, R191K, Q193R, H264R, I266L, y D267Q o en la Tabla 2 de van der Sloot et al. (cf. anteriormente) y pueden comprender mutantes de TRAIL humano con la siguiente sustitución única de aminoácido D269H, las dos siguientes sustituciones de aminoácido D269H y E195R o D269H y T214R.

En una realización de la invención, la parte citoquina de la proteína de fusión se obtiene de LIGHT humano (SEC ID N.º 16), particularmente los aminoácidos 91-240 de la SEC ID N.º 16.

También se describe que la parte citoquina de la proteína de fusión se obtiene de APRIL humano (SEC ID N.º 13 o 14), particularmente los aminoácidos 112-247 o 113-247 de la SEC ID N.º 13, o 112-250 o 113-250 de la SEC ID N.º 14.

Un elemento enlazador flexible puede estar adicionalmente localizado entre la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma (i) y el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento (ii). El elemento enlazador flexible preferiblemente tiene una longitud de 3-20 aminoácidos, particularmente una longitud de 3, 6, 9, 10, 12, 15 o 18 aminoácidos. Más preferiblemente, la longitud del enlazador es de 9-15 aminoácidos. El elemento enlazador es preferiblemente un enlazador de glicina/serina, es decir, un enlazador peptídico que consiste sustancialmente en los aminoácidos glicina y serina. En una realización especialmente preferida, el enlazador tiene la secuencia de aminoácidos  $(GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c$  donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Está claro para los expertos que en casos en que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma ya termina con una G, por ejemplo TRAIL humano (SEC ID N.º 10) dicha G puede formar la primera G del enlazador en la secuencia enlazadora  $(GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c$ .

El dominio de trimerización de colectina (ii) comprende proteína tensioactiva D o el dominio de cuello y de unión a carbohidrato de la proteína tensioactiva D.

Los miembros de la familia de colectina y sus estructuras se resumen en, por ejemplo, Hakansson et al. (Protein Science, 2000, 9:1607-1617) y pueden comprender proteína tensioactiva D, proteína tensioactiva A, proteína de unión a mananos A, proteína de unión a mananos C, colectina del hígado 1, colectina de placenta 1, o colectina-11. El dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de una especie diferente que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. Como alternativa, el dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento puede ser de la misma especie que la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento. En una realización preferida, el dominio de colectina como se describe en este documento es de ser humano y la citoquina de la superfamilia de TNF o un dominio de unión a receptor de la misma como se describe en este documento es de ser humano. En una realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello y de unión a carbohidrato (CRD) de la proteína tensioactiva D, particularmente los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21. En otra realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello de los ácidos tensioactivos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21. En otra realización preferida, el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello y de unión a carbohidrato (CRD) de colectina-11, particularmente los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22. En otra realización preferida el dominio de trimerización de colectina comprende el dominio de cuello de colectina-11, particularmente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22.

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

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

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio CRD y de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEC ID N.º 26 o 27. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEC ID N.º 28. Como alternativa, la proteína de fusión anteriormente puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio CRD y de cuello de colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEC ID N.º 29 o 30. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de

colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma C-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEC ID N.º 31. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEC ID N.º 36 o 37.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de la proteína tensioactiva D, preferiblemente los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma N-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento, preferiblemente 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10) y un dominio de trimerización de colectina o mutante del mismo como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello de colectina-11, preferiblemente los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22 donde el dominio de trimerización de colectina está localizado de forma N-terminal de TRAIL o TRAIL mutante como se describe en este documento. Son proteínas preferidas de fusión a este respecto las SEC ID N.º 32-34. Como alternativa, la proteína de fusión anterior puede comprender adicionalmente un enlazador como se describe en este documento, por ejemplo, un enlazador con la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto es la SEC ID N.º 35.

También se describe una proteína de fusión que comprende CD95L, particularmente CD95L humano, o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 21-160 de la SEC ID N.º 40, y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 172-209 y 210-327 de la SEC ID N.º 40, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento. Preferiblemente, la proteína de fusión puede comprender un enlazador, por ejemplo un enlazador flexible, más preferiblemente un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento que tiene una longitud de preferiblemente 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEC ID N.º 40, particularmente los aminoácidos 21-327 de la SEC ID N.º 40.

Una realización de la invención es una proteína de fusión que comprende LIGHT, particularmente LIGHT humano o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, y un dominio de trimerización de colectina que comprende el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 182-219, y 220-337 de la SEC ID N.º 41, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento. Preferiblemente, la citoquina y el dominio de colectina están conectados por un enlazador, por ejemplo un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento, que tiene una longitud de preferiblemente 9-15 aminoácidos. Una proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEC ID N.º 41, particularmente los aminoácidos 21-327 de la SEC ID N.º 41.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o mutante de TRAIL como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 21-181 de la SEC ID N.º 43 (TRAIL de tipo silvestre), los aminoácidos 21-181 de la SEC ID N.º 47 (TRAILR1mut) o los aminoácidos 21-181 de la SEC ID N.º 48 (TRAILR2mut). Además, la proteína de fusión comprende un dominio de trimerización de colectina seleccionado entre el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana, por ejemplo los aminoácidos 193-230, y 231-384 de la SEC ID N.º 43, respectivamente, o un mutante del mismo como se describe en este documento, por ejemplo mutantes mostrados en las SEC ID N.º 49 o 50. Preferiblemente, el polipéptido de fusión comprende tanto la región de cuello como el CRD de SP-D humana. La citoquina y el dominio de colectina están preferiblemente conectados por un enlazador, por ejemplo un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento. Preferiblemente, el enlazador tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Las proteínas preferidas de fusión a este respecto comprenden (i) la SEC ID N.º 43, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEC ID N.º 43, (ii) la SEC ID N.º 44, particularmente los aminoácidos 21-230 de la SEC ID N.º 44, (iii) la SEC ID N.º 47, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEC ID N.º 47, (iv) la SEC ID N.º 48, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEC ID N.º 48, (v) la SEC ID N.º 49, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEC ID N.º 49 o (vi) la SEC ID N.º 50, particularmente los aminoácidos 21-348 de la SEC ID N.º 50.

También se describe una proteína de fusión que comprende TRAIL, particularmente TRAIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo o un mutante de TRAIL como se describe en este documento anteriormente, y un dominio de trimerización de colectina, que es el dominio de cuello de colectina-11 humana, y opcionalmente el CRD de colectina-11 humana, por ejemplo los aminoácidos 193-224 y 225-347 de la SEC ID N.º 45, respectivamente. Preferiblemente, el CRD está presente. Preferiblemente, la citoquina y el dominio de colectina están conectados por un enlazador, por ejemplo un enlazador de glicina/serina como se ha descrito anteriormente en este documento, preferiblemente que tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. Las proteínas preferidas de fusión a este respecto comprenden la SEC ID N.º 45 y la SEC ID N.º 46, particularmente, los aminoácidos 21-347 de la SEC ID N.º 45 o los aminoácidos 21-229 de la SEC ID N.º 46.

También se describe una proteína de fusión que comprende APRIL, particularmente APRIL humano o un dominio de unión a receptor del mismo como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 21-158 de la SEC ID N.º 51 y un dominio de trimerización de colectina como se describe en este documento, particularmente el dominio de cuello y opcionalmente el CRD de SP-D humana o un mutante del mismo, como se describe en este documento, por ejemplo los aminoácidos 170-207 y 208-325 de la SEC ID N.º 51, respectivamente. La citoquina y el dominio de colectina están conectados preferiblemente por un enlazador, por ejemplo un enlazador de glicina/serina como se describe en este documento, preferiblemente que tiene una longitud de 9-15 aminoácidos. La proteína preferida de fusión a este respecto comprende la SEC ID N.º 51, particularmente los aminoácidos 21-325 de la SEC ID N.º 51.

La proteína de fusión como se describe en este documento puede comprender adicionalmente un dominio peptídico señal N-terminal, que permite el procesamiento, por ejemplo, secreción extracelular, en una célula hospedadora adecuada. Preferiblemente, el dominio peptídico señal N-terminal comprende una proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por peptidasa señal y por tanto puede retirarse después de o durante la expresión para obtener la proteína madura. En una realización preferida, el dominio peptídico señal N-terminal comprende la secuencia SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, o SEC ID N.º 25.

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

La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un elemento flexible C-terminal, que tiene una longitud de, por ejemplo, 1-50, preferiblemente 10-30 aminoácidos que pueden incluir y/o conectarse a un dominio de reconocimiento/purificación como se describe en este documento. molécula, o una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión o un precursor de la misma, por ejemplo, una pro- o pre-proforma de la proteína de fusión que puede comprender una secuencia señal como se describe en este documento u otras partes de aminoácidos heterólogos para la secreción o purificación que están preferiblemente localizadas en el extremo N- y/o C-terminal de la proteína de fusión como se describe en este documento. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión donde las partes de aminoácidos heterólogos pueden estar unidas al primer y/o segundo dominio mediante un sitio de escisión por proteasa, por ejemplo, un sitio de escisión por proteasa de Factor X<sub>a</sub>, trombina o IgA.

Ejemplos de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia codificante de una proteína de fusión como se describe en este documento son las SEC ID N.º 38, 39 o 42.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 1

Símbolo aprobado del gen	Número TNFSF	Sinónimo	Acceso	NH2-aa	COOH-aa	Longitud
LTA	TNFSF-1	LTA	<a href="#">gi 6806893 ref NP_000586.2 </a>	Ser59	Leu205	147aa
TNF	TNFSF-2	TNF-alfa	<a href="#">gi 25952111 ref NP_000585.2 </a>	Thr60	Leu205	146aa
LTB	TNFSF-3	LTB	<a href="#">gi 4505035 ref NP_002332.11</a>	Asp86	Leu233	148aa
TNFSF4	TNFSF-4	OX40L/GP34	<a href="#">gi 4507603 ref NP_003317.11</a>	Asp82	Gly244	163aa
CD40LG	TNFSF-5	CD40L	<a href="#">gi 4557433 ref NP_000065.1 </a>	Gly86	Gly244	159aa
FASLG	TNFSF-6	CD95L/APO-L/FAS-L	<a href="#">gi 4557329 ref NP_000630.1 </a>	Val52	Leu183	132aa
TNFSF7	TNFSF-7	CD27L	<a href="#">gi 4507605 ref NP_001243.11</a>	Arg55	Leu183	129aa
TNFSF8	TNFSF-8	CD30L	<a href="#">gi 4507607 ref NP_001235.1 </a>	Asp117	Leu261	150aa
TNFSF9	TNFSF-9	4-1BB/CD137L	<a href="#">gi 4507609 ref NP_003802.1 </a>	Glu112	Leu261	145aa
TNFSF10	TNFSF-10	TRAIL	<a href="#">gi 4507593 ref NP_003801.1 </a>	Glu142	Leu281	140aa
TNFSF11	TNFSF-11	TRANCE/RANK L	<a href="#">gi 4507595 ref NP_003692.1 </a>	Arg144	Leu281	138aa
TNFSF12	TNFSF-12	TWEAK/Apo-3	<a href="#">gi 4507597 ref NP_003800.1 </a>	Glu51	Pro193	143aa
TNFSF13	TNFSF-13	APRIL/TALL-2/TRDL-1	<a href="#">gi 26051248 ref NP_742085.1 </a>	Asp56	Pro193	138aa
TNFSF13	TNFSF-13	APRIL/TALL-2/TRDL-1	<a href="#">gi 4507599 ref NP_003799.1 </a>	Lys97	Asp234	138aa
				Ser98	Asp234	137aa
				Leu102	Asp234	133aa
				Asp86	Glu254	169aa
				Glu116	Gly281	166aa
				Gly118	Gly281	164aa
				Glu161	Asp317	157aa
				Ala103	His249	147aa
				Arg104	His249	146aa
				Arg105	His249	145aa
				Lys112	Leu247	136aa
				Lys112	Leu250	139aa

(continuación)

Símbolo aprobado del gen	Número TNFSF	Sinónimo	Acceso	NH2-aa	COOH-aa	Longitud
TNFSF13B	TNFSF-13B	BAFF/Blys	<a href="#">gi 5730097 ref NP_006564.1 </a>	Glu140	Leu285	146aa
TNFSF714	TNFSF-14	LIGHT	<a href="#">gi 25952144 ref NP_003798.2 </a>	Glu91	Val240	150aa
TNFSF15	TNFSF-15	TL1A/VEGI	<a href="#">gi 23510445 ref NP_005109.2 </a>	Asp91	Leu251	161aa
				Asp93	Leu251	159aa
TNFSF18	TNFSF-18	GITRL	<a href="#">gi 4827034 ref NP_005083.1 </a>	Glu52	Ser177	126aa
EDA		EDA-A1	<a href="#">gi 4503449 ref NP_001390.1 </a>	Glu245	Ser391	147aa
EDA		EDA-A2	<a href="#">gi 54112101 ref NP_001005609.1 </a>	Glu245	Ser389	145aa

En un aspecto diferente, la presente invención se refiere a nuevas variantes de sustitución de aminoácido de la proteína tensioactiva humana D (SP-D) que comprenden un dominio de reconocimiento de carbohidrato con capacidad reducida de unión a carbohidrato, opcionalmente fusionado a al menos un polipéptido o dominio polipeptídico heterólogo así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos de fusión. Preferiblemente, los polipéptidos SP-D mutados de la presente invención tienen una sustitución de aminoácido en la posición F355 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, particularmente una sustitución de aminoácido por aminoácido hidrófilo o cargado, por ejemplo F355S, F355T, F355E, F355D, F355H o F355R, particularmente F355D. El polipéptido o dominio polipeptídico heterólogo es preferiblemente de mamífero, por ejemplo de origen humano, por ejemplo un dominio de citoquina de TNSF como se ha descrito anteriormente. Los polipéptidos SP-D mutados preferiblemente comprenden un dominio de cuello de SP-D como se ha descrito anteriormente. El polipéptido heterólogo puede fusionarse al extremo N- y/o C-terminal del dominio SP-D. Preferiblemente, está presente un enlazador, por ejemplo un enlazador como se ha descrito en este documento anteriormente, entre la SP-D y el dominio polipeptídico heterólogo.

#### Estructura básica de una proteína de fusión

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

#### 1.1 Secuencias de los péptidos señal

MNFGFSLIFLVLVLKGVQC (SEC ID N.º 23)  
 METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEC ID N.º 24)  
 METDTLLLWVLLLWVPAGNG (SEC ID N.º 25)

#### 1.2 Indicador-epítipo/sitio de procesamiento por enteroquinasa

DYKDDDDKD

#### 1.3 Colectinas humanas

Proteína tensioactiva D (SEC ID N.º 21)

```

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

```

Colectina-11 (SEC ID N.º 22)

```

1      MRGNLALVGV LISLAFLSLL PSGHPQPAGD DACSVQILVP GLKGDAGEKG
DKGAPGRPGR
61     VGPTGEKGDM GDKGQKGSVG RHGKIGPIGS KGEKGDSGDI GPPGPNGEPP
LPCECSQLRK
121    AIGEMDNQVS QLTSELKFIK NAVAGVRETE SKIYLLVKEE KRYADAQLSC
QGRGGTLSMP
181    KDEAANGLMA AYLAQAGLAR VFIGINDLEK EGAFVYSDHS PMRTFNKWR
GEPNNAYDEE
241    DCVEMVASGG WNDVACHTTM YFMCEFDKEN M

```

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

#### 1.4 Elemento enlazador flexible

(GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> donde a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6



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

5	SEC-ID-01 SEC NP_000586_TNFSF1_LTA PALABRA CLAVE PROTEÍNA CARACTERÍSTICAS ORIGEN	
	1 MTPPERLFLP RVC GTTLHLL LLGLLLVLLP GAQGLPGVGL TPSAAQTARQ HPKMHLAHST 61 LKPA AHLIGD PSKQNSLLWR ANT DRAFLQD GFSLSNNSLL VPTSGIYFVY SQVVFSGKAY 10 121 SPKATSSPLY LAHEVQLFSS QYPFHVPLLS SQKMVYPGLQ EPWLHSMYHG AAFQLTQGDQ 181 LSTHTDGIPH LVLSPSTVFF GAFAL	
15	SEC-ID-02 SEC NP_000585_TNFSF2_TNFa PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN	
	1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRCLFLSLFSFLI VAGATTLFCL LHFGVIGPQR 61 EEFPRLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEGLQLWLNRRAN ALLANGVELR 121 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE 181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL	
20	SEC-ID-03 SEC NP_002332_TNFSF3_LTB PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN	
	1 MGALGLEGRG GRLQGRGSL LAVA GATSLV TLLLAVPITV LAVLALVPQD QGGLVTETAD 61 PGAQAQQGLG FQKLPEEEPE TDLSPGLPAA HLIGAPLKGQ GLGWETTKEQ AFLTSGTQFS 121 DAEGIALPQD GLYYLYCLVG YRGRAPPGGG DPQGRSVTLR SSLYRAGGAY GPGTPELLLE 181 GAETVTPVLD PARRQGYGPL WYTSVGFGL VQLRRGERVY VNISHPDMVD FARGKTFFGA 25 241 VMVG	
30	SEC-ID-04 SEC NP_003317_TNFSF4_0X40L PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN	
	1 MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 61 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ 121 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 181 CVL	
35	SEC-ID-05 SEC NP_000065_TNFSF5_CD40L PALABRA CLAVE PROTEÍNA ORIGEN	

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

SEC-ID-06

SEC NP\_000630\_TNFSF6\_CD95L

5 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

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

SEC-ID-07

SEC NP\_001243\_TNFSF7\_CD27L

10 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

1 MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQQLPL  
ESLGWDVAEL  
61 QLNHTGPQOD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV  
TLAICSSTTA  
121 SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN  
LTGTLLPSRN  
15 181 TDETFFGVQW VRP

SEC-ID-08

SEC NP\_001235\_TNFSF8\_CD30L

20 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

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

SEC-ID-09

25 SEC NP\_003802\_TNFSF9\_CD137L

PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

1 MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA  
CPWAVSGARA  
61 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY  
SDPGLAGVSL  
121 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL  
RSAAGAAALA  
181 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHLHTEA RARHAWQLTQ  
GATVLGLFRV  
30 241 TPEIPAGLPS PRSE

SEC-ID-10

SEC NP\_003801\_TNFSF10\_TRAIL  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

1 MAMMEVQGGP SLGQTCVLIV IFTVLLQSLC VAVTYVYFTN ELKQMQDKYS  
KSGIACFLKE  
61 DDSYWDPNDE ESMNSPCWQV KWQLRQLVRK MILRTSEETI STVQEKQONI  
SPLVRERGPQ  
121 RVAAHITGTR GRSNTLSSPN SKNEKALGRK INSWESSRSG HSFLSNLHLR  
NGELVIHEKG  
181 FYYIYSQTYF RFQEEIKENT KNDKQMVQYI YKYTSYPDPI LLMKSARNSC  
WSKDAEYGLY  
5 241 SIYQGGIFEL KENDRIFVSV TNEHLIDMDH EASFFGAFLV G

SEC-ID-11  
SEC NP\_003692\_TNFSF11\_a\_RANKL  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
10 ORIGEN

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

SEC-ID-12  
15 SEC NP\_003800\_TNFSF12\_TWEAK  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

1 MAARRSQRRR GRRGEPGTAL LVPLALGLGL ALACLGLLLA VVSLGSRASL  
SAQEPAQEEL  
61 VAEEDQDPSE LNPQTEESQD PAPFLNRLVR PRRSAPKGRK TRARRAIAAH  
YEVHPRPGQD  
121 GAQAGVDGTV SGWEARINS SSPLRYNRQI GEFIVTRAGL YYLYCQVHFD  
EGKAVYLKLD  
181 LLVDGVLALR CLEEFsATAA SSLGPQLRLC QVSGLLALRP GSSLRIRTLp  
WAHLKAAPFL  
20 241 TYFGLFQVH

SEC-ID-13  
SEC NP\_742085\_TNFSF13\_APRIL\_ver1  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
25 ORIGEN

1 MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSVA LWLSWGAALG AVACAMALLT  
QQTELQSLRR  
61 EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK  
QKKQHsVLHL  
121 VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GvYLLYSQVL  
FQDVTFTMGQ  
181 VVSREGQGRQ ETlFRcIRSM PSHPDRAyNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP  
RARAKNLSP  
241 HGTFLGL

SEC-ID-14  
30 SEC NP\_003799\_TNFSF13\_APRIL\_ver2  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

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

SEC-ID-15  
 SEC NP\_006564\_TNFSF13b\_BAFF  
 5 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

1 MDDSTEREQS RLTSCLKKRE EMKLKECVSI LPRKESPSVR SSKDGKLLAA  
 TLLLALLSCC  
 61 LTVVSFYQVA ALQGDLASLR AELQGHHA EK LPAGAGAPKA GLEEAPAVTA  
 GLKIFEPPAP  
 121 GEGNSSQNSR NKRAVQGPEE TVTQDCLQLI ADSETPTIQK GSYTFVPWLL  
 SFKRGSAL EE  
 181 KENKILVKET GYFFIYGQVL YTDKTYAMGH LIQRKKVHVF GDELSLVTLF  
 RCIQNPETL  
 10 241 PNNSCYSAGI AKLEEGDELQ LAIPRENAQI SLDGDVTFFG ALKLL

SEC-ID-16  
 SEC NP\_003798\_TNFSF14\_LIGHT  
 15 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

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

SEC-ID-17  
 20 SEC NP\_005109\_TNFSF15\_TL1A  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

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

SEC-ID-18  
 SEC NP\_005083\_TNFSF18\_GITRL  
 25 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

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

SEC-ID-19  
SEC NP\_001390\_EDA-A1  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

5

```

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

```

SEC-ID-20  
SEC NP\_001005609\_EDA-A2  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

10

```

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

```

15

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

#### 1.6 Ejemplos de proteínas de fusión

20

SEC ID N.º 26 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-1\_PRO.PRO  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

```

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

```

25

EC ID N.º 27 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-2\_PRO.PRO  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

30

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

SEC ID N.º 28  
ORIGEN

5

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

SEC ID N.º 29 SP-hsTrailsin-col11-Construcción-1.pro  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

10

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

SEC ID N.º 30 SP-hsTrailsin-col-11-Construcción-2.pro  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

15

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

20

SEC ID N.º 31 SP-hsTrailsin-col-11-Construcción-3.pro  
PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
ORIGEN

```

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

```

SEC ID N.º 32 INDICADOR-hCol11-hTRAIL\_Glu116\_Gly281.pro  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

```

1      MNFGFSLIFL VLVKGVQCD YKDDDDKGLP CECSQLRKAI GEMDNQVSQ L
      TSELKFIKNA
61     VAGVRETESE RGPQRVA AH I TGTRGRSNTL SSPNSKNEKA LGRKINSWE S
      SRS GHSFLSN
121    LHLRNGELVI HEKGFYIYS QTYFRFQEEI KENTKNDKQM VQYIYKYTSY
      PDPILLMKSA
181    RNSCWSKDAE YGLYSIYQGG IFELKENDRI FVSVTNEHLI DMDHEASFFG
      AFLVG

```

SEC ID N.º 33 INDICADOR-hCol11s-hTRAIL\_Glu116\_Gly281.pro  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

```

1      MNFGFSLIFL VLVKGVQCD YKDDDDKGLP CECSQLRKAI GEMDNQVSQ L
      TSELKFIKNA
61     VAGVRETERG PQRVA AH I TG TRGRSNTLSS PNSKNEKALG RKINSWESSR
      SGHSFLSNLH
121    LRNGELVIHE KGFYIYSQT YFRFQEEIKE NTKNDKQMVQ YIYKYTSYPD
      PILLMKSARN
181    SCWSKDAEYG LYSIYQGGIF ELKENDRIFV SVTNEHLIDM DHEASFFGAF LVG

```

SEC ID N.º 34 hCol11s-hTRAIL\_Glu116\_Gly281.pro  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

```

1      MNFGFSLIFL VLVKGVQCG LPCECSQLRK AIGEMDNQVS QLTSELKFIK
      NAVAGVRETE
61     RGPQRVA AH I TGTRGRSNTL SSPNSKNEKA LGRKINSWE S SRS GHSFLSN
      LHLRNGELVI
121    HEKGFYIYS QTYFRFQEEI KENTKNDKQM VQYIYKYTSY PDPILLMKSA
      RNSCWSKDAE
181    YGLYSIYQGG IFELKENDRI FVSVTNEHLI DMDHEASFFG AFLVG

```

SEC ID N.º 35 INDICADOR-hCol11-GSS-hTRAIL\_Glu116\_Gly281.pro  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

```

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

```

SEC ID N.º 36 Sp1-hTRAIL\_Glu116\_Gly281-GSS-col11.pro  
 PALABRA CLAVE PROTEÍNA  
 ORIGEN

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

SEC ID N.º 37 Sp3-hTRAIL\_Glu116\_Gly281-GSS-col11.pro

PALABRA CLAVE PROTEÍNA

5 ORIGEN

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

SEC ID N.º 38 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-1\_ADN.sec: 1045 pb

10 PALABRA CLAVE ADN (la secuencia codificante de ADN correspondiente a la SEC ID N.º 26 empieza en la posición de la base 16)

ORIGEN

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

15 1021 GTCTGTGAGT TCTAATAGCG GCCGC

SEC ID N.º 39 SP-hsTrailsin-SPD-Construcción-2\_ADN.sec: 1057 pb

PALABRA CLAVE ADN (la secuencia codificante de ADN correspondiente a la SEC ID N.º 27 empieza en la posición de la base 16)

20 ORIGEN



```

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

```

## Ejemplos

### 1. Materiales y métodos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 Generación de construcciones de expresión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1.4. Ensayos de muerte celular

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

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

### 1.5 Ensayo de citotoxicidad hepatocelular

Para determinar el efecto de proteínas de fusión de TRAIL, se prepararon hepatocitos humanos primarios a partir de donantes sanos y se cultivaron en medio Williams E usando 25.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. En el día dos, se cambió el medio a DMEM-F12 suplementado con FCS al 10 %, insulina humana, Pen/Estrep, medio esencial mínimo (MEM), piruvato sódico y Hepes 10 mM y se cultivaron durante otro día. Las células se estimularon en el día tres con concentraciones variables de las proteínas indicadas en presencia o ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento (StrepMabImmo, IBA GmbH). Para evaluar el efecto hepatotóxico potencial de un cotratamiento de ligandos con agentes quimioterapéuticos, se coincubó TRAIL-ASPD\_F335D a concentraciones variables junto con doxorubicina 5 mM o gemcitabina 5 mM. Las células se incubaron durante 5 o 24 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % y después se lisaron para la determinación de la actividad caspasa como se ha descrito en la sección "ensayos de muerte celular".

#### 1.6 Streptactin-ELISA

Para determinar la unión de receptores a ligandos construidos, se usaron microplacas de 96 pocillos recubiertas con streptactin. Por lo tanto, se inmovilizaron sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria, sueros de ratón o proteínas purificadas en las placas streptactin (IBA GmbH) durante 1-3 horas en PBS. Las muestras se diluyeron en tampón de unión/bloqueo ELISA (PBS, Tween-20 al 0,1 %, SuperBlock T20-PBS al 20 % (Pierce)). Las placas se lavaron con PBS + Tween-20 al 0,1 % y se incubaron con anticuerpo de ratón anti-TRAIL (Pharmingen, clon RIK-2), TRAIL-Receptor 1-Fc (R&D Systems), TRAIL-Receptor 2-Fc (R&D Systems), TACI-Fc (R&D Systems) o HVEM-Fc (R&D Systems) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se detectaron las proteínas Fc con anticuerpos conjugados con peroxidasa específicos anti-Fc humano o anti-Fc de ratón (Sigma). Se hizo una reacción de color mediante la adición de 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics) y se determinó la absorbancia a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25 % como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

#### 1.7 Ensayo de unión a manano

Se incubaron placas ELISA (Nunc Maxisorp) durante una noche a 4 °C con 10 µg/pocillos de manano de levadura (Sigma) en tampón estéril de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,025 %, pH 9,6). Las placas primero se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con tampón BB (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA al 0,1 % y SuperBlock T20-PBS al 20 % (Pierce)) y en segundo lugar durante 90 minutos adicionales con concentraciones variables de los ligandos indicados en tampón BB. Las placas se lavaron con tampón WB (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween-20 al 0,05 %) y se hizo la detección usando streptactin-HRP (IBA GmbH) en tampón BB. Las placas se lavaron y revelaron con sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics). Se determinó la absorción a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25 % como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

#### 1.8 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD (para comparación)

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

#### 1.9 ELISA para la cuantificación de construcciones de TRAIL en sueros de ratón (para comparación)

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

Se recubrieron placas ELISA durante 1 h a 37 °C con 2 µg/ml de anticuerpo de ratón anti-TRAIL (clon RIK-2; Pharmingen). Después de lavar con PBS + Tween-20 al 0,1 % y bloquear la placa durante 30 min a 37 °C con StartingBlock™ (Pierce), se añadieron muestras de suero a una concentración del 0,2 % y 5 %, muestras de calibración y muestras de control y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Las muestras de calibración y control se prepararon a partir del lote respectivo de TRAIL (TRAIL-ASPD o TRAIL-ASPD-F335A o TRAIL-ASPD-F335D) y se suplementaron con suero al 0,2 % o 5 % de ratón CD1 combinado sin tratar para justificar los efectos potenciales de la matriz. Las muestras de control (concentración alta, media y baja de la construcción de TRAIL) se añadieron como controles de calidad para asegurar la precisión y exactitud de la cuantificación de TRAIL en la ventana de ensayo dada. Las placas se lavaron de nuevo y se detectaron las construcciones de TRAIL que contenían la marca Estrep con StrepTactin-POD (IBA) diluido 1:1000. Todas las muestras y proteínas se diluyeron con tampón ELISA (PBS, Tween-20 al 0,1 %, Starting Block al 5 % (Pierce)). La reacción de color se inició después de la adición de 100 µl por pocillo de sustrato TMB (Kem-En-Tec Diagnostics). Se determinó la absorbancia a 450 nm y 630 nm con un lector ELISA después de la adición de 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25 % como solución de parada. Los valores se calcularon como 450 nm - 630 nm con MS Excel.

## 2. Resultados

### 2.1 Caracterización de proteína de fusión de CD95L (CD95L-ASPD) (para comparación)

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

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

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

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

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

#### SEC ID 40 Sp-CD95L-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 346, PM=37682

ORIGEN

```

1  METDTLLLVV LLLWVPGSTG ELRKVAHLTG KNSRSRSMPL E WEDTYGIVLL
SGVKYKGGGL
61  VINETGLYFV YSKVYFRGQS CNNLPLSHKV YMRNSKYPQD LVMMEGKMMS
YCTTGQMWAR
121 SSVVGAVFNL TSADHLYVNV SELSLVNFE E SQTFFGLYKL GSSGSSGSSG
SGLPDVASLR
181  QQVEALQGQV QHLQA AFSQY KKVELFPNGQ SVGEKIFKTA GFVKPFTEAQ
LLCTQAGGQL
241  ASPRSAAENA ALQQLVVAKN EAAFLSMTDS KTEGKFTYPT GESLVYSNWA
PGEPNDDGGS
301  EDCVEIFTNG KWNDRACGEK RLVVCEFGGS PSSSSSSSAWS HPQFEK

```

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

21 - 160: CD95L-dominio de unión a receptor

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

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

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

328 - 338: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

339 - 346: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

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

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

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

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

#### SEC ID 41 Sp-LIGHT-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 356, PM=37931

ORIGEN

```

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

```

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

21 - 170: LIGHT-dominio de unión a receptor

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

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

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

338 - 348: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

349 - 356: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

#### 2.3 Caracterización de proteínas de fusión de TRAIL (para comparación)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se incubaron células HT1080 en la misma placa de 96 pocillos con TRAIL-ASPD o TRAIL-DSPD purificada y trimérica a las concentraciones indicadas. La muerte celular se cuantificó el siguiente día por tinción con violeta cristal. El uso del enlazador D redujo la bioactividad aproximadamente 4,5 veces, como se indica por los valores de CE<sub>50</sub> de 27 ng/ml y 6 ng/ml para TRAIL-DSPD y TRAIL-ASPD, respectivamente. Los resultados se muestran en la Fig. 12.

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

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

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

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

```

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

```

**SEC ID 43 Sp-TRAIL-ASPD**

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40404

5 ORIGEN

```

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

```

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

10 21 - 181: TRAIL-dominio de unión a receptor

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

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

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

349 - 359: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

15 360 - 367: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

**SEC ID 44 Sp-TRAIL-ACCSPD**

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27534

ORIGEN

20



```

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

```

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

#### SEC ID 45 Sp-TRAIL-ACol11

Cantidad total de aminoácidos: 365, PM=40806  
ORIGEN

```

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

```

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

#### SEC ID 46 Sp-TRAIL-ACC11

Cantidad total de aminoácidos: 246, PM=27431  
ORIGEN

```

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

```

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

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

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

construcciones de SPD selectivas de receptor de TRAIL:

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

Se recogieron sobrenadantes tres días post-transfección y se usó una alícuota para SDS-PAGE y transferencia de Western empleando un anticuerpo específico para la marca Estrep II. Se detectaron bandas específicas a aproximadamente 38 kDa (proteínas de fusión de SPD) y 28 kDa (proteínas de fusión de hélice superenrollada-SPD). La cantidad de proteína expresada dependió del propio ligando (TRAILR1mutéina>TRAILR2mutéina>TRAIL), en segundo lugar de la longitud del enlazador usado (A>D) y en tercer lugar del motivo de trimerización usado (SPD>CCSPD). Los pesos moleculares aparentes fueron como se esperaba a partir de los tamaños calculados (40 kDa y 27 kDa para proteínas de fusión de SPD y CCSPD, respectivamente). Los resultados se muestran en la Fig. 13.

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

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

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

Se usó una alícuota de cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad para SDS-PAGE no reductora (**A**) o reductora (**B**) seguida de tinción con plata como se muestra en la Fig. 17. En

condiciones no reductoras, se detectaron dos bandas a 35 y 70 kDa, mientras que se detectó una única banda de 40kDa (indicada por una flecha) en condiciones reductoras. Esto indicó la formación de moléculas unidas por puente disulfuro. La especie trimérica estuvo presente en las fracciones A8 a A11 y se usó para análisis posteriores.

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

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

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

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

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

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

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

#### SEC ID 47 Sp-TRAILR1mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40335  
ORIGEN

```

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

```

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

#### SEC ID 48 Sp-TRAILR2mut-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40401  
ORIGEN

```

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

```

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

#### 2.5 Caracterización de variantes de carbohidrato de SPD

TRAIL-ASPD\_F335A purificada por afinidad se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño cargando 0,5 ml de solución de PBS (0,4 mg de proteína) a una columna Superdex 200 como se muestra en la Fig. 24. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican A1 a A13). El volumen de retención de 12,27 ml corresponde a 135-145 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAIL-ASPD\_F335A es un homotrímero calculado a partir del peso monomérico esperado de 40 kDa. Dos picos adicionales a 8,32 y 10,68 ml indicaron la formación de agregados de TRAIL-ASPD\_F335A. Se usó solamente el pico trimérico para análisis posteriores.

De la cromatografía por exclusión de tamaño se resolvió una alícuota de las fracciones recogidas A1 a A13 por SDS-PAGE reductora y el gel se tiñó con plata (Fig. 25). La banda detectada a aproximadamente 40 kDa correspondía al peso molecular calculado de 40 kDa para TRAIL-ASPD\_F335A. Las fracciones positivas correspondientes a la molécula trimérica (A8, A9, A10) de la ejecución de SEC se combinaron y usaron para análisis adicionales.

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

#### SEC ID 49: Sp-TRAIL-ASPD\_F335A

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40328  
ORIGEN

```

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

```

5

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

10

#### SEC ID 50: Sp-TRAIL-ASPD\_F335D

15

Cantidad total de aminoácidos: 367, PM=40372  
ORIGEN

```

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

```

20

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

25

El efecto citotóxico de TRAIL-ASPD\_F335A sobre células cancerosas humanas se muestra en la Fig. 26. Se incubaron las líneas celulares cancerosas humanas indicadas durante una noche con concentraciones variables de TRAIL-ASPD\_F335A trimérica purificada por afinidad y SEC en presencia o ausencia de anticuerpo de entrecruzamiento (2,5 microgramos/ml de anti marca Estrep II). La viabilidad celular se cuantificó por tinción con violeta cristal (HT1080, HeLa y WM35) o MTS (Colo205). El aumento de la viabilidad celular de Colo205 a altas concentraciones de ligando probablemente se debe a la limitación del anticuerpo de entrecruzamiento.

35

TRAIL-ASPD\_F335D purificada por afinidad se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño cargando 0,5 ml (0,2 mg de proteína) a una columna Superdex 200 como se muestra en la Fig. 27. Las proteínas se resolvieron a 0,5 ml/minuto con PBS como tampón de ejecución y se recogieron fracciones de 0,5 ml (se indican A1 a A13). El volumen de retención de 12,29 ml corresponde a 135-145 kDa determinado a partir del patrón de exclusión por tamaño. Esto indicó que TRAIL-ASPD\_F335D es un homotrímero calculado a partir del peso monomérico esperado de 40 kDa. El pico a 8,35 correspondía a agregados de TRAIL-ASPD\_F335D inactiva típicamente encontrados para todas las proteínas de fusión que contienen partes de la secuencia de aminoácidos de TRAIL de tipo silvestre.

40

De la cromatografía por exclusión de tamaño se resolvieron alícuotas de TRAIL-ASPD\_F335D purificada por

afinidad de las fracciones recogidas A1 a A13 por SDS-PAGE reductora y el gel se tiñó con plata (Fig. 28). Las bandas detectadas a aproximadamente 40 kDa (indicadas por una flecha) correspondían al peso molecular calculado de 40 kDa para TRAIL-ASPD\_F335D. Las fracciones que contenían proteína trimérica (fracciones A8 a A10) se combinaron y usaron para análisis adicionales.

Se incubaron las líneas celulares cancerosas humanas HT1080 (A), HeLa (B), WM35 (C) o Colo205 (D) durante una noche con concentraciones variables de TRAIL-ASPD\_F335D trimérica purificada por afinidad en presencia o ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento (anti-marca Estrep II). Se cuantificó la viabilidad celular por tinción con violeta cristal (HT1080, HeLa y WM35) o MTS (Colo205). Los datos muestran que TRAIL-ASPD\_F335D es capaz de inducir muerte celular en las líneas celulares cancerosas ejemplificadas (Fig. 29). El aumento de la viabilidad celular de Colo205 a altas concentraciones de ligando probablemente se debe a la limitación del anticuerpo de entrecruzamiento.

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

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

Además, un ligando donde SP-D no tenga función de carbohidrato puede ser deseable en otros entornos. Para SP-D humana se ha descrito un mutante en que el aminoácido fenilalanina 335 (correspondiente al aminoácido 355 de la SEC ID N.º 21) se ha mutado en alanina (SPD\_F335A, Crouch et al., JBC 281: 18008-18014). Este mutante mostró unión muy débil a carbohidrato. Sin embargo, introducir un aminoácido cargado (por ejemplo, un aminoácido ácido) puede ser incluso mejor en comparación con F335A si no se desea unión a carbohidrato. Por lo tanto, el mutante SPD\_F335D puede ser superior hacia el mutante F335A.

Para analizar la unión de las proteínas de fusión de TRAIL a carbohidratos, se inmovilizó manano de levadura en microplacas y se detectó la unión de TRAIL-SPD, TRAIL-SPO\_F335A o TRAIL-SPD\_F335D por ELISA. Los resultados se muestran en la Fig. 30. Como se esperaba, la señal ELISA aumentó con concentraciones crecientes de TRAIL-ASPD. En contraste, la forma mutante de carbohidrato TRAIL-ASPD\_F335A mostró una señal ELISA muy baja. Además, la nueva variante construida TRAIL-ASPD\_F335D presentó la señal ELISA más baja (véase el recuadro y la flecha). Esto indicó que el mutante F335D tiene una afinidad de unión a manano inferior en comparación con la forma mutante de SP-D descrita previamente F335A.

## 2.7 Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-SPD (para comparación)

Para determinar las semi-vidas de la proteína de fusión TRAIL-SPD, se inyectaron diez microgramos de TRAIL-ASPD (A) o TRAIL-ASPD\_F335D (B) por vía intravenosa en ratones CD1 macho y se recogieron muestras de suero después de varios puntos temporales (predosis, 5 min, 30 min, 2 h, 6 h y 24 h). Se cuantificaron las proteínas TRAIL en sueros de los ratones por un ELISA y los datos se usaron para calcular las semi-vidas. Los resultados se muestran en la Fig. 31. Para las dos proteínas analizadas, se calculó una semi-vida de 7 a 14 horas para TRAIL-ASPD (A) y TRAIL-ASPD\_F335D (B). Ningún animal murió o mostró signos de intolerancia durante el periodo observado. Los datos indican una mejora de al menos 80 veces de la semi-vida en suero en comparación con TRAIL de tipo silvestre que se informó que tenía una semi-vida en el intervalo de tres a cinco minutos en roedores (Kelley et. al 2001).

## 2.8 Citotoxicidad de proteína de fusión TRAIL-ASPD (para comparación)

Para analizar los potenciales efectos hepatotóxicos de TRAIL-ASPD, TRAIL-ASPD\_F335A o TRAIL-ASPD\_F335D, se incubaron hepatocitos humanos primarios (PHH) con concentraciones variables de las proteínas de fusión TRAIL-SPD indicadas, con o sin anticuerpos de entrecruzamiento (anti-marca Estrep II). Como control, se usó una variante estabilizada de CD95L, CD95L-T4 (descrita en el documento WO2008/025516). Los resultados se muestran en la Fig. 32.

Además, se analizó el efecto de una incubación simultánea de PHH con fármacos quimioterapéuticos 5 mM para TRAIL-ASPD\_F335D. Después de 5 h (A, B y E) o 24 h (C, D y F) de incubación, se lisaron las células y se evaluó la actividad caspasa con un ensayo fluorogénico.

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

los ligandos se entrecruzaban de forma secundaria por anticuerpos. En contraste, CD95L-T4 es hepatotóxica como se indica por un aumento de la caspasa activa (A a D). Cinco horas de co-incubación de hepatocitos humanos primarios con TRAIL-ASPD\_F335D trimérica junto con fármacos quimioterapéuticos no indujeron actividad caspasa (E). Sin embargo, después de 24 h de co-incubación con doxorubicina, TRAIL-ASPD\_F335D soluble indujo una fuerte señal de actividad caspasa (F).

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

## 2.9 Caracterización de proteínas de fusión de APRIL (para comparación)

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

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

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

### SEC ID 51: Sp-APRIL-ASPD

Cantidad total de aminoácidos: 344, PM=37120

ORIGEN

```

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

```

1 - 20: Péptido señal de secreción (subrayado)

21 - 158: APRIL-RBD

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

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

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

326 - 336: Elemento enlazador (GGSPSSSSSSA)

337 - 344: Marca Estrep II (WSHPQFEK)

### Referencias

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

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

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

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

La presente descripción se caracteriza adicionalmente por los siguientes puntos:

1. Una proteína de fusión que comprende

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

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

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

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

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

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

7. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-6, en la que (i) se selecciona entre LTA (SEC ID N.º 1), TNFα (SEC ID N.º 2), LTB (SEC ID N.º 3), OX40L (SEC ID N.º 4), CD40L (SEC ID N.º 5), CD95L (SEC ID N.º 6), CD27L (SEC ID N.º 7), CD30L (SEC ID N.º 8), CD137L (SEC ID N.º 9), TRAIL (SEC ID N.º 10), RANKL (SEC ID N.º 11), TWEAK (SEC ID N.º 12), APRIL 1 (SEC ID N.º 13), APRIL 2 (SEC ID N.º 14), BAFF (SEC ID N.º 15), LIGHT (SEC ID N.º 16), TL1A (SEC ID N.º 17), GITRL (SEC ID N.º 18), EDA-A1 (SEC ID N.º 19), EDA-A2 (SEC ID N.º 20), o un dominio de unión a receptor de las mismas.

8. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) comprende los aminoácidos 59-205 o 60-205 de LTA (SEC ID N.º 1), 86-233 de TNFα (SEC ID N.º 2), 82-244 o 86-244 de LTB (SEC ID N.º 3), 52-183 o 55-183 de OX40L (SEC ID N.º 4), 112-261 o 117-261 de CD40L (SEC ID N.º 5), 51-193 o 56-193 de CD27L (SEC ID N.º 7), 97-234, 98-234 o 102-234 de CD30L (SEC ID N.º 8), 86-254 de CD137L (SEC ID N.º 9), 161-317 de RANKL (SEC ID N.º 11), 103-249, 104-249 o 105-249 de TWEAK (SEC ID N.º 12), 111-247 o 112-247 de APRIL 1 (SEC ID N.º 13), 111-247 o 112-250 de APRIL 2 (SEC ID N.º 14), 140-285 de BAFF (SEC ID N.º 15), 91-240 de LIGHT (SEC ID N.º 16), 91-251 o 93-251 de TL1A (SEC ID N.º 17), 52-177 de GITRL (SEC ID N.º 18), 245-391 de EDA-A1 (SEC ID N.º 19), 245-389 de EDA-A2 (SEC ID N.º 20).

9. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) es CD95L o un dominio de unión a receptor de la misma, en la que (i) preferiblemente comprende los aminoácidos 142-281 o 144-281 de CD95L humano (SEC ID N.º 6).

10. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-7, en la que (i) es TRAIL o un dominio de unión a receptor del mismo, en la que (i) preferiblemente comprende los aminoácidos 95-281, 116-281, 117-281, 118-281, 119-281 o 120-281 de TRAIL humano (SEC ID N.º 10).

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

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

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



siguientes posiciones de aminoácido de TRAIL humano (SEC ID N.º 10): R130, G160, Y189, R191, Q193, E195, N199, K201, Y213, T214, S215, H264, I266, D267, D269, y en la que la sustitución de aminoácido es preferiblemente al menos una de las siguientes: R130E, G160M, Y189A, Y189Q, R191K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, K201R, Y213W, T214R, S215D, H264R, I266L, D267Q, D269H, D269R, o D269K.

14. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-13, en la que (ii) es la proteína tensioactiva D, la proteína tensioactiva A, la proteína de unión a manano A, la proteína de unión a manano C, colectina del hígado 1, colectina de placenta 1, o colectina-11.

15. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14, en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21.

16. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14, en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257, 224-257, o 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21.

17. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-15, en la que (ii) comprende al menos una sustitución de aminoácido.

18. Proteína de fusión del punto 17, en la que la sustitución de aminoácido afecta a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y en la que la sustitución de aminoácido es preferiblemente una de las siguientes: F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K, o F355R.

19. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-18, en la que (ii) comprende un mutante que no se une a manosa.

20. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14 o 19, en la que (ii) comprende los aminoácidos 110-271, 116-271, o 121-271 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22.

21. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-14 o 19, en la que (ii) comprende los aminoácidos 110-147, 110-148, 110-149, 110-150, 110-151, 116-147, 116-148, 116-149, 116-150, 116-151, 121-147, 121-148, 121-149, 121-150, o 121-151 de colectina-11 humana de la SEC ID N.º 22.

22. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-21, en la que (ii) está localizado de forma C-terminal de (i).

23. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-21, en la que (ii) está localizado de forma N-terminal de (i).

24. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-23, que comprende adicionalmente un dominio de péptido señal N-terminal, que puede comprender un sitio de escisión por proteasa, en la que el dominio de péptido señal N-terminal preferiblemente comprende la secuencia de la SEC ID N.º 23, SEC ID N.º 24, o SEC ID N.º 25.

25. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-24, que comprende la secuencia de la SEC ID N.º 26, SEC ID N.º 36, SEC ID N.º 37, SEC ID N.º 40-41 o SEC ID N.º 43-51.

26. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-25, en la que la proteína de fusión comprende adicionalmente un dominio de reconocimiento/purificación, que está localizado preferiblemente en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal.

27. Proteína de fusión del punto 26, en la que el dominio de reconocimiento/purificación es una marca Estrep o un dominio poli-His.

28. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-27, que comprende adicionalmente un elemento flexible terminal que puede incluir y/o conectar con el dominio de reconocimiento/purificación.

29. Proteína de fusión de cualquiera de los puntos 1-28, que está presente como un complejo trimérico o como un oligómero del complejo trimérico.

30. Proteína de fusión del punto 29, en la que el complejo se forma por enlace covalente entre tres proteínas de fusión, y en la que el enlace covalente preferiblemente consiste en puentes disulfuro entre cisteínas de (ii).

31. Proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 29-30, en la que el complejo consiste en tres proteínas de fusión idénticas.

32. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de uno cualquiera de los puntos 1-28.

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

**Lista de secuencias**

<110> Apogenix GmbH

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

<130> 40623PEP-WO-1

10 <150> PCT/EP2008/005644

<151> 10-07-2008

<150> EP08773964

<151> 10-07-2008

15 <160> 62

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> LTB humana

<400> 1

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> TNFa humano

<400> 2

# ES 2 567 704 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225           230

```

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> LTA humana

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> LTB humana

10 <400> 3

```

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

<210> 4

<211> 183

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> OX40L humano

<400> 4

# ES 2 567 704 T3

```

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

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
          20          25          30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
          35          40          45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
          50          55          60

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

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
          85          90          95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
          100          105          110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
          115          120          125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
          130          135          140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145          150          155          160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
          165          170          175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
          180

```

```

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

```

```

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
   <223> CD40L humano

```

```

<400> 5

```



# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> CD95L humano

<400> 6

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

# ES 2 567 704 T3

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

# ES 2 567 704 T3

275

280

<210> 7

<211> 193

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> CD27L humano

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro

5      <210> 8  
         <211> 234  
         <212> PRT  
         <213> Homo sapiens  
  
         <220>  
         <221> MISC\_FEATURE  
         <223> CD30L humano  
10      <400> 8

# ES 2 567 704 T3

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

<210> 9

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; CD137L humano

5

&lt;400&gt; 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 281

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> TRAIL humano

<400> 10



# ES 2 567 704 T3

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

# ES 2 567 704 T3

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
275 280

<210> 11

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> RANKL humano

<400> 11

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn  
85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile  
100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln  
115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys  
130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu  
145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro  
165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly  
180 185 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val  
195 200 205

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

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val  
225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met  
245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe  
260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu  
275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp  
290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp  
305 310 315

# ES 2 567 704 T3

<210> 12  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> TWEAK humana  
 10  
 <400> 12  
  
 Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro  
 1 5 10 15  
  
 Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu  
 20 25 30  
  
 Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala  
 35 40 45  
  
 Ser Leu Ser Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu  
 50 55 60  
  
 Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp  
 65 70 75 80  
  
 Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro  
 85 90 95  
  
 Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu  
 100 105 110  
  
 Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly  
 115 120 125  
  
 Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu  
 130 135 140  
  
 Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu  
 145 150 155 160  
  
 Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr  
 165 170 175  
  
 Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu  
 180 185 190  
  
 Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg  
 195 200 205

# ES 2 567 704 T3

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

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

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His  
245

<210> 13

<211> 247

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> APRIL\_ver1 humano

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

165

170

175

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

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

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

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

His Gly Thr Phe Leu Gly Leu  
245

<210> 14

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> APRIL\_ver2 humano

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> BAFF humana

<400> 15

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

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

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

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

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

15

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <223> LIGHT humana

<400> 16



# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211>251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> TL1A humana

5

<400> 17

ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> GITRL humano

10

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

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

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> EDA-A1 humana

<400> 19

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser  
 385 390

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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> EDA-A2 humana

<400> 20

# ES 2 567 704 T3

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

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

# ES 2 567 704 T3

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



# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Pro Ala Ser  
385

<210>21

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

5

10

# ES 2 567 704 T3

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

# ES 2 567 704 T3

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

5

<400> 22

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido señal

10

<400> 23

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

Val Gln Cys

<210> 24

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido señal

<400> 24

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

Gly Ser Thr Gly  
20

25 <210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> péptido señal

<400> 25

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

Ala Gly Asn Gly  
20

35

<210> 26

<211> 339

<212> PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; proteína de fusión SP-hsTrailsin-SPD-construcción-1

5

&lt;400&gt; 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

210

215

220

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

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Phe

<210> 27

<211> 343

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Leu Val Val Cys Glu Phe

<210> 28  
<211> 225  
<212> PRT  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> proteína de fusión  
  
10 <400> 28



# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly  
225

<210> 29  
<211> 338  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; proteína de fusión SP-hsTrailsin-col11-construcción-1

5 &lt;400&gt; 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Met

<210> 30

<211> 342

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión SP-hsTrailsin-col11-construcción-2

<400> 30

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

Phe Asp Lys Glu Asn Met  
 340

<210> 31

<211> 222

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10

<400> 31

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión FIAG-hCol11-hTRAIL\_Glu116\_Gly281

10

&lt;400&gt; 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 &lt;210&gt; 33

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

5 <220>  
<223> proteína de fusión FLAG-hCol11s-hTRAIL\_Glu116\_Gly281  
<400> 33



# ES 2 567 704 T3

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

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; proteína de fusión hCol11s-hTRAIL\_Glu116\_Gly281

5 &lt;400&gt; 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly  
 225

<210> 35  
 <211>247  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> proteína de fusión FLAG-hCol11-GSS-hTRAIL\_Glu116\_Gly281  
 10 <400> 35  
 Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
  
 Val Gln Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Leu Pro Cys Glu  
 20 25 30  
  
 Cys Ser Gln Leu Arg Lys Ala Ile Gly Glu Met Asp Asn Gln Val Ser  
 35 40 45  
  
 Gln Leu Thr Ser Glu Leu Lys Phe Ile Lys Asn Ala Val Ala Gly Val  
 50 55 60  
  
 Arg Glu Thr Glu Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser  
 65 70 75 80  
  
 Gly Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg  
 85 90 95  
  
 Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala  
 100 105 110  
  
 Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser  
 115 120 125

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly  
245

<210> 36

<211> 237

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp1-hTRAIL-Glu116\_Gly281-GSS-col11

<400> 36

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37  
<211> 238

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> proteína de fusión Sp3-hTRAIL\_Glu116\_Gly281-GSS-col11

<400> 37

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 1045

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> secuencia codificante correspondiente a la SEC ID N.º 26 SP-hsTrailsin-SPD-construcción-1

<400> 38

# ES 2 567 704 T3

aagcttgccg ccaccatgga gaccgataca ctgctcttgt ggggtgctctt gctgtgggtt	60
cctgcaggta atgggtcaaag agtcgcagct cacatcactg ggactagagg caggagtaac	120
accctgagtt ctcccaattc caagaacgag aaagccctgg gtaggaagat caactcctgg	180
gaaagctcca gaagcggcca tagctttctt agcaacctcc acttgaggaa tggcgaactt	240
gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tacagccaga cgtacttcag gttccaggag	300
gaaatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatgggtgc aatacatcta caagtacacg	360
tcataccctg atcctatact gctgatgaag tccgccagaa acagttgctg gagcaaagac	420
gctgaatacg gcctgtattc catctatcag ggcggtatct ttgaactcaa ggagaacgac	480
aggatcttog tgtctgtgac aaacgagcat ctgatcgaca tggaccatga agcgtctttc	540
ttcgggtgct tcttggtggg atcoggtttg ccagatgttg cttctttgag acaacagggt	600
gaggctttgc aggggtcaagt ccagcacttg caggctgctt tctctcaata caagaagggt	660
gagttgttcc caaatggtca atctgttggc gaaaagattt tcaagactgc tggtttcgtc	720
aaaccattca cggaggcaca attatttgtt actcaggctg gtggacagtt ggcctctcca	780
cgttctgcog ctgagaacgc cgcottgcaa caattagtcg tagctaagaa cgaggctgct	840
ttcttgagca tgactgattc caagacagag ggcaagttca cctacccaac aggagaatcc	900
ttggtctatt ctaattgggc acctggagag cccaacgatg atggcggctc agaggactgt	960
gtggaaatct tcaccaatgg caagtggaat gacagagctt gtggagagaa gcgtttggtg	1020
gtctgtgagt tctaatagcg gccgc	1045

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

<220>  
 <223> secuencia codificante correspondiente a la SEC ID N.º 27 SP-hsTrailsin-SPD-construcción-2

<400> 39



# ES 2 567 704 T3

```

aagcttgccg ccaccatgga gaccgatata ctgctcttgt ggggtactctt gctgtggggt 60
ccgggatcta ccggtgaacg tggtcctcaa agagtgcgag ctacatcac tgggactaga 120
ggcaggagta acaccctgag ttctcccaat tccaagaacg agaaagccct gggtaggaag 180
atcaactcct gggaaagctc cagaagcggc catagcttct ttagcaacct ccacttgagg 240
aatggcgaaac ttgtgatcca tgagaagggc ttctactaca tctacagcca gacgtacttc 300
aggttccagg aggaaatcaa ggagaacacc aagaacgaca agcagatggt gcaatacatc 360
tacaagtaca cgtcatacc cgtatctata ctgctgatga agtccgccag aaacagttgc 420
tggagcaaag acgctgaata cggcctgtat tccatctatc agggcggtat ctttgaactc 480
aaggagaacg acaggatctt cgtgtctgtg acaaacgagc atctgatga catggaccat 540
gaagcgtctt tcttcgggtgc cttcttggtg ggatccggtt tgccagatgt tgcttctttg 600
agacaacagg ttgaggcttt gcagggtcaa gtccagcact tgcaggctgc tttctctcaa 660
tacaagaagg ttgagttggt cccaaatggt caatctgttg gcgaaaagat tttcaagact 720
gctggtttcg tcaaacatt caccgaggca caattattgt gtactcaggc tgggtggacag 780
ttggcctctc cacttctgc cgtgagaac gccgccttgc aacaattagt cgtagctaag 840
aacgaggctg ctttcttgag catgactgat tccaagacag agggcaagtt cacctacca 900

acaggagaat ccttgggtcta ttctaattgg gcacctggag agcccaacga tgatggcggc 960
tcagaggact gtgtggaaat cttcaccaat ggcaagtgga atgacagagc ttgtggagag 1020
aagcgtttgg tggctctgta gttctaatag cggccgc 1057

```

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

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

<400> 40

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 356

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 41

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

# ES 2 567 704 T3

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

Phe Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro  
340 345 350

Gln Phe Glu Lys  
355

<210> 42  
<211> 1129  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> casete de expresión de Sp-TRAIL-ASPD

<400> 42

```
aagcttgccg ccaccatgga gaccgataca ctgctcttgt ggggtgctctt gctgtgggtt      60
cctgcaggta atgggtcaaag agtcgcagct cacatcactg ggactagagg caggagtaac      120
acctgagtt ctcccaattc caagaacgag aaagccctgg gtaggaagat caactcctgg      180
gaaagctcca gaagcggcca tagctttctt agcaacctcc acttgaggaa tggcgaactt      240
gtgatccatg agaagggctt ctactacatc tacagccaga cgtacttcag gttccaggag      300
gaaatcaagg agaacaccaa gaacgacaag cagatgggtgc aatacatcta caagtacacg      360
tcataccctg atcctatact gctgatgaag tccgccagaa acagttgctg gagcaaagac      420
gctgaatacg gcctgtattc catctatcag ggcgggtatct ttgaactcaa ggagaacgac      480
aggatcttcg tgtctgtgac aaacgagcat ctgatcgaca tggaccatga agcgtctttc      540
ttcgggtgctt tcttgggtggg atcctctggt tcgagtgggt cgagtgggtt tggattgcca      600
gacgttgctt ctttgagaca acaggttgag gctttgcagg gtcaagtcca gcacttgacg      660
gctgctttct ctcaatacaa gaaggttgag ttgttcccaa acggtcaatc tgttggcgaa      720
aagattttca agactgctgg tttcgtcaaa ccattcacgg aggcacaatt attgtgtact      780
caggctgggtg gacagttggc ctctccacgt tctgccgctg agaacgccgc cttgcaacag      840
ttgggtcgtag ctaagaacga ggctgctttc ttgagcatga ctgattccaa gacagagggc      900
aagttcacct acccaacagg agaatccttg gtctattcta attgggcacc tggagagccc      960
aacgatgatg gcggctcaga ggactgtgtg gaaatcttca ccaatggcaa gtggaatgac     1020
agagcttggtg gagagaagcg tttgggtggc tgtgagttcg gaggcagtc ttcactttca     1080
tctagctctg cctggtcgca tccacaattc gagaaataat agcggccgc      1129
```

<210> 43  
<211> 367  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD

5 <400> 43

# ES 2 567 704 T3

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

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

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

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro  
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 44

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACCSPD

10

<400> 44



# ES 2 567 704 T3

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

<210> 45  
 <211> 365  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACol11

<400> 45

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

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

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

10

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe

# ES 2 567 704 T3

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

Met Val Ala Ser Gly Gly Trp Asn Asp Val Ala Cys His Thr Thr Met  
325 330 335

Tyr Phe Met Cys Glu Phe Asp Lys Glu Asn Met Gly Ser Pro Ser Ser  
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 46

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ACC11

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

165

170

175

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

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

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

Arg Glu Thr Glu Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser  
225 230 235 240

His Pro Gln Phe Glu Lys  
245

<210> 47

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAILR1mut-ASPD

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 567 704 T3

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

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

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

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

Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln  
195 200 205

Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val  
210 215 220

Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr  
225 230 235 240

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

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

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

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

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

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

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro  
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 48

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAILR2mut-ASPD

5 <400> 48

# ES 2 567 704 T3

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



# ES 2 567 704 T3

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

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

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

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

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

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

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro  
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 49

<211> 367

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD\_F335A

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Ile	Lys	Glu	Asn	Thr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Val	Gln	Tyr	Ile	Tyr	100	105	110
Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ile	Leu	Leu	Met	Lys	Ser	Ala	Arg	115	120	125
Asn	Ser	Cys	Trp	Ser	Lys	Asp	Ala	Glu	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Ser	Ile	Tyr	130	135	140
Gln	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	145	150	155
Val	Thr	Asn	Glu	His	Leu	Ile	Asp	Met	Asp	His	Glu	Ala	Ser	Phe	Phe	165	170	175
Gly	Ala	Phe	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	180	185	190
Gly	Leu	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Leu	Arg	Gln	Gln	Val	Glu	Ala	Leu	Gln	195	200	205
Gly	Gln	Val	Gln	His	Leu	Gln	Ala	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Lys	Lys	Val	210	215	220
Glu	Leu	Phe	Pro	Asn	Gly	Gln	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Ile	Phe	Lys	Thr	225	230	235
Ala	Gly	Phe	Val	Lys	Pro	Phe	Thr	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Cys	Thr	Gln	245	250	255
Ala	Gly	Gly	Gln	Leu	Ala	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Glu	Asn	Ala	Ala	260	265	270
Leu	Gln	Gln	Leu	Val	Val	Ala	Lys	Asn	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser	Met	275	280	285
Thr	Asp	Ser	Lys	Thr	Glu	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	Pro	Thr	Gly	Glu	Ser	290	295	300
Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Trp	Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Asn	Asp	Asp	Gly	Gly	305	310	315
Ser	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Ile	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Trp	Asn	Asp	Arg	325	330	335
Ala	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Val	Val	Cys	Glu	Phe	Gly	Gly	Ser	Pro	340	345	350

# ES 2 567 704 T3

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 50

<211> 367

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Sp-TRAIL-ASPD\_F335D

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln  
195 200 205

# ES 2 567 704 T3

Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val  
210 215 220

Glu Leu Phe Pro Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr  
225 230 235 240

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

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

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

Thr Asp Ser Lys Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

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

Ser Glu Asp Cys Val Glu Ile Asp Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg  
325 330 335

Ala Cys Gly Glu Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro  
340 345 350

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
355 360 365

<210> 51

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 51

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

Ala Gly Asn Gly Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn  
20 25 30

Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro  
35 40 45

Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg  
50 55 60

# ES 2 567 704 T3

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

Val Val Cys Glu Phe Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
325 330 335

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
340

<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> INDICADOR-epítopo/sitio de procesamiento por enteroquinasa  
<400> 52

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp  
1 5

<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> elemento enlazador flexible

<220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (1)..(3)  
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (4)..(6)  
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<220>  
<221> REPETICIÓN  
<222> (7)..(9)  
<223> 0,1,2,3,4,5 o 6

<400> 53

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Gly Ser Gly  
1 5

<210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> enlazador A

<400> 54

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

<210> 55  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

	<220>	
	<223> enlazador B	
5	<400> 55	
		Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser
		1 5
	<210> 56	
	<211> 5	
10	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> enlazador C	
15	<400> 56	
		Gly Ser Ser Gly Ser
		1 5
	<210> 57	
20	<211> 2	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> enlazador D	
	<400> 57	
		Gly Ser
		1
30	<210> 58	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> marca Estrep II	
	<400> 58	
		Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
		1 5
40	<210> 59	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> elemento enlazador flexible	
	<400> 59	
		Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala
		1 5
50	<210> 60	
	<211> 11	
	<212> PRT	
55	<213> Artificial	

# ES 2 567 704 T3

<220>  
 <223> elemento enlazador

5 <400> 60

Gly Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 1 5 10

<210> 61  
 <211> 10  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento enlazador

15 <400> 61

Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 1 5 10

<210> 62  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> elemento enlazador

25 <400> 62

Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 1 5

30



## REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende

- (i) una citoquina LIGHT, o un dominio de unión a receptor de la misma, y  
 (ii) un dominio de trimerización de colectina que comprende la proteína tensioactiva D o el dominio de cuello y de unión a carbohidrato de la proteína tensioactiva D, en la que (i) comprende los aminoácidos 91-240 de la SEC ID N.º 16, y en la que (ii) comprende los aminoácidos 225-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y

en la que (ii) está localizado de forma C-terminal de (i).

2. Proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un elemento enlazador flexible entre (i) y (ii), en la que el elemento enlazador flexible preferiblemente tiene una longitud de 3-20 aminoácidos, más preferiblemente una longitud de 3, 6, 9, 10, 12, 15 o 18 aminoácidos.

3. Proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en la que el elemento enlazador flexible es un enlazador de glicina/serina, en la que el elemento enlazador flexible preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos (GSS)<sub>a</sub>(SSG)<sub>b</sub>(GSG)<sub>c</sub> en la que a, b, c es cada uno 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

4. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que (i) es LIGHT (SEC ID N.º 16), o un dominio de unión a receptor de la misma.

5. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4,

- (a) en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-375, 218-375, 219-375, 220-375, 221-375, 222-375, 223-375, 224-375, 225-375 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y/o  
 (b) en la que (ii) comprende los aminoácidos 217-257, 218-257, 219-257, 220-257, 221-257, 222-257, 223-257 o 224-257 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21.

6. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que (ii) comprende los aminoácidos 225-375 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21 y la sustitución de aminoácido afecta a la posición de aminoácido F355 de la proteína tensioactiva humana D de la SEC ID N.º 21, y en la que la sustitución de aminoácido es más preferiblemente una de las siguientes: F355A, F355S, F355T, F355E, F355D, F355K, o F355R.

7. Proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende la secuencia de la SEC ID N.º 41.

8. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Una célula transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

10. Un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8.

11. Una composición farmacéutica que comprende como agente activo una proteína de fusión de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, o una célula de la reivindicación 9.

12. Una composición de diagnóstico que comprende como agente activo una proteína de fusión de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, o una célula de la reivindicación 9.

13. Una proteína de fusión de las reivindicaciones 1-7, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, o una célula de la reivindicación 9 para su uso en terapia, preferiblemente para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos proliferativos, particularmente trastornos causados por, asociados con y/o acompañados por disfunción de citoquinas de TNF, tales como tumores, por ejemplo tumores sólidos o linfáticos, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades metabólicas, trastornos autoinmunes, por ejemplo enfermedades reumatoides y/o artríticas, enfermedades degenerativas, por ejemplo enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedades asociadas a apoptosis y rechazo de trasplantes.

**Figura 1**  
SEC de CD95L-ASPD purificada por afinidad

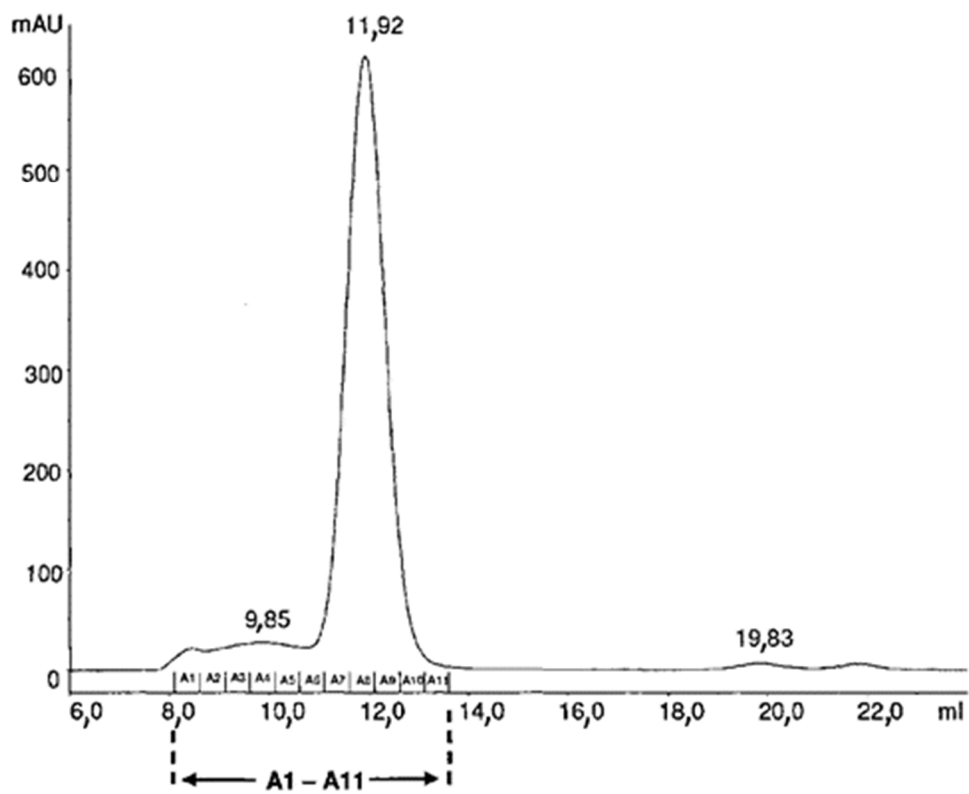


Figura 2

Gel de plata de fracciones SEC A1-A11 de CD95L-ASPD  
purificada por afinidad

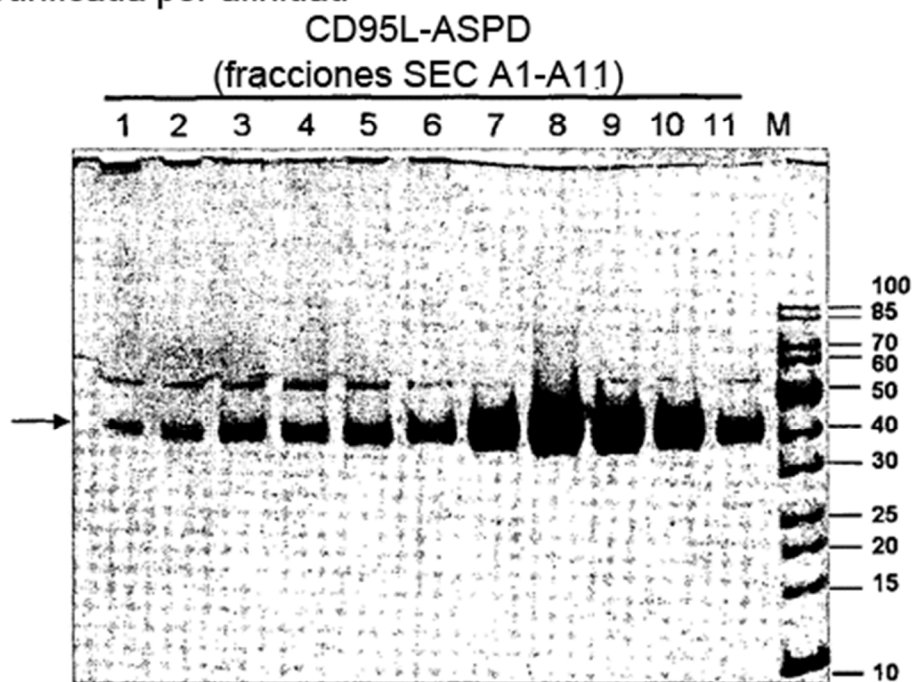


Figura 3

Actividad caspasa en células Jurkat inducida por secciones SEC A1-A15 de CD95L-ASPD purificada por afinidad

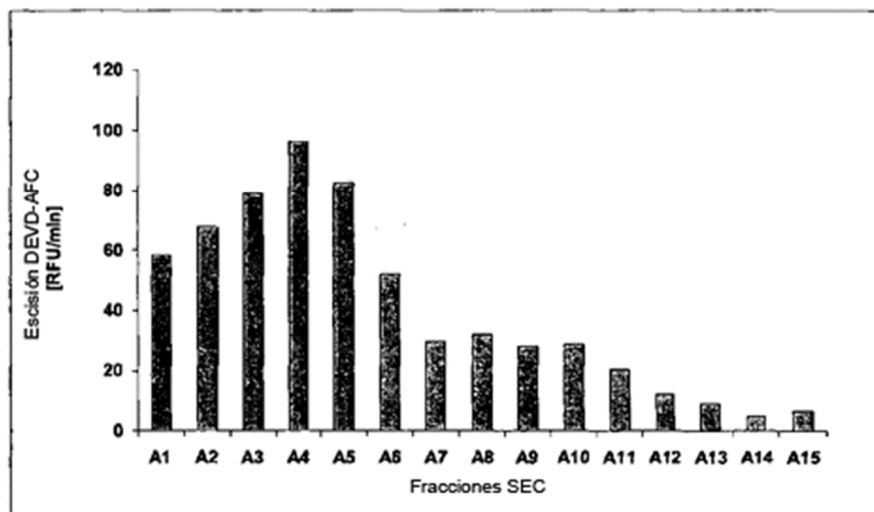


Figura 4

Citotoxicidad de CD95L-ASPD sobre células WM35, HT1080 y HeLa

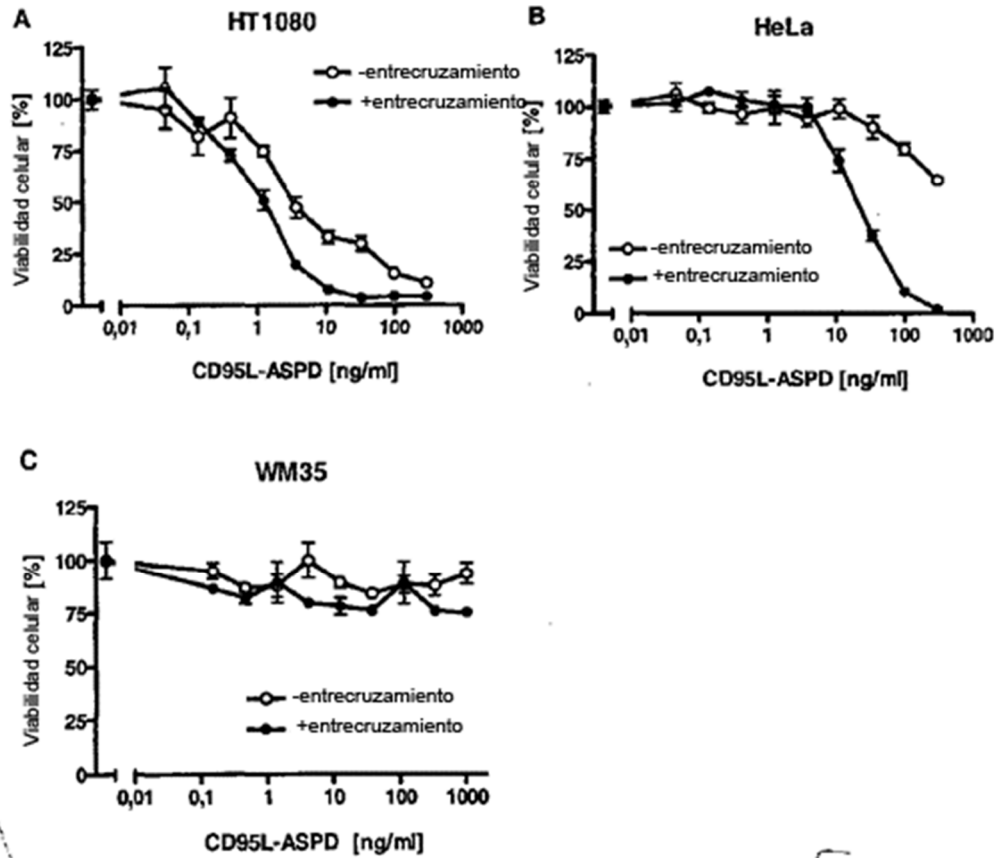


Figura 5

SEC de LIGHT-ASPD purificada por afinidad

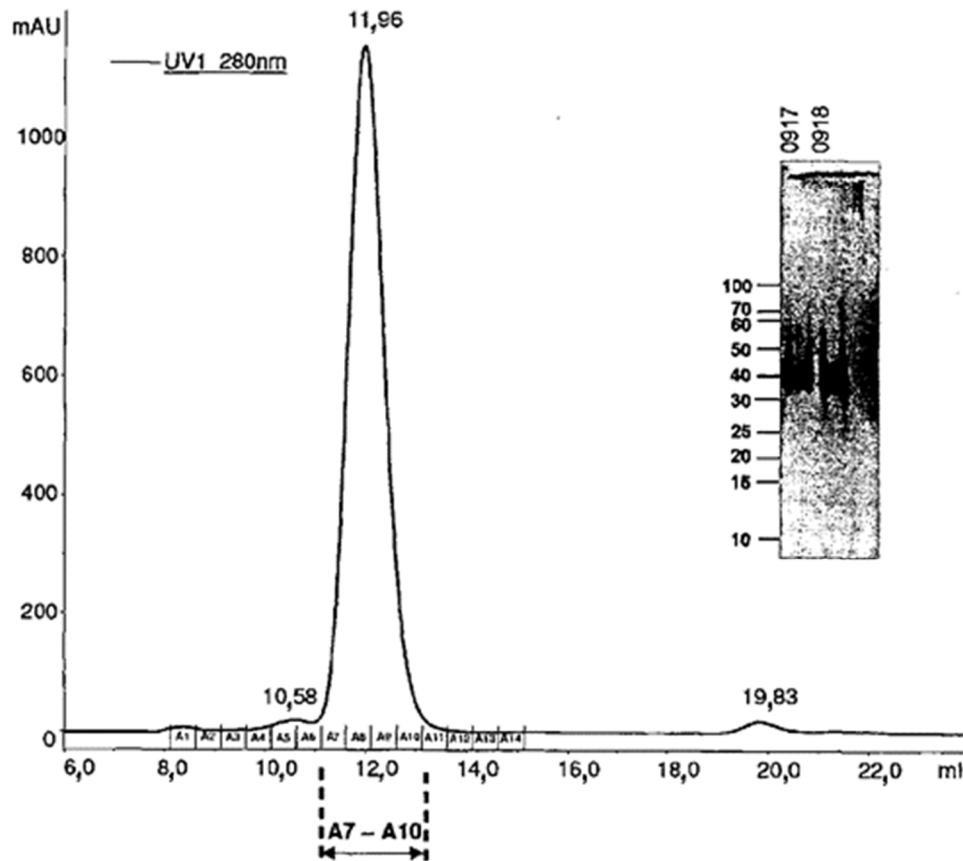


Figura 6

Unión de HVEM-Fc a LIGHT-ASPD inmovilizada

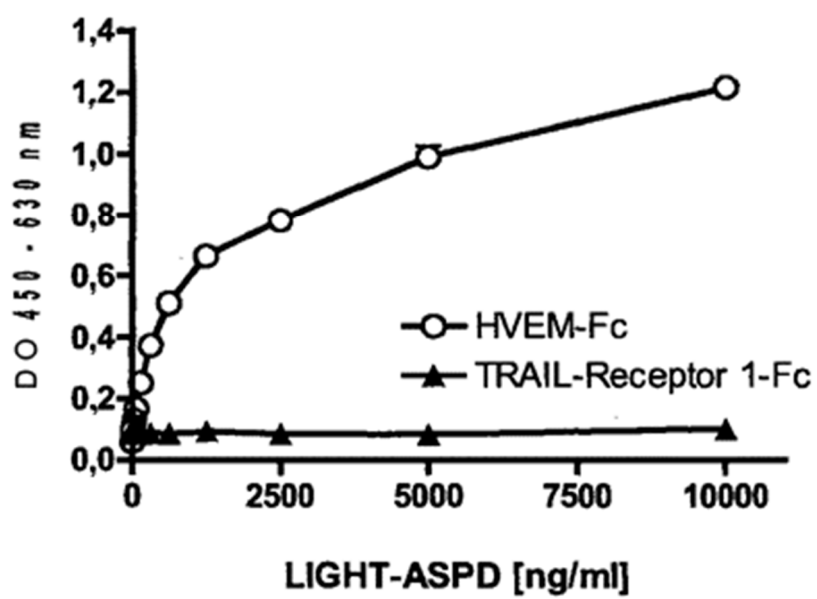


Figura 7

Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones de TRAIL

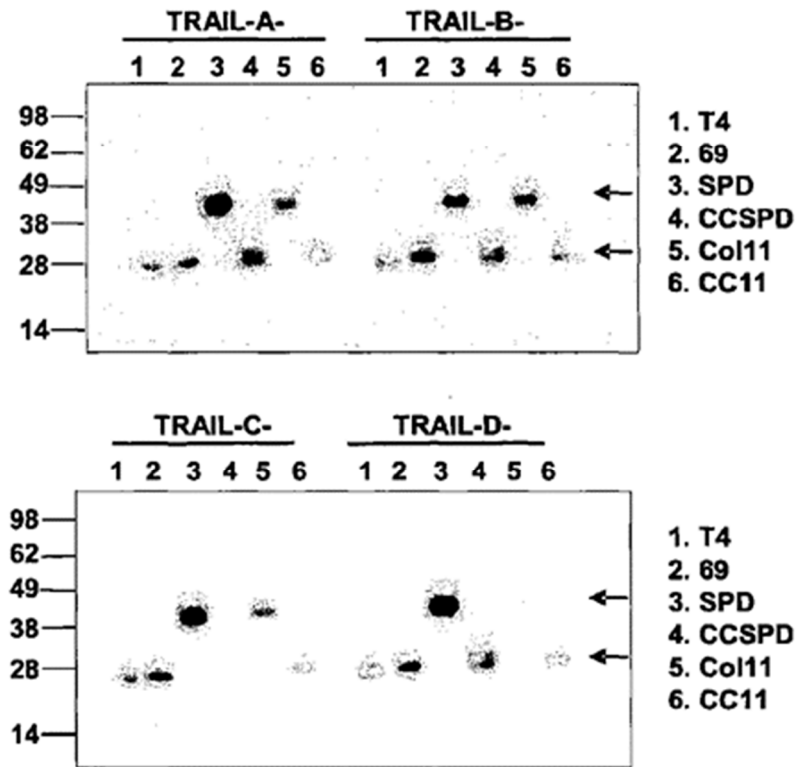




Figura 8

Actividad caspasa en células T Jurkat

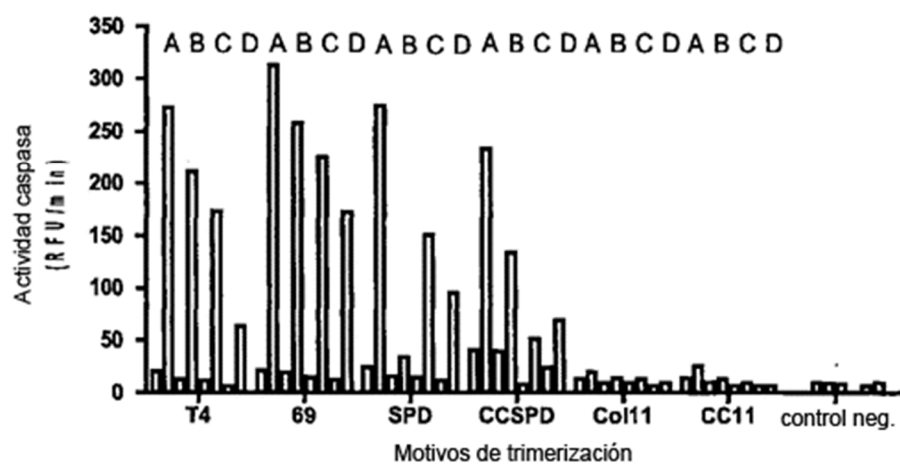


Figura 9

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAIL-ASPD

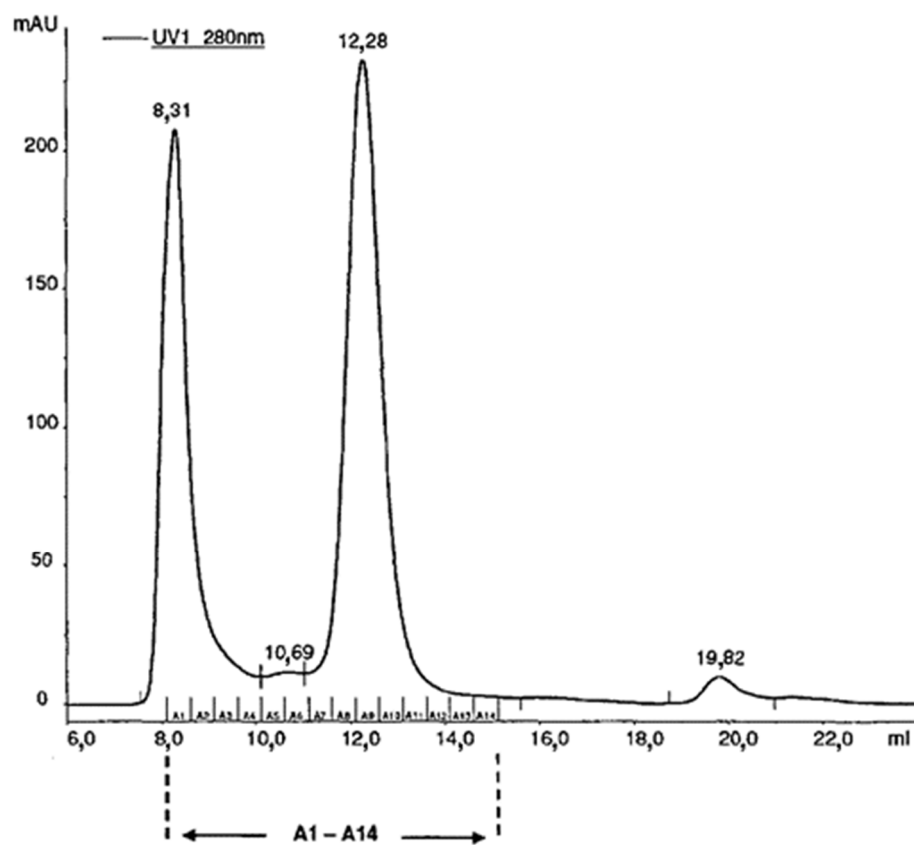


Figura 10

Actividad citotóxica de TRAIL-ASPD contra células cancerosas humanas

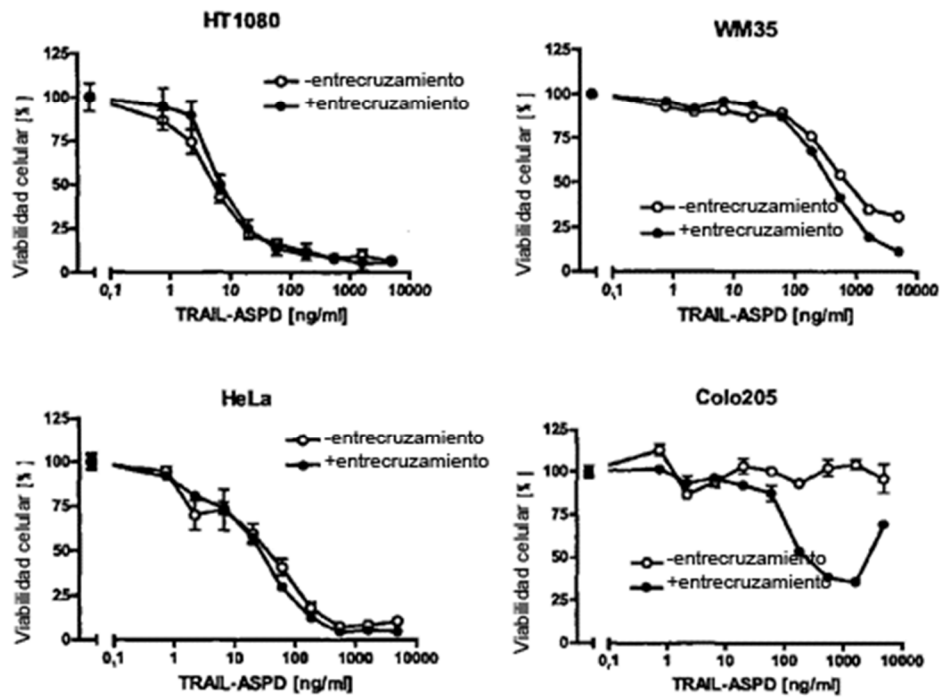
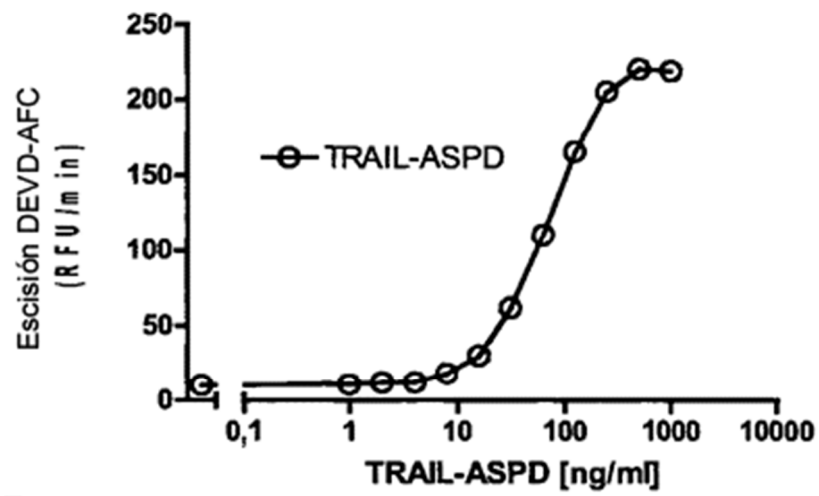


Figura 11

TRAIL-ASPD indujo actividad caspasa en Jurkat

A



B

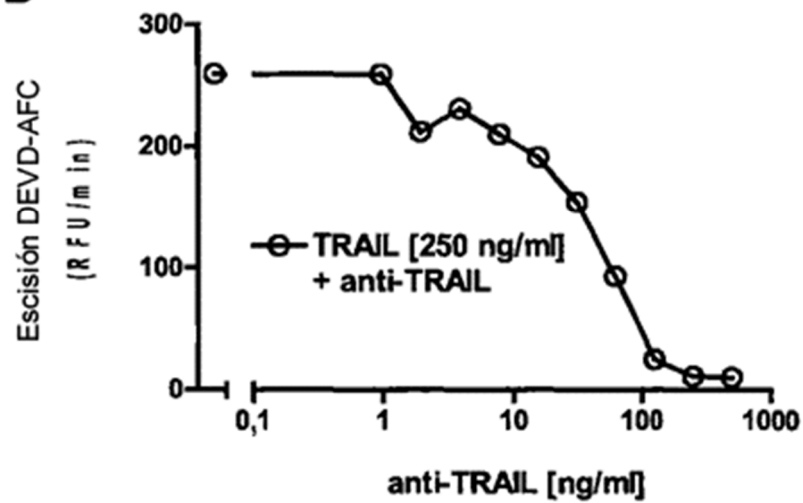


Figura 12

Ensayo de citotoxicidad con TRAIL-ASPD o TRAIL-DSPD sobre células HT1080

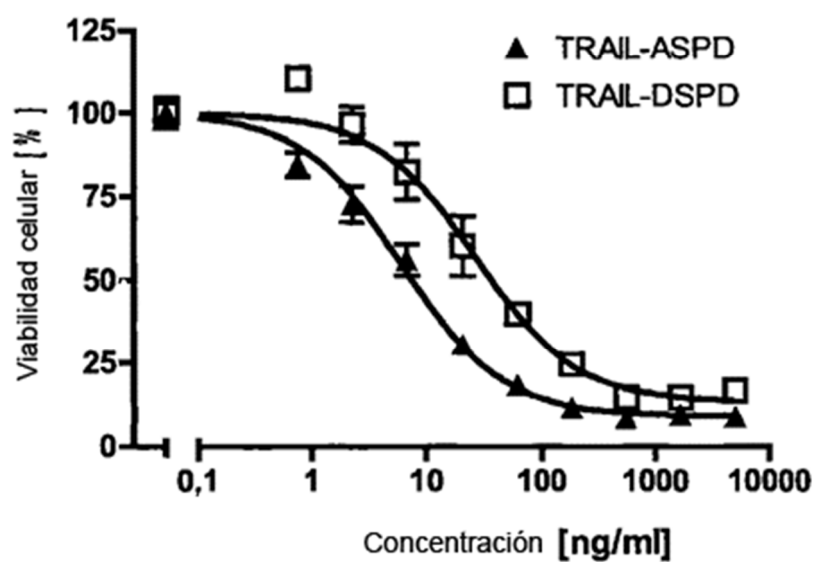


Figura 13

Transferencia de Western de células HEK transfectadas de forma transitoria con construcciones TRAIL-SPD o construcciones de SPD selectivas de receptor de TRAIL

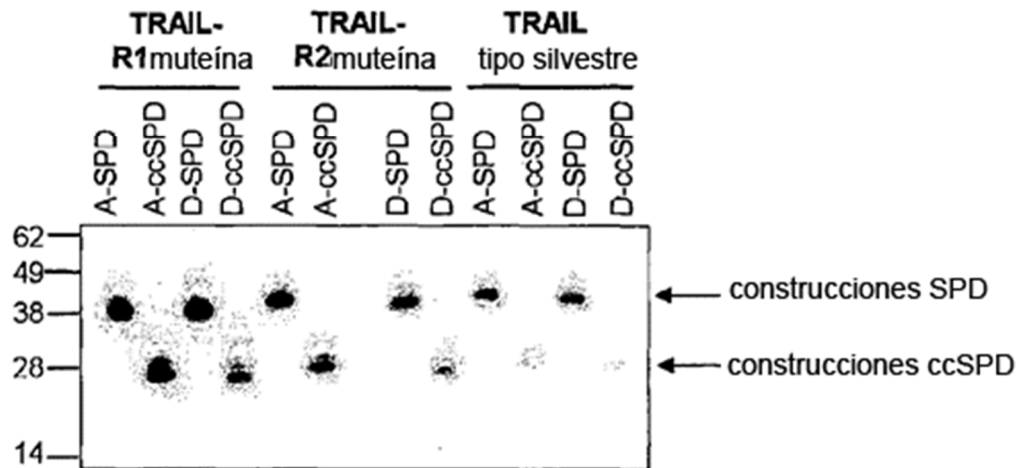


Figura 14

Ligandos selectivos de receptor de TRAIL (TRAILR1mut y TRAILR2mut) inmovilizados en placas Streptactin, se detectan de forma diferencial por TRAIL-Receptor 1-Fc o TRAIL-Receptor 2-Fc

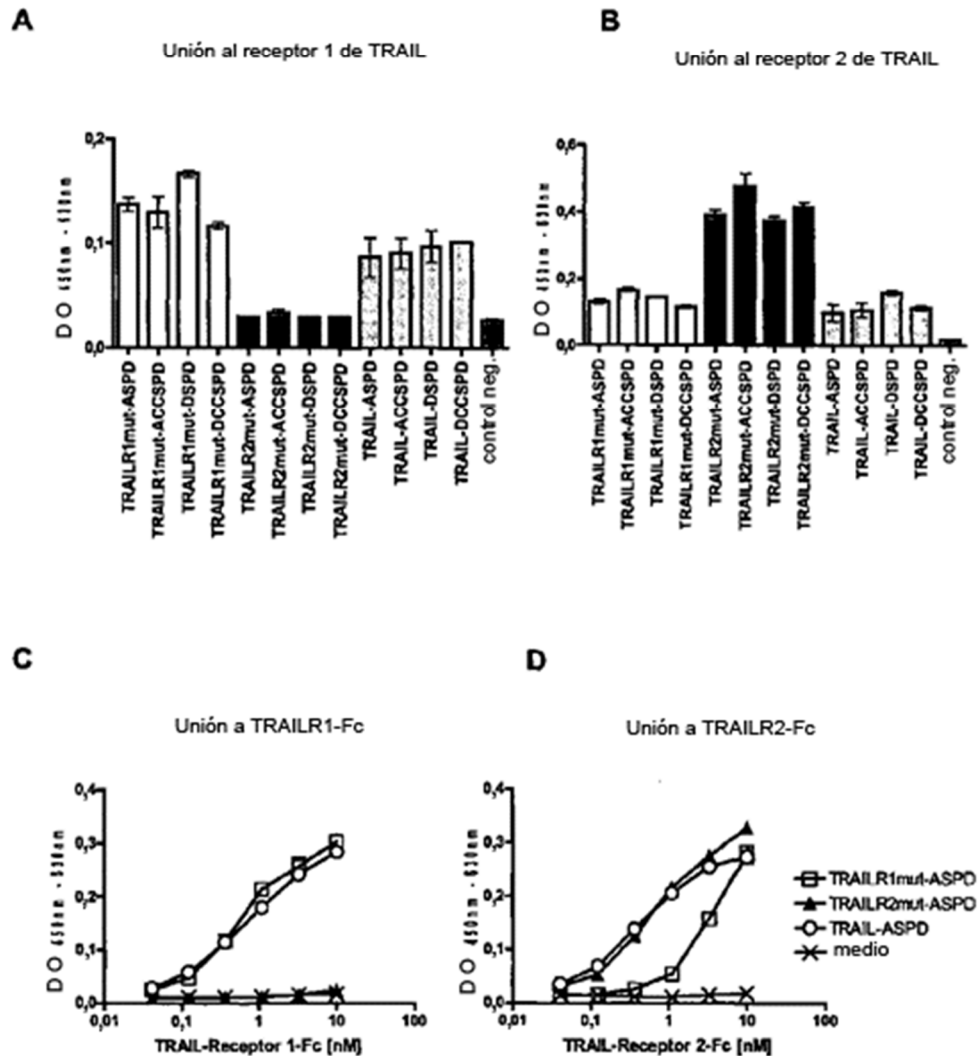


Figura 15

Unión de receptores de TRAIL a ligandos “muteína”  
selectivos de receptor

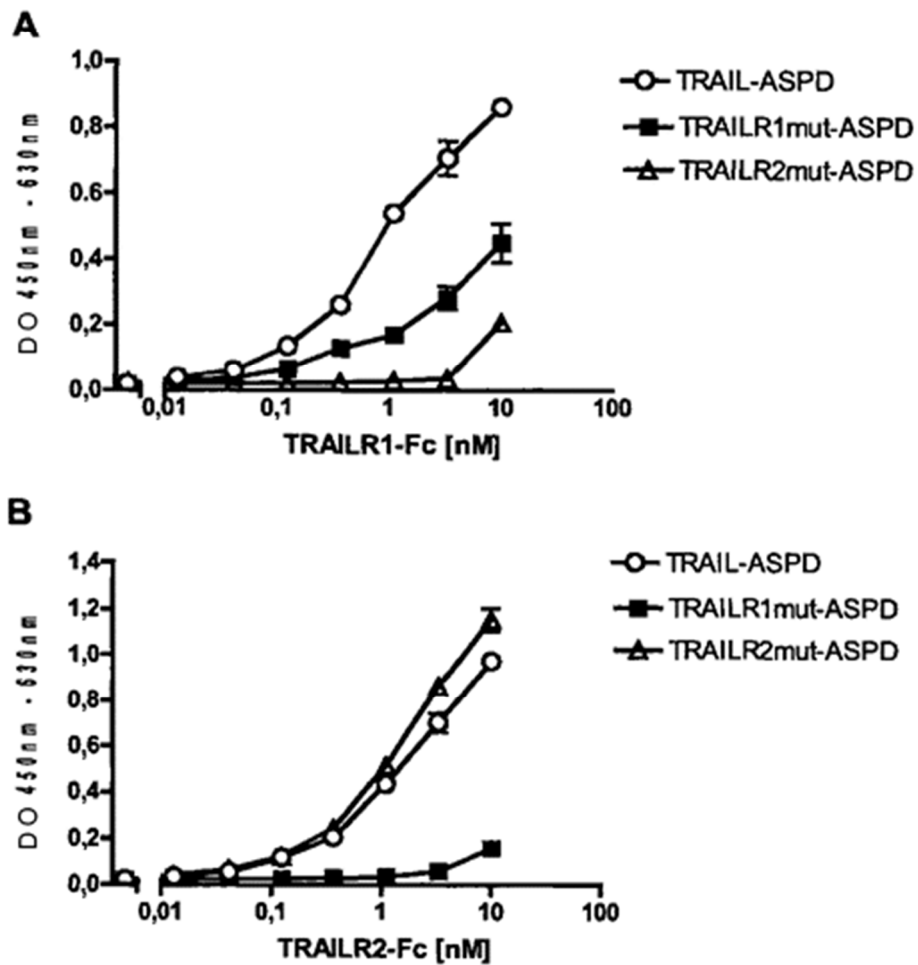




Figura 16

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR1mut-ASPD  
purificada por afinidad

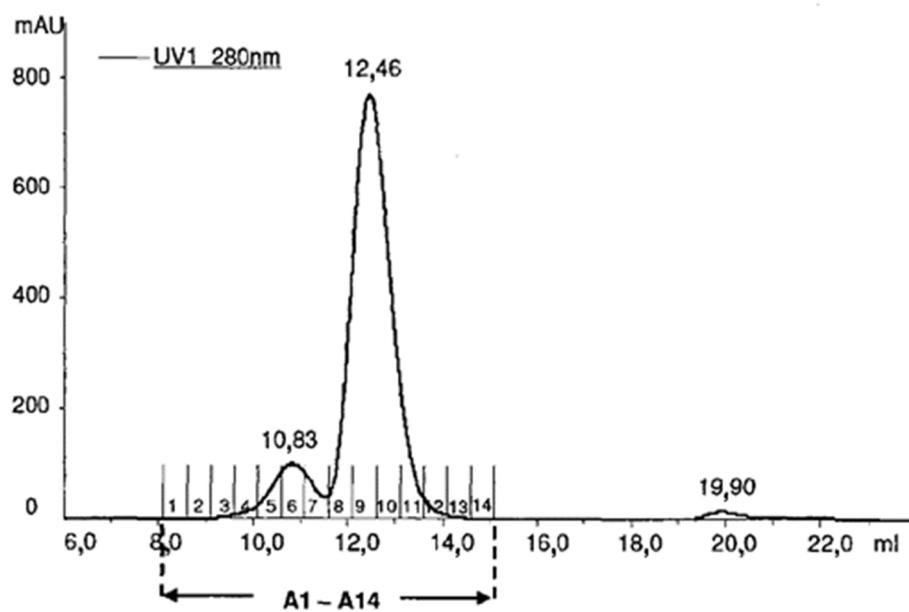


Figura 17

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones SEC A1-A14 de TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad

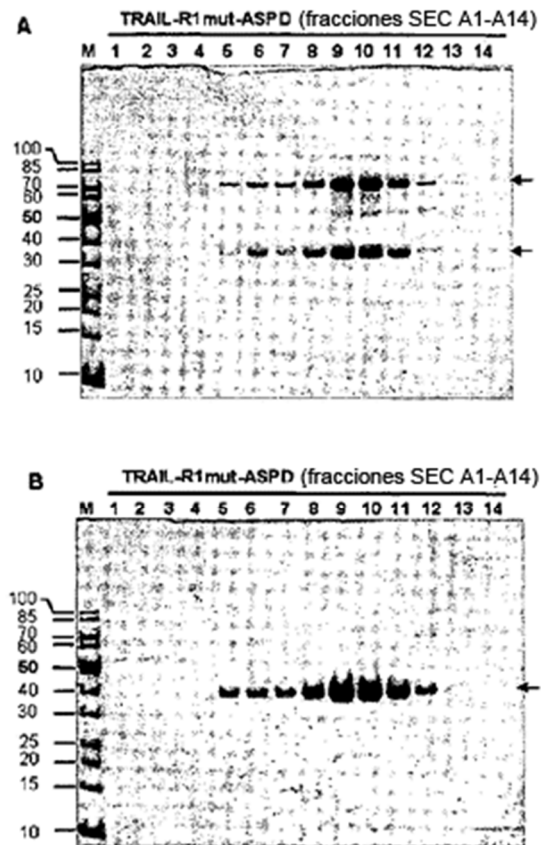


Figura 18

Actividad caspasa de fracciones SEC A1-A14 de  
TRAILR1mut-ASPD purificada por afinidad sobre células Jurkat

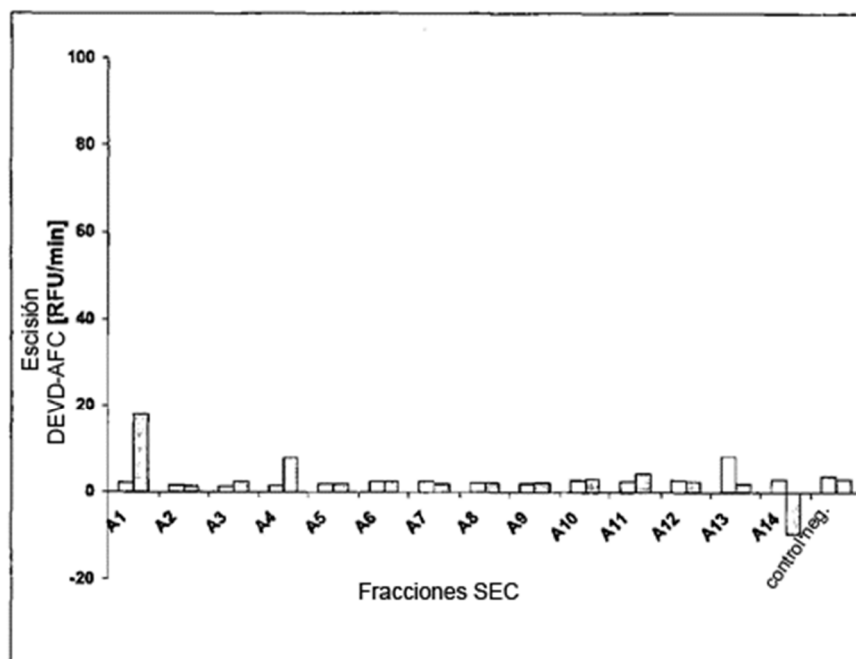


Figura 19

Cromatografía por exclusión de tamaño de TRAILR2mut-ASPD  
purificada por afinidad

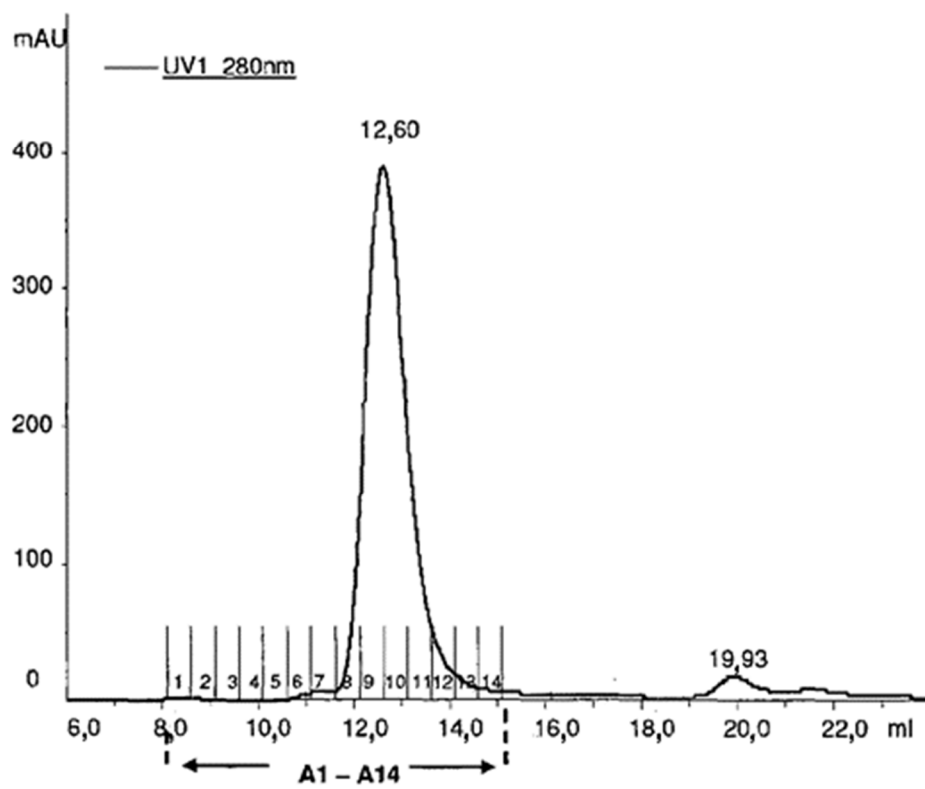


Figura 20

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad

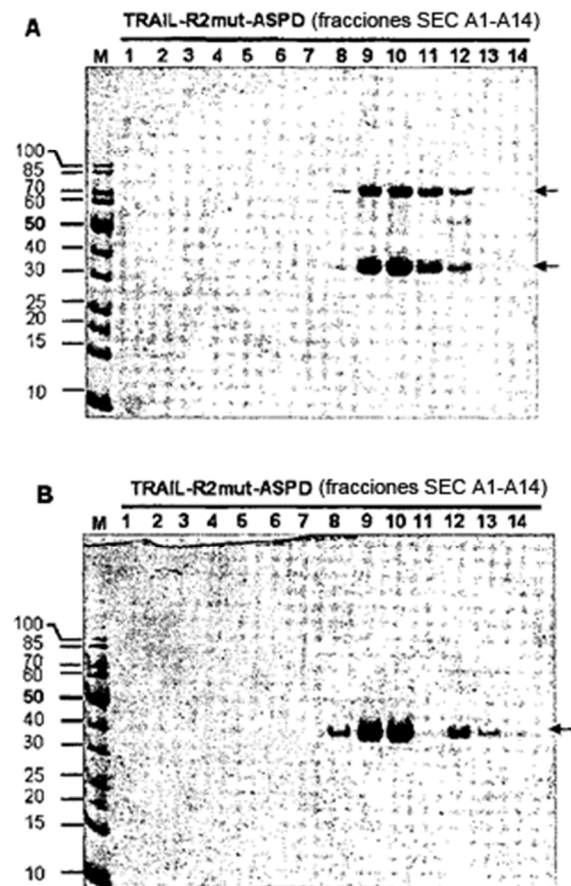


Figura 21

Ensayo de eliminación de Jurkat de fracciones SEC A1-A14 de TRAILR2mut-ASPD purificada por afinidad

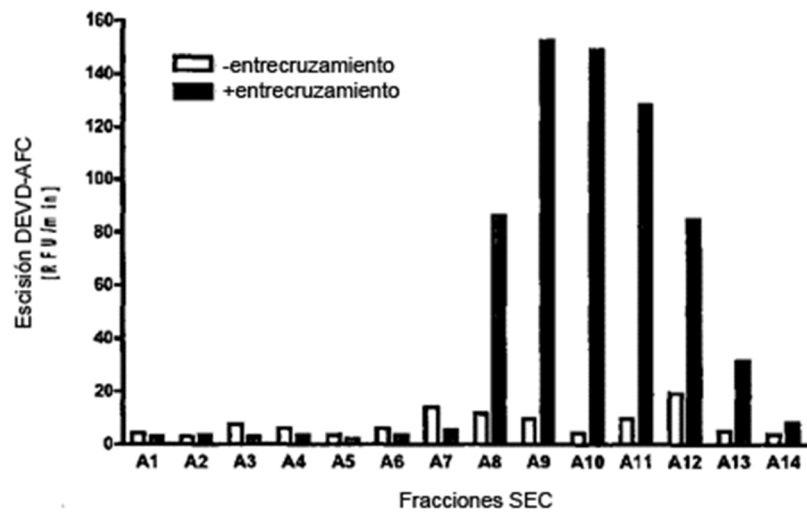


Figura 22

Actividad citotóxica de TRAIL-ASP, TRAILR1mut-ASP y TRAILR2mut-ASP sobre células cancerosas humanas

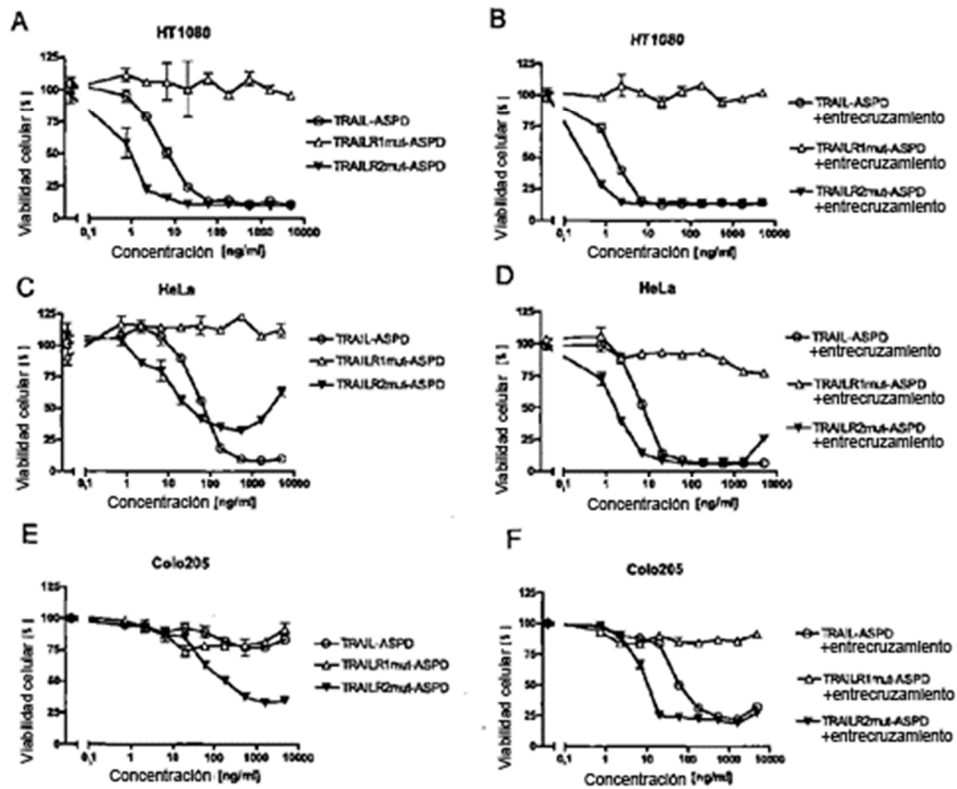


Figura 23

Proteínas TRAIL-SPD selectivas de receptor son altamente solubles

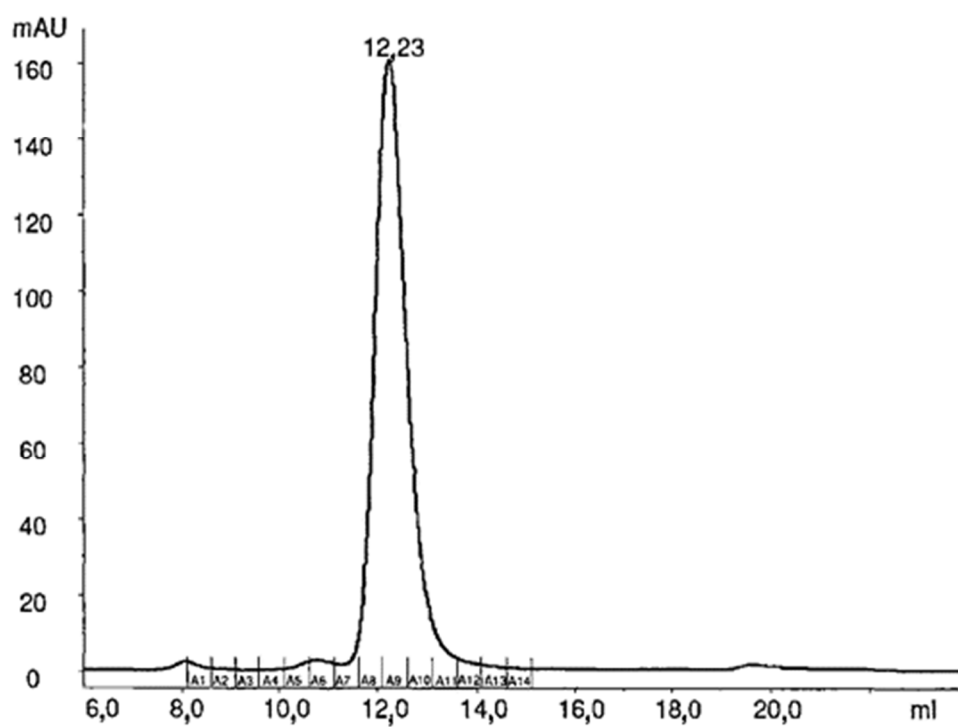




Figura 24

SEC de TRAIL-ASPD\_F335A purificada por afinidad

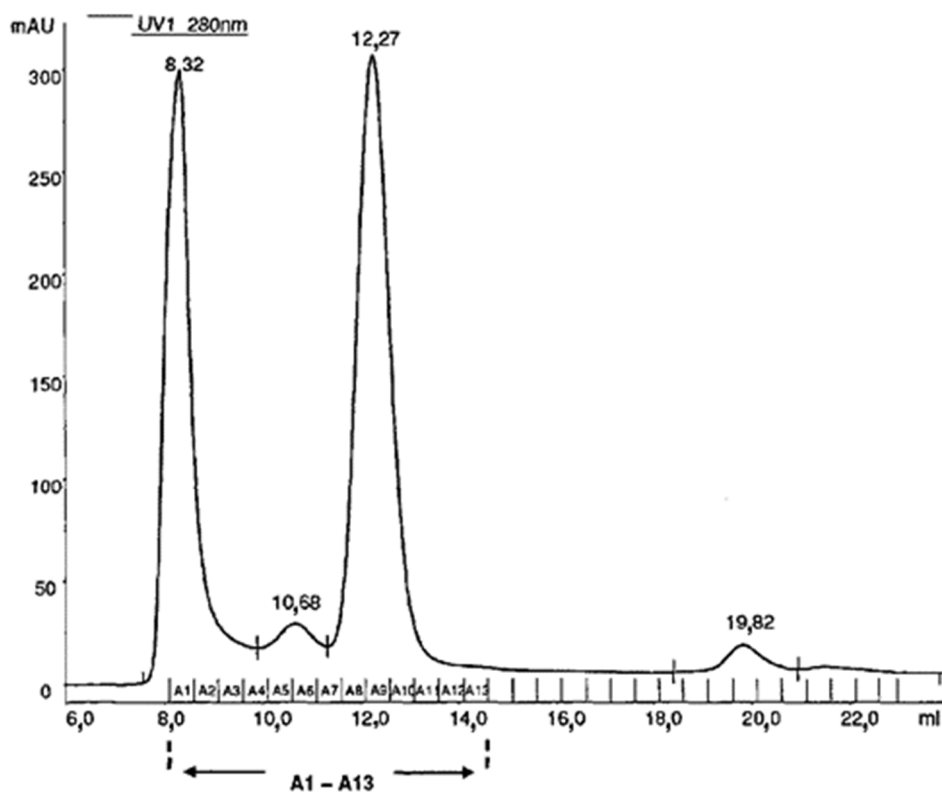


Figura 25

SDS-PAGE teñida con plata de fracciones SEC A1-A13

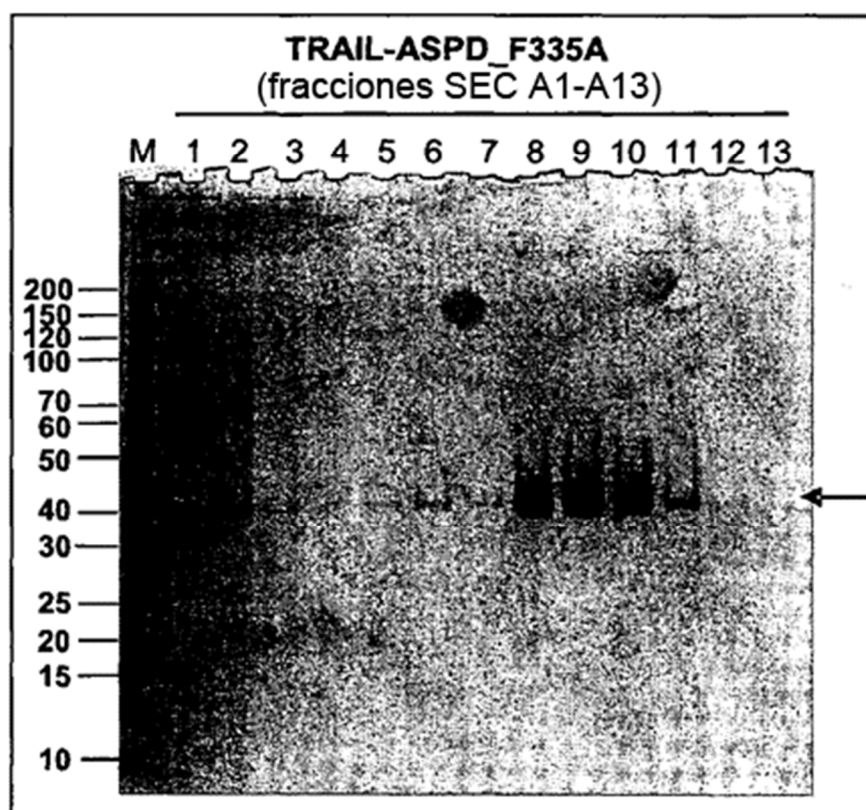


Figura 26

Efecto citotóxico de TRAIL-ASPD\_F335A sobre células cancerosas humanas

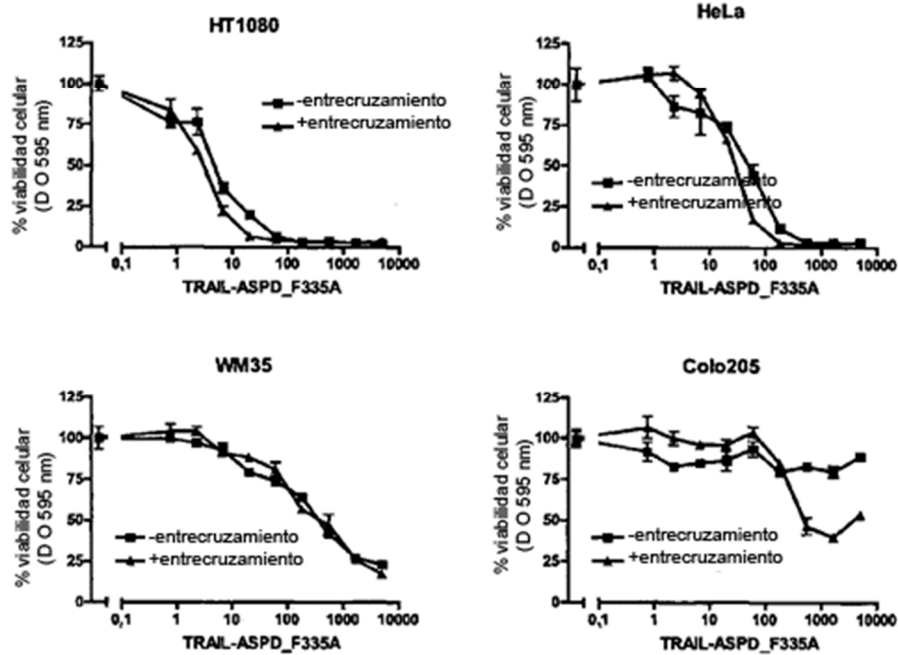


Figura 27

SEC de TRAIL-ASPD\_F335D purificada por afinidad

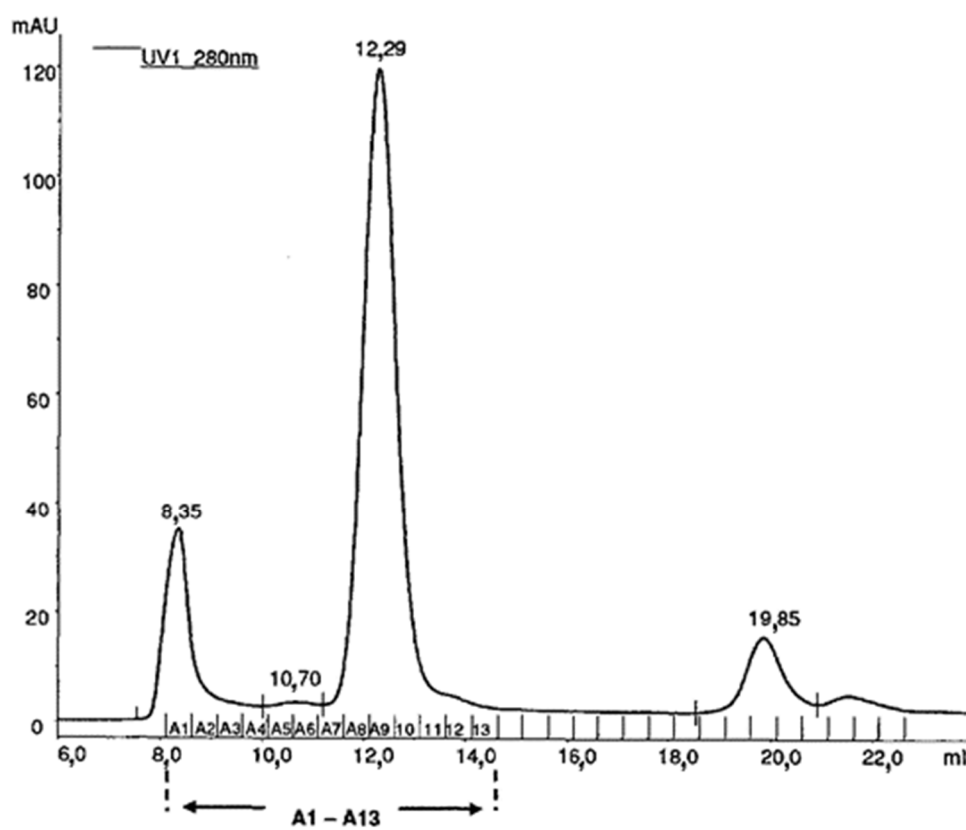


Figura 28

SDS-PAGE teñida con plata de SEC de TRAIL-ASPD\_F335D  
purificada por afinidad

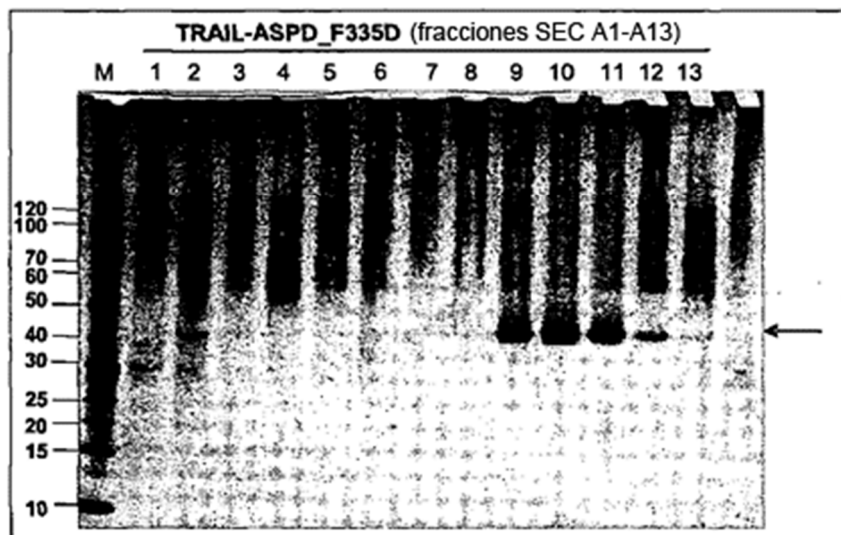


Figura 29

Efecto citotóxico de TRAIL-SPD\_F335D sobre células cancerosas humanas

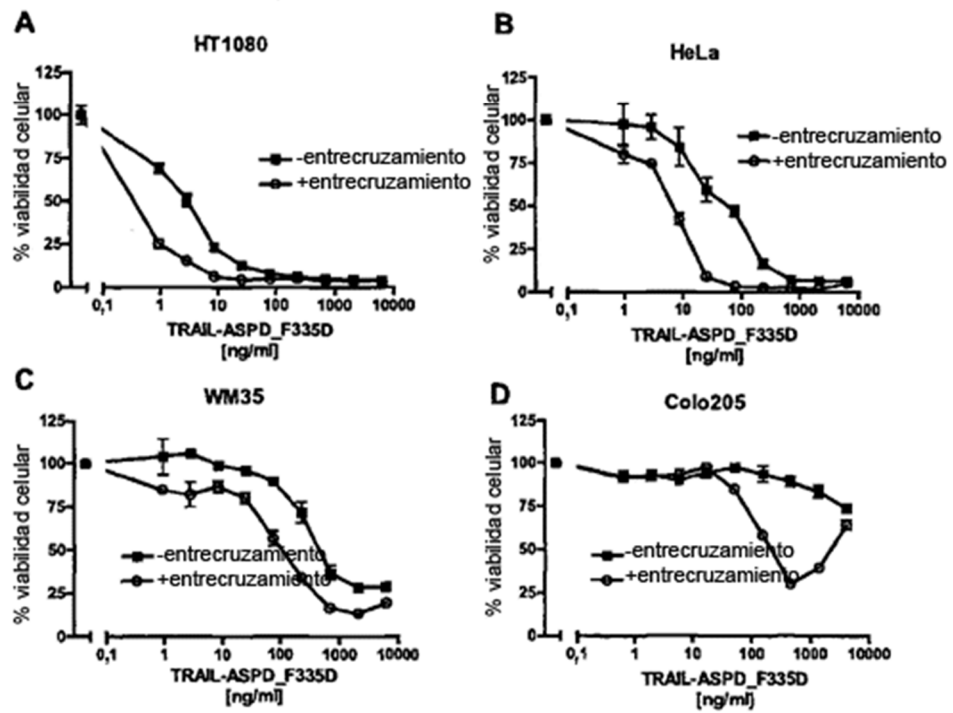


Figura 30

Unión de proteína de fusión TRAIL-ASPD a carbohidratos

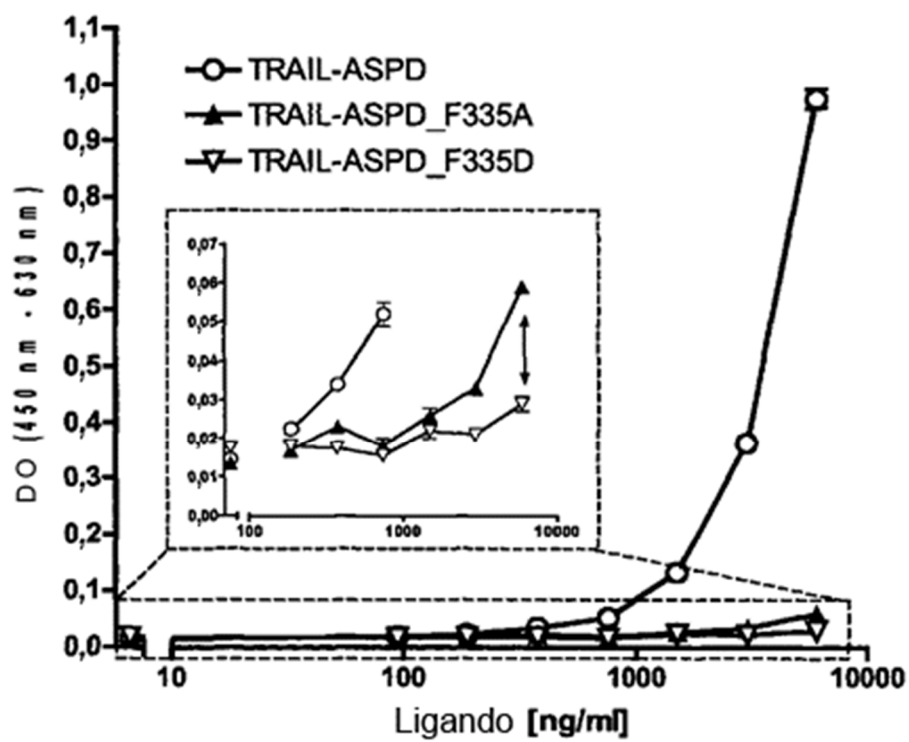


Figura 31

Farmacocinética de proteínas de fusión TRAIL-ASPD (A) o TRAIL-ASPD\_F335D (B)

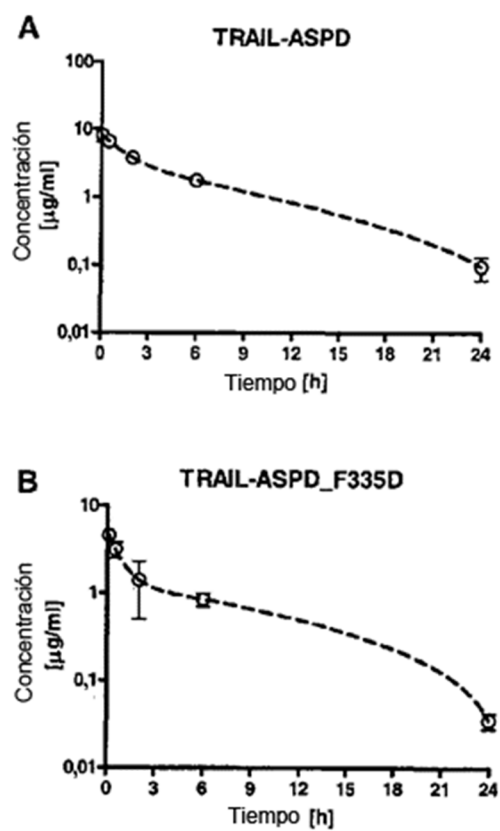




Figura 32

## Actividad caspasa en hepatocitos humanos primarios

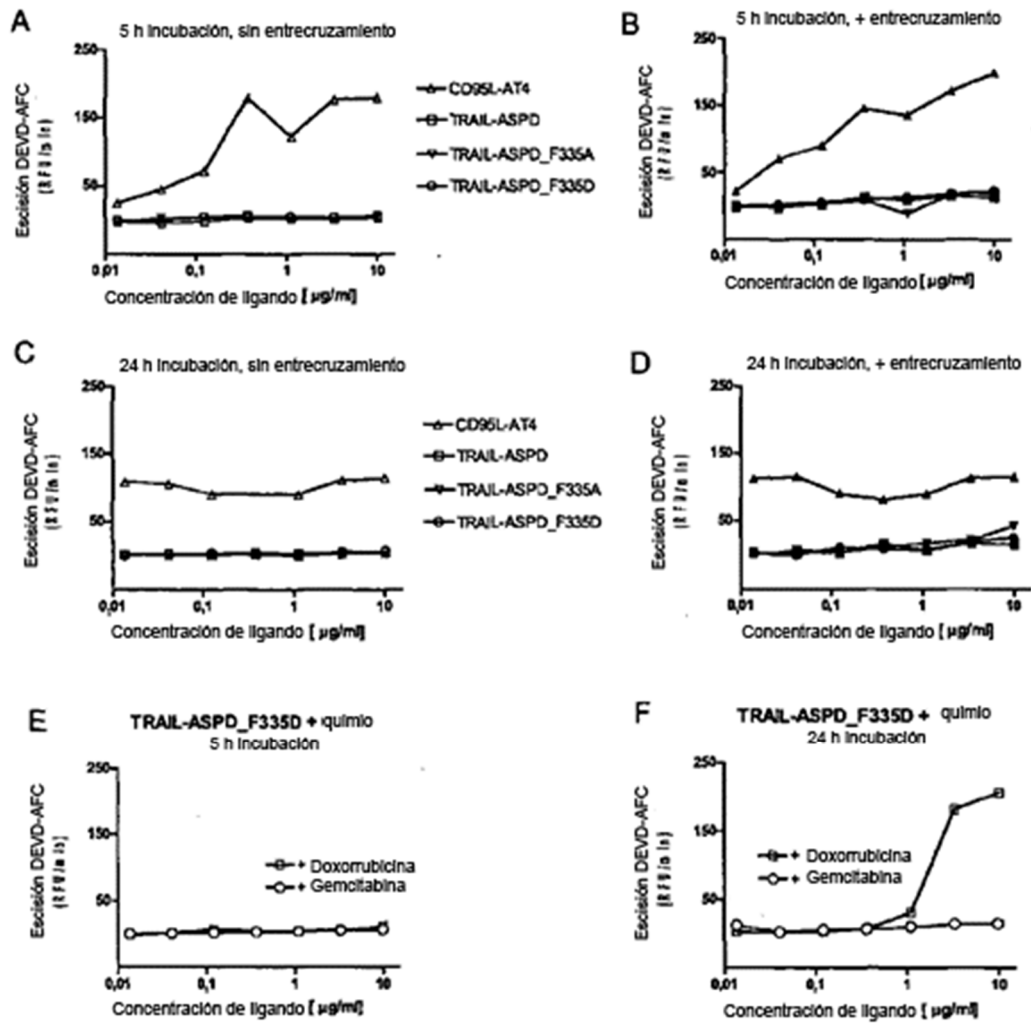


Figura 33

Transferencia de Western de sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de forma transitoria con construcciones de APRIL trimerizadas

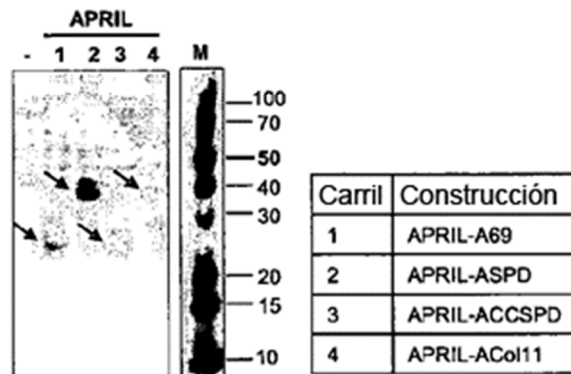


Figura 34

TACI-Fc se une a APRIL-ASPD

