(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 773**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **04779112 .4**
(86) Fecha de presentación : **23.07.2004**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1648936**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

(54) Título: **Composiciones y métodos relacionados con fragmentos solubles multiméricos y oligoméricos del receptor TWEAK.**

(30) Prioridad: **24.07.2003 US 490036 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **AMGEN Inc.**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es: **Wiley, Steven, R.**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos relacionados con fragmentos solubles multiméricos y oligoméricos del receptor TWEAK.

Antecedentes de la invención

La angiogénesis es un proceso de desarrollo de múltiples etapas que provoca la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes. Este proceso regulado en el espacio y el tiempo implica la pérdida de los contactos de la matriz y las interacciones celulares de apoyo en los vasos existentes por proteasas, seguido por el movimiento coordinado, alteración morfológica, y proliferación de las células de músculo liso y endoteliales del vaso existente. Las células nacientes entonces se extienden en el tejido diana seguido por interacciones célula-célula en las que las células endoteliales forman tubos que las células del músculo liso rodean. De un modo coordinado, las proteínas de las matriz extracelular del vaso se secretan y se reclutan células de soporte peri-endoteliales para apoyar y mantener la integridad estructural (véase, por ejemplo, Daniel *et al*., Ann. Rev. Physiol. 2000(62):649, 2000). La angiogénesis juega papeles importantes tanto en fisiología normal como patológica.

En condiciones fisiológicas normales, la angiogénesis está implicada en el desarrollo fetal y embrionario, curación de heridas, regeneración de órganos, y procesos de remodelado del sistema reproductor femenino que incluye la formación del endometrio, cuerpo lúteo, y placenta. La angiogénesis está rigurosamente regulada en condiciones normales, especialmente en animales adultos, y la perturbación de los controles reguladores puede conducir a angiogénesis patológica.

La angiogénesis patológica se ha implicado en la manifestación y/o progreso de enfermedades inflamatorias, ciertas enfermedades oculares, y cáncer. En particular, varias líneas de evidencia apoyan el concepto de que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y persistencia de tumores sólidos y su metástasis (véase, por ejemplo, Folkman, N. Engl. J. Med. 285:1182, 1971; Folkman, *et al.,* Nature 339-58; 1989; Kim *et al.,* Nature 362:841, 1993; Hori *et al.,* Cancer Res., 51:6180, 1991). Por lo tanto, los inhibidores de la angiogénesis útiles para la prevención (por ejemplo, tratamiento de afecciones premalignas), intervención (por ejemplo, tratamiento de tumores pequeños), y regresión (por ejemplo, tratamiento de grandes tumores) de cánceres (véase, por ejemplo, Bergers *et al.,* Science 284:808, 1999).

Existe una necesidad de composiciones adicionales y métodos para modular la angiogénesis para la prevención, abrogación, y mitigación de la enfermedad.

La proteína TWEAK, que también se ha llamado TREPA y Apo3L, es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y se expresa en una amplia diversidad de tejidos humanos (Chicheportiche *et al.,* J. Biol. Chem., 272(51):32401, 1997; véase también la solicitud PCT Nº 98/35061, 13 de agosto de 1998). Como la mayoría de los miembros de la familia de TNF, TWEAK es una proteína de membrana Tipo II con un dominio C-terminal extracelular. Aunque TWEAK se describió originalmente como un inductor débil de la apoptosis, esta inducción de muerte celular después demostró ser indirecta (Shneider *et al.,* Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999).

Lynch *et al.,* demostraron que TWEAK induce directamente la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis (J. Biol. Chem., 274(13):8455, 1999): Concentraciones picomolares de TWEAK soluble recombinante induce la proliferación en múltiples líneas celulares endoteliales y en células de músculo liso aórtico, y reduce la necesidad de factores séricos y de crecimiento en cultivo. Además, TWEAK induce una fuerte respuesta angiogénica en un ensayo de bolsillo corneal de rata. Como los miembros de la familia de TNF inician respuestas biológicas señalizando a través de miembros de la familia del receptor de TNF, ha sido de gran interés identificar y caracterizar el receptor TWEAK.

Marsters *et al.,* informaron de que TWEAK se une a y señaliza a través del receptor que contiene un dominio de muerte conocido de formas diversas como DR3, Apo3, WSL-1, TRAMP o LARD (Marsters *et al.,* Current Biology 8(9):525, 1998). Schneider *et al.,* sin embargo mostraron que TWEAK se une a y señaliza en células Kym-1 pero esas células Kym-1 no expresan el receptor de DR3 (Schneider *et al.,* Eur. J. Immunol. 29:1785, 1999). Wiley posteriormente identificó el receptor TWEAK principal y describió ciertos fragmentos solubles y variantes del mismo que antagonizan al receptor TWEAK de tipo silvestre (publicación PCT Nº WO 01/45730).

Como TWEAK induce la angiogénesis *in vivo*, existe una necesidad particular de antagonistas del receptor TWEAK funcional principal. Dichos antagonistas del receptor TWEAK serían útiles para reducir la angiogénesis y tratar enfermedades humanas, incluyendo cánceres y enfermedades inflamatorias.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la identificación y caracterización de polipéptidos que comprenden fragmentos solubles multiméricos del receptor TWEAK funcional principal (TWEAKR) y un dominio de oligomerización. Sorprendentemente, estos polipéptidos tienen una afinidad de unión mayor por TWEAK y/o son mejores competidores para la unión a TWEAK que se esperaría de las propiedades de unión y competición con TWEAK de polipéptidos que comprenden fragmentos de TWEAKR monoméricos solubles y un dominio de oligomerización o que comprenden fragmentos de TWEAKR multiméricos solubles sin un dominio de oligomerización.

La invención proporciona, por ejemplo, composiciones y métodos para inhibir la angiogénesis en un mamífero que necesita dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un antagonista del receptor TWEAK. La composición preferiblemente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el mamífero es preferiblemente un ser humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un primer fragmento soluble de un receptor TWEAK, un segundo factor soluble de un receptor TWEAK, y un dominio de oligomerización, donde dicho polipéptido se une a TWEAK, y dicho primer fragmento soluble consta de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En una realización, dicho primer fragmento soluble consta de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble consta de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un tercer fragmento soluble de un receptor TWEAK. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, y dicho tercer fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, y tercer fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, y tercer fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un cuarto fragmento soluble de un receptor TWEAK. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, el tercer fragmento soluble, y el cuarto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, y cuarto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble y cuarto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un quinto fragmento soluble de un receptor TWEAK. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, un tercer fragmento soluble, un cuarto

fragmento soluble, y un quinto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, y quinto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble y quinto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un sexto fragmento soluble de un receptor TWEAK. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, un tercer fragmento soluble, un cuarto fragmento soluble, un quinto fragmento soluble, y un sexto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, quinto fragmento soluble, y sexto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, quinto fragmento soluble, y sexto fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un séptimo fragmento soluble de un receptor TWEAK. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, un tercer fragmento soluble, un cuarto fragmento soluble, un quinto fragmento soluble, un sexto fragmento soluble, y un séptimo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, quinto fragmento soluble, sexto fragmento soluble, y séptimo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, quinto fragmento soluble, sexto fragmento soluble, y séptimo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7.

En otra realización, dicho polipéptido comprende un enlazador. En otra realización, dicho enlazador une dicho primer fragmento soluble TWEAKR y dicho segundo fragmento soluble TWEAKR. En otra realización, dicho enlazador une dicho segundo fragmento soluble TWEAKR y dicho dominio de oligomerización. En otra realización, dicho polipéptido comprende un primer enlazador y un segundo enlazador, donde dicho primer enlazador une dicho primer fragmento soluble TWEAKR y dicho segundo fragmento soluble TWEAKR, y dicho segundo enlazador une dicho segundo fragmento soluble TWEAKR y dicho dominio de oligomerización. En otra realización, dicho enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGGG (SEC ID Nº 45).

En otra realización, dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble están unidos juntos sin una secuencia polipeptídica intermedia. En otra realización, dicho primer fragmento soluble y dicho dominio de oligomerización están unidos juntos sin una secuencia polipeptídica intermedia. En otra realización, dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, y dicho dominio de oligomerización están unidos juntos, sin una secuencia polipeptídica intermedia, en un polipéptido lineal y contiguo.

En otra realización, dicho dominio de oligomerización es N-terminal a dicho primer fragmento soluble TWEAKR y a dicho segundo fragmento soluble TWEAKR. En otra realización, dicho dominio de oligomerización es C-terminal

a dicho primer fragmento soluble TWEAKR y dicho segundo fragmento soluble TWEAKR. En otra realización, dicho dominio de oligomerización, comprende una cremallera de leucina. En otra realización, dicho dominio de oligomerización comprende un fragmento de un anticuerpo. En otra realización, dicho fragmento de un anticuerpo comprende un dominio Fc.

En otra realización, dicho polipéptido comprende una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre en el grupo compuesto por: SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 11; SEC ID Nº 13; SEC ID Nº 15; SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 18; SEC ID Nº 19; SEC ID Nº 21; SEC ID Nº 23; SEC ID Nº 25; SEC ID Nº 27; SEC ID Nº 29; SEC ID Nº 31; SEC ID Nº 33; SEC ID Nº 35; SEC ID Nº 37, SEC ID Nº 39, SEC ID Nº 41; SEC ID Nº 43 y SEC ID Nº 44. En otra realización, dicho polipéptido comprende una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 11; SEC ID Nº 13; SEC ID Nº 15; SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 18; SEC ID Nº 19; SEC ID Nº 21; SEC ID Nº 23; SEC ID Nº 25; SEC ID Nº 27; SEC ID Nº 29; SEC ID Nº 31; SEC ID Nº 33; SEC ID Nº 35; SEC ID Nº 37, SEC ID Nº 39, SEC ID Nº 41; SEC ID Nº 43 y SEC ID Nº 44. En otra realización, dicho polipéptido comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 11; SEC ID Nº 13; SEC ID Nº 15; SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 18; SEC ID Nº 19; SEC ID Nº 21; SEC ID Nº 23; SEC ID Nº 25; SEC ID Nº 27; SEC ID Nº 29; SEC ID Nº 31; SEC ID Nº 33; SEC ID Nº 35; SEC ID Nº 37, SEC ID Nº 39, SEC ID Nº 41; SEC ID Nº 43 y SEC ID Nº 44.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína que comprende dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido, donde dicho primer y segundo polipéptidos están oligomerizados entre sí. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicho segundo polipéptido. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido no es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicho segundo polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir un receptor TWEAK en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto dicho polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende dicho polipéptido. En otra realización, dicha composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, dicho sujeto es un mamífero. En otra realización, dicho mamífero es un ser humano. En otra realización, dicho sujeto tiene una enfermedad o afección mediada o exacerbada por la angiogénesis. En otra realización, dicha enfermedad o afección está caracterizada por neo-vascularización ocular. En otra realización, dicha enfermedad o afección es un tumor sólido. En otra realización, dicho método comprende adicionalmente tratar a dicho sujeto con radiación. En otra realización, dicho método comprende adicionalmente tratar a dicho sujeto con un segundo agente quimioterapéutico. En otra realización, dicho segundo agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por: un agente alquilante, un antimetabolito, un alcaloide de la vinca, un quimioterapéutico derivado de plantas, una nitrosourea, un antibiótico anti-tumoral, una enzima anti-tumoral, un inhibidor de topoisomerasa, un análogo de platino, un supresor adrenocortical, una hormona, un agonista hormonal, un antagonista hormonal, un anticuerpo, un inmunoterapéutico, un factor de células sanguíneas, un radioterapéutico, y un modificador de la respuesta biológica. En otra realización, dicho segundo agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, aspariginasa, vincristina, vinblastina, una linfoquina, un citoquina, una interleuquina, un interferón, interferón alfa, interferón beta, interferón delta, TNF, clorambucilo, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, citarabina, mecarptopurina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiurea, metilhidrazina, mitotano, tamoxifeno, y fluoximesterona. En otra realización, dicha enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria. En otra realización, dicho método comprende adicionalmente tratar a dicho sujeto con un segundo agente terapéutico. En otra realización, dicho segundo agente terapéutico inhibe una citoquina o un receptor de citoquina que promueve la inflamación. En otra realización, dicho segundo agente terapéutico comprende un fragmento soluble de dicho receptor de citoquina, un anticuerpo que se une a dicha citoquina, o un anticuerpo que se une a dicho receptor de citoquina. En otra realización, dicho segundo agente terapéutico activa un receptor que inhibe la inflamación. En otra realización, dicho segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, un antagonista de interleuquina-4, un antagonista de IL-13, interleuquina-12, ligando 4-1BB, un anticuerpo anti-4-1BB, un antagonista de TNF, un antagonista del receptor de TNF, TRAIL, un antagonista de CD148, un antagonista de VEGF, un antagonista del receptor de VEGF, un antagonista de IgE, un antagonista de Tek.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico, o su complemento, que comprende una secuencia que codifica dicho polipéptido. En otra realización, dicho ácido nucleico, o su complemento, hibrida en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas a un segundo ácido nucleico, y dicho segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID Nº 10; SEC ID Nº 12; SEC ID Nº 14; SEC ID Nº 16; SEC ID Nº 20; SEC ID Nº 22; SEC ID Nº 24; SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 28; SEC ID Nº 30; SEC ID Nº 32; SEC ID Nº 34; SEC ID Nº 36, SEC ID Nº 38, SEC ID Nº 40 y SEC ID Nº 42. En otra realización, dicho ácido nucleico, o su complemento, comprende una secuencia que es al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID Nº 10; SEC ID Nº 12; SEC ID Nº 14; SEC ID Nº 16; SEC ID Nº 20; SEC ID Nº 22; SEC ID Nº 24; SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 28; SEC ID Nº 30; SEC ID Nº 32; SEC ID Nº 34; SEC ID Nº 36, SEC ID Nº 38, SEC ID Nº 40 y SEC ID Nº 42. En otra realización, dicho ácido nucleico, o su complemento, comprende una secuencia que es al menos un 95% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID

Nº 10; SEC ID Nº 12; SEC ID Nº 14; SEC ID Nº 16; SEC ID Nº 20; SEC ID Nº 22; SEC ID Nº 24; SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 28; SEC ID Nº 30; SEC ID Nº 32; SEC ID Nº 34; SEC ID Nº 36, SEC ID Nº 38, SEC ID Nº 40 y SEC ID Nº 42. En otra realización, dicho ácido nucleico, o su complemento, comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID Nº 10; SEC ID Nº 12; SEC ID Nº 14; SEC ID Nº 16; SEC ID Nº 20; SEC ID Nº 22; SEC ID Nº 24; SEC ID Nº 26, SEC ID Nº 28; SEC ID Nº 30; SEC ID Nº 32; SEC ID Nº 34; SEC ID Nº 36, SEC ID Nº 38, SEC ID Nº 40 y SEC ID Nº 42. En otra realización, dicho ácido nucleico codifica una secuencia polipeptídica seleccionada entre el grupo compuesto por: SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 11; SEC ID Nº 13; SEC ID Nº 15; SEC ID Nº 17, SEC ID Nº 18; SEC ID Nº 19; SEC ID Nº 21; SEC ID Nº 23; SEC ID Nº 25; SEC ID Nº 27; SEC ID Nº 29; SEC ID Nº 31; SEC ID Nº 33; SEC ID Nº 35; SEC ID Nº 37, SEC ID Nº 39, SEC ID Nº 41; SEC ID Nº 43 y SEC ID Nº 44.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico. En otra realización, dicho vector es un vector de expresión.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido que comprende cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que promueven la expresión de dicho polipéptido.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de secuencia de las secuencias polipeptídicas del receptor TWEAK humano y murino. La secuencia superior es el polipéptido del receptor TWEAK murino (SEC ID Nº 5), y la secuencia inferior es el polipéptido de receptor TWEAK humano (SEC ID Nº 4).

La Figura 2 muestra el efecto de TWEAKR-Fc en el cierre de una herida con HRMEC inducida por PMA.

La Figura 3 muestra el efecto de TWEAKR-Fc en el cierre de una herida con HRMEC inducida por EGF.

La Figura 4 muestra el efecto de TWEAKR humano-Fc en la proliferación de HUVEC inducida por TWEAK (100 ng/ml).

La Figura 5 muestra el efecto de TWEAKR humano-Fc en la proliferación de HUVEC inducida por FGF-2 (10 ng/ml).

La Figura 6 muestra la unión de TWEAKR-Fc (SEC ID Nº 7: "monómero"), TWEAKR-DR5:Fc (SEC ID Nº 9, "DR5"); di-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 11, "dímero"), y tri-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 13, "trímero") a TWEAKR-FLAG en un ensayo de unión ELISA.

La Figura 7 muestra la capacidad de TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7; "hu+eu"), TWEAKR:DR5:Fc (SEC ID Nº 9; "DR5+eu"), di-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 11, "di+eu") y tri-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 13, "tri+eu") de competir con TWEAKR marcado con europio por la unión a TWEAK en un ensayo de unión de competición.

La Figura 8 muestra la unión de TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 15, círculos negros), TWEAKR:1KPEG:Fc (SEC ID Nº 17, asteriscos), TWEAKR:1KPEG:TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 18; triángulos negros), y TWEAKR:Gly5: TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 19; círculos blancos) a TWEAK usando un ensayo de estilo ELISA.

La Figura 9 muestra una comparación de oligómeros TweakR-Fc que se unen a TWEAK soluble a 50 ng/ml usando huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7), (cuadrados negros), monómero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 31) (cuadrados blancos), dímero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 33) (triángulos blancos), trímero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 35) (cruces), tetrámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 37) (diamantes blancos), y pentámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 39) (círculos blancos).

La Figura 10 muestra una comparación de oligómeros TweakR-Fc que se unen a TWEAK soluble a 50 ng/ml usando tetrámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 37) (diamantes blancos), pentámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 39) (círculos blancos), hexámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 41) (triángulos blancos), y heptámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 43) (asteriscos).

La Figura 11 muestra una comparación de oligómeros de TweakR-Fc que se unen a TWEAK soluble a 33 ng/ml usando CHO TANDEM (SEC ID Nº 19 expresada en células CHO transfectadas de forma estable), pentámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 39) (círculos blancos), hexámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 41) (triángulos blancos), y heptámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 43) (asteriscos).

La Figura 12 muestra una comparación de oligómeros TweakR-Fc que se unen a TWEAK soluble a 50 ng/ml usando huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7) (cuadrados blancos), monómero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 21) (cuadrados blancos), dímero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 23) (triángulos blancos), trímero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 25) (cruces), tetrámero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 27) (diamantes blancos), y pentámero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 29) (círculos blancos).

La Figura 13 muestra una comparación de oligómeros TweakR-Fc frente a TweakR con europio que se une a TWEAK inmovilizado a 50 ng/ml usando huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7) (cuadrados negros), monómero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 21), (cuadrados blancos), dímero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 23) (triángulos blancos), trímero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 25) (cruces), tetrámero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 27) (diamantes blancos), pentámero TWEAKR 40 (SEC ID Nº 29) (círculos blancos).

La Figura 14 muestra una comparación de oligómeros TweakR-Fc frente a TweakR con Europio que se une a TWEAK inmovilizado a 50 ng/ml usando huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7) (cuadrados negros), monómero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 31) (cuadrados blancos), dímero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 33) (triángulos blancos), trímero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 35) (cruces), tetrámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 37) (diamantes blancos), pentámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 39) (círculos blancos), hexámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 41) (líneas verticales), y heptámero TWEAKR 43 (SEC ID Nº 43) (asteriscos).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos con relación a polipéptidos que comprenden multímeros de fragmentos solubles de TWEAKR y un dominio de oligomerización.

Abreviaturas y Terminología Usada en la Memoria Descriptiva

"4-1BB" y "ligando 4-1BB" (4-1BB-L) son polipéptidos descritos, entre otros, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.674.704, que incluye formas solubles de los mismos.

"bFGF" es el factor de crecimiento de fibroblastos básico.

"BSA" es albúmina sérica bovina.

"Ligando CD40" (CD40L) es un polipéptido descrito, entre otros en la Patente de Estados Unidos Nº 5.716.805, que incluye formas solubles del mismo.

"CHO" es una línea celular de ovario de hámster chino.

"DMEM" es un medio de Eagle Modificado con Dulbecco, un medio de cultivo celular disponible en el mercado.

"ELISA" es Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas.

"Flt3L" es el ligando Flt3, un polipéptido descrito, entre otros, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.554.512, que incluye formas solubles del mismo.

"HRMEC" son células endoteliales microvasculares renales humanas primarias.

"HUVEC" es una línea de células endoteliales de la vena umbilical humana.

"PBS" es solución salina tamponada con fosfato.

"PMA" es 12-miristato-13-acetato de forbol.

"RTK" son receptores tirosina quinasa.

"Tek" que también se ha llamado Tie2 y ork, es una RTK que se expresa predominantemente en endotelio vascular. La clonación molecular de Tek humano (ork) se ha descrito por Ziegler, Patente de Estados Unidos Nº 5.447.860. "Antagonistas de Tek" se describen, entre otros en Cerretti *et al.,* Publicación PCT Nº WO 00/75323, 14 de diciembre de 2000.

"TNFR" es un receptor del factor de necrosis tumoral, que incluye formas solubles del mismo. "TNFR/Fc" es un polipéptido de fusión de receptor del factor de necrosis tumoral-Fc.

"TRAIL" es un ligando que induce la apoptosis relacionado con TNF, un polipéptido transmembrana tipo II en la familia TNF descrita, entre otros, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.763.223, incluyendo formas solubles del mismo.

"VEGF" es el factor de crecimiento del endotelio vascular, también conocido como VPF o factor de permeabilidad vascular.

Polipéptidos del Receptor TWEAK Solubles

El ADNc del receptor TWEAK humano nativo tiene la secuencia de la SEC ID Nº 3, que codifica un polipéptido de 129 restos (SEC ID Nº 4). El examen de la secuencia de ADN predice un polipéptido que tiene un dominio extracelular de aproximadamente 78 aminoácidos (restos 1-78 de la SEC ID Nº 4, incluyendo el péptido señal), un dominio transmembrana de aproximadamente 23 aminoácidos (restos 79-101 de la SEC ID Nº 4), y un dominio intracelular de aproximadamente 28 aminoácidos (restos 102-129 de la SEC ID Nº 4). La secuencia del receptor TWEAK también se ha presentado por Kato *et al.,* Publicación PCT Nº WO 98/55508, 10 de diciembre de 1998 y por Incyte, Publicación PCT Nº WO 99&61471, 2 de diciembre de 1999. Como se usa en este documento, "TWEAKR" incluye polipéptidos que tienen estas secuencias, y en particular que comprenden los aminoácidos 28-79 de la SEC ID Nº 7, así como variantes de origen natural de los mismos.

En un aspecto de la invención, se usa un polipéptido que comprende un fragmento del receptor TWEAK soluble y un dominio de oligomerización como antagonista de TWEAKR para inhibir la angiogénesis y/o para inhibir la unión de ligando TWEAK a TWEAKR.

Los polipéptidos solubles son capaces de secretarse por células en las que se expresan. El uso de formas solubles de polipéptidos es ventajoso para ciertas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos a partir de células hospedadoras recombinantes está facilitada ya que los polipéptidos se secretan, y las proteínas solubles generalmente son adecuadas para administración parenteral. Puede identificarse un polipéptido soluble secretado (y distinguirse de sus equivalentes unidos a membrana no solubles) separando células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, y ensayando el medio (sobrenadante) para la presencia del polipéptido deseado. La presencia de polipéptido deseado en el medio indica que el polipéptido se secretó de las células y por tanto es una forma soluble del polipéptido. Los polipéptidos solubles pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas convencionales. Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido soluble deseado puede subclonarse en un vector de expresión para la producción del polipéptido, o el fragmento de ADN codificante deseado puede sintetizarse químicamente.

Los polipéptidos TWEAKR solubles comprenden todo o parte del dominio extracelular TWEAKR, pero generalmente carecen del dominio transmembrana o un fragmento del mismo que causaría la retención del polipéptido en la superficie celular. Los polipéptidos solubles pueden incluir parte del dominio transmembrana o todo o parte del dominio citoplasmático siempre que el polipéptido se secrete de la célula en la que se produce. Los polipéptidos TWEAKR solubles comprenden de forma ventajosa un péptido señal nativo o heterólogo cuando se sintetice inicialmente, para promover la secreción desde la célula, pero que se escinda la secuencia señal después de la secreción. Se entiende que la expresión "dominio extracelular de TWEAKR" abarca todo parte del dominio extracelular de TWEAKR nativo, así como formas relacionadas que incluyen aunque sin limitación: (a) fragmentos, (b) variantes, (c) derivados, y (d) polipéptidos de fusión. La capacidad de estas formas relacionadas de inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR puede determinarse *in vitro* o *in vivo*, usando métodos tales como los ejemplificados a continuación o usando otros ensayos conocidos en la técnica. Los ejemplos de polipéptidos TWEAKR solubles se proporcionan a continuación.

Los fragmentos TWEAKR solubles multiméricos son dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, heptámeros, octámeros, nonámeros, decámeros, o multímeros superiores de un fragmento de soluble de TWEAKR. Los multímeros pueden unirse juntos por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden ser parte de una cadena polipeptídica continua, donde cada monómero puede unirse a su monómero o monómeros adyacentes directamente por enlaces peptídicos, o indirectamente, a través de uno o más aminoácidos intermedios y enlaces peptídicos, por ejemplo, a través de un enlazador. Los multímeros también pueden unirse entre sí por, por ejemplo, otros tipos de enlaces covalentes, por ejemplo, por enlaces disulfuro formados entre restos de cisteína en diferentes polipéptidos TWEAKR solubles.

Los dominios de oligomerización son polipéptidos que provocan que polipéptidos que los comprenden se oligomericen, es decir, formen asociaciones covalentes y/o no covalentes con otro polipéptido que comprende un dominio de oligomerización correspondiente. Por tanto, se "oligomerizan" dos o más polipéptidos si se unen entre sí por sus dominios de oligomerización. Puede usarse cualquier dominio de oligomerización conocido en la técnica. Los ejemplos incluyen cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos, por ejemplo, dominios Fc, como se describe a continuación con más detalle. Los polipéptidos en un oligómero pueden tener secuencias polipeptídicas idénticas, secuencias polipeptídicas similares, o diferentes secuencias polipeptídicas. En realizaciones particulares, los polipéptidos oligomerizados de la presente invención comprenden de cuatro a catorce fragmentos TWEAKR solubles.

En algunas realizaciones, se prepara un polipéptido que comprende un fragmento TWEAKR soluble multimérico y un dominio de oligomerización usando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. Se ha descrito la preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas partes de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc), por ejemplo, por Ashkenazi *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991); Byrn *et al.* (Nature 344: 677, 1990); y Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins" en *Current Protocols in Immunology,* Supl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992).

Una realización de la presente invención se refiere a un oligómero TWEAKR-Fc que comprende dos polipéptidos, comprendiendo cada polipéptidos dos fragmentos TWEAKR solubles y un dominio Fc (diTWEAKR-Fc). Se inserta un polinucleótido que codifica el polipéptido diTWEAKR-Fc en un vector de expresión apropiado. Los polipéptidos

tal diTWEAKR-Fc se expresan en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y se dejan ensamblar como moléculas muy parecidas a anticuerpos, por lo que se forman enlaces disulfuro entre cadenas entre los restos Fc para producir TWEAKR soluble tetravalente. La expresión "polipéptido Fc" como se usa en este documento incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. Las formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización también se incluyen.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal al extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de Estados Unidos Nº 5.457.035 y por Baum *et al.,* EMBO J. 13:3992, 1994. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto en que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muetína muestra afinidad reducida por receptores Fc. Los polipéptidos de fusión que comprenden restos Fc, y multímeros formados a partir de los mismos, ofrecen una ventaja de facilitar la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A o proteína G, y polipéptidos de fusión Fc pueden proporcionar una vida media *in vivo* más larga, que es útil en aplicaciones terapéuticas, que los polipéptidos no modificados.

En otras realizaciones, un fragmento TWEAKR soluble multimérico puede sustituirse por la parte variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Si las proteínas de fusión se fabrican con cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo, es posible formar un oligómero TWEAKR soluble con ocho o más fragmentos TWEAKR solubles.

En otra realización, el dominio de oligomerización comprende un dominio de cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz *et al.,* Science 240: 1759, 1988), y desde entonces se han descubierto en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas están los péptidos y derivados de origen natural de los mismos que dimerizan o trimerizan. Se describen ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva pulmonar (SPD) descrita en Hoppe *et al.* FEBS Lett. 344:191, 1994. El uso de una cremallera de leucina modificada que permita la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow, *et al.,* Semin. Immunol. 6:267, 1994. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido TWEAKR soluble fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y el multímero TWEAKR soluble que forma se recupera del sobrenadante de cultivo.

Como alternativa, los polipéptidos de la invención comprenden enlazadores peptídicos (espaciadores). Un enlazador es una secuencia de uno o más aminoácidos cuyo extremo amino terminal está unido por un péptido a un primer polipéptido y cuyo extremo carboxi terminal tiene un enlace peptídico a un segundo polipéptido de modo que el primer polipéptido, el enlazador, y el segundo polipéptido forman una secuencia contigua de aminoácidos. Dicho enlazador se dice que "une" el primer polipéptido y el segundo polipéptido, en contraste con un primer polipéptido y un segundo polipéptido que están unidos juntos sin una secuencia polipeptídica intermedia (es decir, sin un enlazador). Entre los enlazadores peptídicos adecuados están los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.751.180, 4.935.233 y 5.073.627. Puede insertarse una secuencia de ADN que codifica un enlazador peptídico deseado entre ellos, y en la misma fase de lectura que, por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican fragmentos TWEAKR, y/o entre las secuencias polinucleotídicas que codifican los fragmentos TWEAKR y el dominio de oligomerización, usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede ligarse un oligonucleótido químicamente sintetizado que codifica el enlazador entre secuencias que codifican fragmentos TWEAKR solubles. En realizaciones particulares, un polipéptido de la invención comprende de dos a cuatro fragmentos TWEAKR solubles, separados por enlazadores peptídicos, y un dominio de oligomerización.

La presente invención abarca el uso de diversas formas de multímeros TWEAKR solubles oligomerizados que inhiben la angiogénesis y/u otras respuestas mediadas por TWEAKR. Se entiende que la expresión "multímero TWEAKR soluble oligomerizado" abarca multímeros oligomerizados que contienen todo o parte del dominio extracelular de TWEAKR nativo, así como formas relacionadas que incluyen, aunque sin limitación, multímeros oligomerizados de, fragmentos, variantes, derivados, y polipéptidos de fusión de TWEAKR soluble. La capacidad de estas formas relacionadas de inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR puede determinarse *in vitro* o *in vivo*, usando métodos tales como los ejemplificados en los ejemplos o usando otros ensayos conocidos en la técnica.

Entre los polipéptidos, multímeros y oligómeros útiles para practicar la presente invención están los polipéptidos que comprenden variantes de TWEAKR que retienen la capacidad de unirse a un ligando y/o inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR. Dichas variantes de TWEAKR incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos a TWEAKR nativo, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de la de TWEAKR nativo a causa de una o más deleciones, inserciones o sustituciones. Las realizaciones particulares incluyen, aunque sin limitación, polipéptidos TWEAKR, que comprenden de una a diez deleciones, inserciones o sustituciones de restos aminoacídicos, en comparación con una secuencia de TWEAKR nativa. Se incluyen como variantes de polipéptidos TWEAKR las variantes que son de origen natural, tales como formas alélicas o formas de corte y empalme alternativo, así como variantes que se han construido modificando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TWEAKR o la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica un polipéptido TWEAKR.

Generalmente, las sustituciones de uno o más aminoácidos presentes en el polipéptido nativo deben ser conservativas. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen sustitución de aminoácidos fuera del dominio o dominios activos, y sustitución de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de TWEAKR. Los ejemplos adicionales incluyen sustituir un resto alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un resto polar por otro, tal como Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn, o sustituciones de un resto aromático por otro, tal como Phe, Trp o Tyr, por otro. Una de dichas sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones preferidas, la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 70% idéntica en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo; en algunas realizaciones preferidas la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 80% idéntica en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. En algunas realizaciones más preferidas, la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 90% idéntica en secuencia de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo; en algunas realizaciones más preferidas la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 95% idéntica en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. En algunas realizaciones mucho más preferidas la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 98% idéntica en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo; en algunas realizaciones mucho más preferidas la variante de TWEAKR es al menos aproximadamente un 99% idéntica en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de TWEAKR nativo. El porcentaje de identidad, en el caso de polipéptidos y ácidos nucleicos, puede determinarse por inspección visual. El porcentaje de identidad puede determinarse usando el método de alineación de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970) como se revisa por Smtih y Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981). Preferiblemente, el porcentaje de identidad se determina usando un programa informático, por ejemplo, el programa informático GAP versión 10.x disponible en Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, véase también Devereux *et al., Nucl. Acids. Res.* 12:387, 1984). Los parámetros por defecto preferidos para programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgués, *Nucl. Acids. Res. 14*:6745, 1986, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds. *Atlas of Protein Sequence and Structure,* National Biomedical Research Foundation, pág. 353-358, 1979 para aminoácidos; (2) una penalización de 30 (aminoácidos) o 50 (nucleótidos) para cada hueco y una penalización adicional de 1 (aminoácidos) o 3 (nucleótidos) para cada símbolo en cada hueco; (3) sin penalización para huecos en los extremos; y (4) sin penalización máxima por huecos largos. También pueden usarse otros programas usados por los especialistas en la técnica de comparación de secuencias. Para fragmentos de TWEAKR, el porcentaje de identidad se calcula en base a la parte de TWEAKR que está presente en el fragmento.

La presente invención abarca adicionalmente el uso de polipéptidos TWEAKR solubles con o sin patrón de glicosilación nativo asociado. El TWEAKR expresado en sistemas de expresión de levaduras o mamífero (por ejemplo, células COS-1 o COS-7) puede ser similar a o significativamente diferente de un polipéptido TWEAKR nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la elección del sistema de expresión. La expresión de polipéptidos TWEAKR en sistemas de expresión bacterianos, tales como *E. coli*, proporciona moléculas no glicosiladas. Diferentes células hospedadoras también pueden procesar polipéptidos de forma diferente, provocando mezclas heterogéneas de polipéptidos con extremos N o C variables.

La estructura de aminoácidos primaria de polipéptidos TWEAKR solubles puede modificarse para crear derivados formando conjugados covalentes o de agregación con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Pueden prepararse derivados covalentes de TWEAKR uniendo grupos funcionales particulares a las cadenas laterales de aminoácidos de TWEAKR o en el extremo N o extremo C de un polipéptido TWEAKR.

Los polipéptidos de fusión de TWEAKR soluble que son útiles para la práctica la invención también incluyen conjugados covalentes o de agregación de un polipéptido TWEAKR con otros polipéptidos añadidos para proporcionar nuevas entidades polifuncionales.

Producción Recombinante de Polipéptidos del Receptor TWEAK

Los polipéptidos TWEAKR, incluyendo polipéptidos TWEAKR solubles, fragmentos, y polipéptidos de fusión, usados en la presente invención pueden prepararse usando un sistema de expresión recombinante. Las células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante ("células hospedadoras recombinantes") que codifican el polipéptido TWEAKR se cultivan en condiciones que promueven la expresión de TWEAKR y se recupera el TWEAKR. Los polipéptidos TWEAKR también pueden producirse en plantas o animales transgénicos, o por síntesis química.

La invención abarca moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos TWEAKR usados en la invención, incluyendo: (a) ácidos nucleicos que codifican los restos 28-79 de la SEC ID Nº 7 y fragmentos de los mismos que se unen a TWEAK; (b) ácidos nucleicos que son al menos un 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ó 99% idénticos a un ácido nucleico de (a), y que codifica un polipéptido capaz de unirse a TWEAK; (c) ácido nucleicos que hibridan en rigurosidad moderada a un ácido nucleico de (a), y que codifica un polipéptido capaz de unirse de TWEAK.

Debido a la degeneración del código genético, puede haber una variación considerable en las secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Se incluyen como realizaciones de la invención secuencias de

ácido nucleico capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas (por ejemplo, solución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 10 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de 50ºC, 5 X SSC, durante una noche) a las secuencias de ADN que codifican TWEAKR. Los especialistas en la técnica pueden determinar combinaciones adicionales de sal y temperatura que constituyen rigurosidad de hibridación moderada (véase también, Sambrook, *Molecular Cloning*: *A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982; y Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley and Sons, 1989 y las últimas versiones, que se incorporan en este documento como referencia). Las condiciones de mayor rigurosidad incluyen temperaturas más elevadas para hibridación y lavados después de la hibridación, y/o concentración salina inferior. El porcentaje de identidad de los ácidos nucleicos puede determinarse usando los métodos descritos anteriormente para polipéptidos, es decir, por métodos que incluyen inspección visual y el uso de programas informáticos tales como GAP.

Puede emplearse cualquier sistema de expresión adecuado para la producción de TWEAKR recombinante. Los vectores de expresión recombinantes incluyen ADN que codifica un polipéptido TWEAKR unido de forma operativa a secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción y la traducción adecuadas, tales como las obtenidas de un gen de mamífero, microbiano, viral, o de insecto. Las secuencias de nucleótidos están unidas de forma operativa cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con la secuencia de ADN de TWEAKR. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida de forma operativa a una secuencia de ADN de TWEAKR si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de ADN de TWEAKR. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores de la transcripción, operadores o potenciadores, un sitio de unión ribosómico a ARNm, y secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y la traducción. Una secuencia que codifica un péptido señal apropiado (nativo o heterólogo) puede incorporarse en vectores de expresión. Una secuencia de ADN para un péptido señal (mencionado por una diversidad de nombres incluyendo líder de secreción, péptido líder, o líder) puede fusionarse en fase a la secuencia de TWEAKR de modo que el polipéptido TWEAKR se traduzca en un principio como una proteína de fusión que comprenda el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células hospedadoras pretendidas promueve la secreción extracelular del polipéptido TWEAKR. El péptido señal se escinde del polipéptido TWEAKR después de la secreción de TWEAKR desde la célula.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos TWEAKR incluyen células procariotas, de levaduras y eucariotas superiores, incluyendo células de insecto y de mamífero. Se describen vectores apropiados de clonación y expresión para su uso con células bacterianas, fúngicas, de levaduras, de insecto, y de mamífero, por ejemplo, en Pouwels *et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual,* Elsevier, Nueva York, 1985.

Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o *Bacilli*. Las células hospedadoras procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium*, y diversas especies diferentes en los géneros *Pseudomonas, Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula hospedadora procariota, tal como *E. coli*, los polipéptidos TWEAKR pueden incluir un resto de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula hospedadora procariota. La Met N-terminal puede escindirse del polipéptido recombinante expresado.

Los vectores de expresión para su uso en células hospedadoras procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípica. Un marcador de selección fenotípica es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suple un requisito autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y por tanto proporciona un medio simple para identificar células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de ADN de TWEAKR se insertan en el vector pBR322. Otros vectores disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Bistec, Madison, WI, USA).

Las secuencias promotoras habitualmente usadas para vectores de expresión en células hospedadoras procariotas recombinantes incluye la β-lactamasa (penicilinasa), el sistema promotor de lactosa (Chang *et al.,* Nature, 275:615, 1978; Goeddel *et al.,* Nature 281:544, 1979), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel *et al.* Nucl. Acids Res. 8:4075, 1980; documento EP-A36776) y el promotor tac (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión en células hospedadoras procariotas particularmente útil emplea el promotor P_L del fago λ y una secuencia represora termoinestable cI857ts. Los vectores plasmídicos disponibles en la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor λ P_L incluyen el plásmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9, de *E coli*, ATCC 37092) y pPLc28 (residente en *E. coli* RRI, ATTC 53082).

Los polipéptidos TWEAKR también pueden expresarse en células hospedadoras de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). Otros géneros de levaduras, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*, también pueden emplearse. Los vectores de levaduras a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levaduras 2 μ, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para la poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción, y un gen marcador de selección. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levaduras incluyen, entre otros, promotores para la metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.,* J. Biol. Chem.255:2073, 1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess *et al.,* J. Adv. Enzyme Resg. 7:149, 1968: Holland *et al.,* Biochem. 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-

fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfo-glucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores adecuados y promotores para su uso en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en Hitzeman, documento EPA-73.657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible con glucosa descrito por Russell *et al.* (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) y Bebier *et al.* (Nature 300: 724, 1982). Pueden construirse vectores lanzadera replicables tanto en levaduras como en *E. coli* insertando secuencias de ADN de pBR322 para la selección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) en los vectores de levaduras descritos anteriormente.

La secuencia líder del factor α de levaduras puede emplearse para dirigir la secreción de polipéptidos recombinantes. La secuencia líder del factor α a menudo se inserta entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Véase, por ejemplo, Kurjan, *et al.,* Cell 30:933, 1982; Bitter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81*: 5330, 1984. Otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes de hospedadores de levaduras son conocidos para los especialistas en la técnica. Una secuencia líder puede modificarse cerca de su extremo 3' para que contenga uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder con el gen estructural.

Los especialistas en la técnica conocen protocolos de transformación en levaduras. Uno de dichos protocolos se describe por Hinnen *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978. El protocolo de Hinnen *et al.* selecciona transformantes Trp^+ en un medio selectivo, donde el medio selectivo consta de base de nitrógeno de levaduras al 0,67%, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 2%, 10 μg/ml de adenina y 20 μg/ml de uracilo.

Las células hospedadoras de levaduras transformadas por vectores que contienen una secuencia promotora ADH2 pueden cultivarse para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consta que extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y glucosa al 1%, suplementado con 80 μg/ml de adenina y 80 μg/ml de uracilo. La depresión del promotor ADH2 sucede cuando se agota la glucosa del medio.

También pueden emplearse sistemas de cultivo de células hospedadoras de insecto para expresar polipéptidos TWEAKR recombinantes, incluyendo polipéptidos TWEAKR solubles. Se revisan sistemas de baculovirus para la producción de polipéptidos heterólogos en células de insecto en Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47, 1988.

Las células de mamífero son particularmente preferidas para su uso como células hospedadoras. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.,* Cell 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), y la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan *et al.* (EMBO J. 10: 2821, 1991). Para la producción de polipéptidos terapéuticos es particularmente ventajoso usar una línea celular hospedadora de mamífero que se haya adaptado al crecimiento en medios que no contienen proteínas animales.

Se han descrito métodos establecidos para introducir ADN en células de mamífero (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture,* 1990, pág. 15-69). Pueden usarse protocolos adicionales que usan reactivos disponibles en el mercado, tales como Lipofectamina (Gibco/BRL) o Lipofectamina-Plus, para transfectar células (Felgner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987). Además, puede usarse electroporación para transfectar células de mamífero usando procedimientos convencionales, tales como los de Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). La selección de transformantes estables puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman *et al.,* Meth. in Enzymology 185: 487, 1990, describe varios esquemas de selección, tales como resistencia a dihidrofolato reductasa (DHFR). Una cepa hospedadora adecuada para selección en DHFR puede ser la cepa DX-B11 de CHO, que es deficiente en DHFR (Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980). Puede introducirse un plásmido que exprese el ADNc de DHFR en la cepa DX-B11, y solamente las células que contienen el plásmido pueden crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores de selección que pueden incorporarse en un vector de expresión incluyen ADNc que confieren resistencia a antibióticos, tales como G418 e higromicina B. Las células que albergan el vector pueden seleccionarse en base a la resistencia de estos compuestos.

Pueden eliminarse secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión en células hospedadoras de mamífero a partir de genomas virales. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras usadas habitualmente se obtienen de poliomavirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40), y citomegalovirus humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor temprano y tardío, potenciador, punto de corte y empalme, y sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores virales temprano y tardío son particularmente útiles porque ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral como un fragmento, que también puede contener un origen viral de replicación (Fiers *et al.,* Nature 273:113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). También pueden usarse fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes, con la condición de que la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hasta el sitio *Bgl* I localizado en el origen viral de SV40 de replicación esté incluido.

Las secuencias de control adicionales que demuestran mejorar la expresión de genes heterólogos a partir de vectores de expresión de mamífero incluyen elementos tales como el elemento de secuencia de aumento de la expresión (EASE) derivado de células CHO (Morris *et al., Animal Cell Technology*, 1997, pág. 529-534) y el líder tripartito

(TPL) y los ARN del gen VA de Adenovirus 2 (Gingeras *et al.,* J. Biol. Chem. 257:13475, 1982). Las secuencias del sitio de entrada interno al ribosoma (IRES) de origen viral permite que se traduzcan de forma eficaz los ARNm dicistrónicos (Oh y Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295, 1993; Ramesh *et al.,* Nucleic Acids Research 24:2697, 1996). La expresión de un ADNc heterólogo como parte de un ARNm dicistrónico seguido por el gen para una marcador de selección (por ejemplo, DHFR) ha demostrado mejorar la capacidad de transfección del hospedador y la expresión del ADNc heterólogo (Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Se describen vectores de expresión ejemplares que emplean ARNm dicistrónicos pTR-DC/GFP por Mosser *et al.,* Biotechniques 22:150, 1997, y p2A5I descrito por Morris *et al., Animal Cell Technology,* 1997, pág. 529-534.

Un vector de elevada expresión útil, pCAVNOT, se ha descrito por Mosley *et al.,* Cell 59:335, 1989. Otros vectores de expresión para su uso en células hospedadoras de mamífero pueden construirse como se describe por Okayama y Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983). Un sistema útil para una expresión de elevado nivel estable de ADNc de mamífero en células epiteliales mamarias murinas C127 puede construirse sustancialmente como se describe por Cosman *et al.* (Mol. Immunol. 23:935, 1986). Un vector de elevada expresión útil, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman *et al.,* Nature 312:768, 1984, se ha depositado como ATCC 39890. Se conocen en la técnica vectores de expresión en mamíferos útiles adicionales.

Con respecto a los péptidos señal que pueden emplearse para producir polipéptidos TWEAKR, el péptido señal TWEAKR nativo puede usarse o puede reemplazarse por un péptido señal heterólogo o secuencia líder, si se desea. La elección del péptido señal o líder puede depender se factores tales como el tipo de células hospedadoras en las que tiene que producirse el TWEAKR recombinante. Los ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en células hospedadoras de mamífero incluyen la secuencia señal para la interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos 4.965.195, la secuencia señal para el receptor de interleuquina-2 descrita en Cosman *et al.,* Nature 312:768 (1984); el péptido señal para el receptor de interleuquina-4 descrito en el documento EP 367.566; el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo I descrito en la Patente de Estados Unidos 4.968.607; y el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo II descrito en el documento EP 460.846.

Usando las técnicas de ADN recombinante incluyendo mutagénesis y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los especialistas en la técnica pueden producir secuencias de ADN que codifican polipéptidos TWEAKR que comprenden diversas adiciones o sustituciones de restos o secuencias de aminoácidos, o deleciones de restos o secuencias terminales o internas, incluyendo fragmentos, variantes, derivados y polipéptidos de fusión de TWEAKR.

También pueden usarse animales transgénicos, incluyendo ratones, cabras, ovejas y cerdos, y plantas transgénicas, incluyendo tabaco, tomate, legumbres, céspedes, y cereales, como biorreactores para la producción de polipéptidos TWEAKR, incluyendo polipéptidos TWEAKR solubles. En el caso de animales transgénicos, es particularmente ventajoso construir un ADN quimérico que incluya una secuencia codificante de TWEAKR unido de forma operativa a secuencias reguladoras que funcionan en cis que promueven la expresión del TWEAKR soluble en leche y/u otros fluidos corporales (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.843.705; la Patente de Estados Unidos Nº 5.880.327). En el caso de plantas transgénicas es particularmente ventajoso producir TWEAKR en un tipo celular, tejido, u órgano particular (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.639.947; la Patente de Estados Unidos Nº 5.889.189).

Los especialistas en la técnica reconocerán que el procedimiento para purificar polipéptidos TWEAKR solubles expresados variará de acuerdo con el sistema hospedador empleado, y si el polipéptido recombinante se secreta o no. Los polipéptidos TWEAKR solubles pueden purificarse usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico, interacción hidrófoba, purificación por afinidad, HPLC, o cromatografía de exclusión de tamaño. Los polipéptidos de fusión que comprenden restos Fc (y multímeros formados a partir de los mismos) ofrecen la ventaja de facilitar la purificación por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A o Proteína G.

Métodos de Tratamiento

A continuación se describen métodos y composiciones que emplean el receptor o ligando TWEAKR, o los genes que codifican el receptor o ligando TWEAKR, para promover o suprimir la angiogénesis en un tejido o grupo células diana. Los términos "tratar" "tratando", "tratamiento", "terapia", "terapéutico", y similares pretenden incluir terapia preventiva, terapia profiláctica, terapia de mejora y terapia curativa.

Los polipéptidos, composiciones, y métodos descritos se usan para inhibir la angiogénesis u otras respuestas mediadas por TWEAKR en un mamífero que necesita dicho tratamiento. En la expresión "respuesta mediada por TWEAKR" incluye cualquier respuesta celular, fisiológica, u otra respuesta biológica que esté causada al menos en parte por la unión del ligando TWEAK a TWEAKR, o que puede inhibirse o suprimirse, por completo o en parte, bloqueando la unión de TWEAK a TWEAKR. El tratamiento se administra de forma ventajosa para prevenir la aparición o la recurrencia de una enfermedad o afección mediada por la angiogénesis, o para tratar a un mamífero que tiene una enfermedad o afección mediada por la angiogénesis. Las enfermedades y afecciones mediadas por la angiogénesis incluyen aunque sin limitación trastornos oculares, afecciones malignas y metastásicas, y enfermedades inflamatorias.

Entre los trastornos oculares que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención están enfermedades oculares caracterizadas por neovascularización ocular incluyendo, aunque sin limitación, retinopatía diabética (una complica-

ción principal de la diabetes), retinopatía prematura (está afección ocular devastadora que frecuentemente conduce a problemas de visión crónicos y tiene elevados riesgos de ceguera, es una complicación grave durante el cuidado de los bebés prematuros), glaucoma neovascular, retinoblastoma, fibroplasia retrolental, rubeosis, uveítis, degeneración macular, y neovascularización de injerto de la córnea. Otras enfermedades inflamatorias oculares, tumores oculares, y enfermedades asociadas con la neovasuclarización de las coroides o iris también pueden tratarse de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también puede usarse para tratar afecciones malignas y metastásicas tales como tumores sólidos. Los tumores sólidos incluyen sarcomas y carcinomas tanto primarios como metastáticos.

La presente invención también puede usarse para tratar enfermedades inflamatorias incluyendo, aunque sin limitación artritis, reumatismo, y psoriasis.

Otras enfermedades y afecciones que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen tumores benignos y afecciones preneoplásicas, angiogénesis miocárdica, articulaciones hemofílicas, escleroderma, adhesiones vasculares, neovascularización de placas ateroscleróticas, telangiectasia, y granulación de las heridas.

Las patologías que son dependientes de la angiogénesis incluyen aterosclerosis coronaria o periférica e isquemia de cualquier tejido u órgano, incluyendo el corazón, hígado, cerebro y similares. Estos tipos de enfermedades pueden tratarse por composiciones que promueven la angiogénesis.

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden ensayarse en modelos animales *in vivo* para confirmar la actividad profiláctica o terapéutica deseada, así como para determinar la dosificación terapéutica óptima, antes de la administración a seres humanos.

La cantidad de un antagonista de TWEAKR particular que será eficaz en un método particular de tratamiento depende de la edad, tipo y gravedad de la afección a tratar, peso corporal, duración deseada del tratamiento, método de administración, y otros parámetros. Las dosificaciones eficaces se determinan por un médico u otro profesional médico cualificado. Las dosificaciones eficaces típicas son de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones preferidas la dosificación es aproximadamente 0,1-50 mg/kg; en algunas realizaciones preferidas la dosificación es aproximadamente 0,5-10 mg/kg. La dosificación para administración local típicamente es inferior que para administración sistémica. En algunas realizaciones una única administración es suficiente; en algunas realizaciones el antagonista de TWEAKR se administra como múltiples dosis en uno o más días.

Los antagonistas de TWEAKR típicamente se administran en forma de una composición farmacéutica que comprende uno o más vehículos farmacológicamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, adyuvantes, excipientes y vehículos que son farmacéuticamente aceptables para la vía de administración, y pueden ser soluciones acuosas u oleaginosas formuladas usando agentes de dispersión, humectantes, y de suspensión adecuados.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente son estériles y están libres de agentes pirogénicos, y pueden incluir agua, aceites, disolventes, sales, azúcares y otros carbohidratos, agentes de emulsión, agentes tamponantes, agentes anti-microbianos, y agentes quelantes. El vehículo farmacéuticamente aceptable particular y la proporción de compuesto activo a vehículo se determinan por la solubilidad y propiedades químicas de la composición, el modo de administración, y la práctica farmacéutica convencional.

Las composiciones que se describen en este documento pueden estar contenidas en un vial, frasco, tubo, inhalador de jeringa u otro recipiente para administraciones únicas o múltiples. Dichos recipientes pueden fabricarse de vidrio o un material polimérico tal como polipropileno, polietileno, o polivinilcloruro, por ejemplo. Los recipientes preferidos pueden incluir un precito, u otro sistema de cierre tal como un tapón de goma que puede penetrarse por una aguja para extraer una dosis única y después volver a precintarse después de la retirada de la aguja. Todos estos recipientes para líquidos inyectables, formulaciones liofilizadas, formulaciones liofilizadas reconstituidas o polvos reconstituibles para inyección conocidos en la técnica o para administración de composiciones en aerosol están contemplados para su uso en las composiciones y métodos descritos en este momento.

Los antagonistas de TWEAKR se administran al paciente de un modo apropiado para la indicación. Por tanto, por ejemplo, un antagonista de TWEAKR, o una composición farmacéutica del mismo, puede administrarse por vía intravenosa, transdérmica, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular, intranasal, epidural, oral, tópica, subcutánea, intracavitaria, liberación sostenida a partir de implantes, vías peristálticas, o por cualquier otra técnica adecuada. Se prefiere la administración parenteral.

En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, el tratamiento comprende adicionalmente tratar al mamífero con uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. El agente o agentes quimioterapéuticos adicionales pueden administrarse antes de, simultáneamente, o después de la administración del antagonista de TWEAKR. El uso de más de un agente quimioterapéutico es particularmente ventajoso cuando el mamífero que se está tratando tiene un tumor sólido. En algunas realizaciones de la invención reivindicada, el tratamiento comprende adicionalmente tratar al mamífero con radiación. La radiación, incluyendo braquiterapia y teleterapia, puede administrarse antes de, simultá-

neamente con, o después de la administración del segundo agente o agentes quimioterapéuticos y/o el antagonista de TWEAKR.

Cuando el mamífero que se está tratando tiene un tumor sólido, el método incluye preferiblemente la administración de, además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados entre el grupo compuesto por agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca y otros agentes quimioterapéuticos derivados de plantas, nitrosoureas, antibióticos anti-tumorales, enzimas anti-tumorales, inhibidores de topoisomerasa, análogos de platino, supresores adrenocorticales, hormonas, agonistas y antagonistas hormonales, anticuerpos, inmunoterapéuticos, factores de células sanguíneas, radioterapéuticos, y modificadores de la respuesta biológica.

En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la administración de, además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos seleccionados entre el grupo compuesto por cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, asparaginasa, vincristina, y vinblastina, linfoquinas y citoquinas tales como interleuquinas, interferones (incluyendo alfa, beta o delta) y TNF, clorambucilo, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiurea, metilhidrazina, mitotano, tamoxifeno, y fluoximesterona.

En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la administración de, además de un antagonista de TWEAKR, uno o más agentes quimioterapéuticos, incluyendo diversas formas solubles de los mismos, seleccionados entre el grupo compuesto por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, interleuquina-12, ligando 4-1BB, anticuerpos anti-4-1BB, antagonistas de TNF y antagonistas del receptor de TNF, TRAIL, antagonistas de VEGF, antagonistas del receptor de VEGF (incluyendo VEGF-R1 y VEGF-RS, también conocidos como Flt1 y Flk1 o KDR), antagonista de Tek, y agonistas CD148 (también conocido como DEP-1, ECRTP, y PTPRJ, véase Takahashi *et al.,* J. Am. Soc. Nephrol. 10:2135-45, 1999). En algunas realizaciones preferidas los antagonistas de TWEAKR de la invención se usan como un componente de, o en combinación con, "terapia metronómica", tal como la descrita por Browder *et al,* y Klement *et al.* (Cancer Research 60:1878, 2000; J. Clin. Invest. 105(8): R15, 2000; véase también Barinaga, Science 288:245, 2000).

Los polipéptidos, composiciones, y métodos de la presente invención pueden usarse como un tratamiento de primera línea, para el tratamiento de una enfermedad residual después de terapia primaria, o como un auxiliar a otras terapias incluyendo quimioterapia, cirugía, radiación, y otros métodos terapéuticos conocidos en la técnica.

Cuando las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se suministran de acuerdo con los métodos descritos en este documento, es ventajoso usar un mecanismo de suministro de modo que las secuencias se incorporen en una célula para la expresión. Los sistemas de suministro que pueden emplearse de forma ventajosa en los métodos contemplados incluyen el uso de, por ejemplo, sistemas de suministro viral tales como vectores retrovirales y adenovirales, así como sistemas de suministro no virales. Dichos sistemas de suministro son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

Métodos de Selección

El receptor TWEAK que se describe en este documento puede usarse en una diversidad de métodos de selección para aislar, por ejemplo, agonistas y antagonistas de TWEAKR. Los agonistas de TWEAKR son compuestos que promueven la actividad biológica de TWEAKR y los antagonistas de TWEAKR son compuestos que inhiben la actividad biológica de TWEAKR. Los compuestos identificados mediante los siguientes ensayos de selección pueden usarse en composiciones y métodos para modular la angiogénesis para tratar una diversidad de patologías. La presente invención proporciona métodos para seleccionar compuestos que (1) modulen la expresión del gen del receptor o ligando TWEAK en un tejido o célula diana, (2) modular la interacción receptor-ligando TWEAK para regular la angiogénesis; (3) unirse al receptor o ligando TWEAK para influir en la angiogénesis; o (4) impedir o regular la influencia del complejo receptor-ligando TWEAK unido en los acontecimientos aguas abajo tales como la angiogénesis.

La presente invención contempla el uso de ensayos que están diseñados para identificar compuestos que modulan la actividad de un gen del receptor o ligando TWEAK (es decir, modulan el nivel de la expresión génica de TWEAK y/o modulan el nivel de la actividad del producto génico TWEAK). Adicionalmente pueden utilizarse ensayos que identifican compuestos que se unen a las secuencias reguladoras del gen TWEAK (por ejemplo, secuencias promotoras; véase, por ejemplo Platt, 1994, J. Biol. Chem. 269, 28558-28562), y que puede modular el nivel de la expresión génica de TWEAK.

Dicho ensayo puede implicar, por ejemplo, el uso de un sistema de control, en el que sucede la transcripción y traducción del gen del receptor o ligando TWEAK, en comparación con un sistema que incluye un compuesto de ensayo que se sospecha que influye en la transcripción o traducción normal de un gen TWEAK. Por ejemplo, podría determinarse la proporción de ARN del receptor TWEAK producido por células cardiacas, y usar esto para determinar si un compuesto de ensayo influye en esta proporción. Para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo que se sospecha que influye en esta proporción normal de transcripción, primero podría determinarse la proporción de producción de ARN del receptor TWEAKR en un cultivo de células cardiacas por, por ejemplo, transferencia de Northern. Después podría administrarse el compuesto de ensayo a un cultivo de células cardiacas en condiciones por

lo demás idénticas al cultivo de control. Después podría determinarse la proporción de ARN del receptor TWEAK en el cultivo tratado con el compuesto de ensayo por, por ejemplo, transferencia de Northern, y compararse con la proporción de ARN del receptor TWEAK producido por las células de cultivo de control. Un aumento en el ARN del receptor TWEAK en las células en contacto con el compuesto de ensayo con relación a las células de control es indicativo de un estimulador de la transcripción y/o traducción del gen del receptor TWEAK en células cardiacas, mientras que una disminución es indicativa de un inhibidor de la transcripción y/o traducción del gen del receptor TWEAK en células cardiacas.

Existe una diversidad de métodos diferentes que pueden usarse para determinar el nivel de expresión génica del receptor o ligando TWEAK también, y pueden usarse adicionalmente en ensayos para determinar la influencia de un compuesto de ensayo en el nivel de la expresión génica del receptor o ligando TWEAK. Por ejemplo, puede aislarse un ARN de un tipo celular o tejido conocido, o que se sospecha que expresa el gen del receptor o ligando TWEAK, tal como cardiaco, y ensayarse utilizando técnicas de hibridación o PCR. Las células aisladas pueden obtenerse de cultivo celular o de un paciente. El análisis de las células tomadas del cultivo puede ser una etapa necesaria en la evaluación de células a usar como parte de una técnica de terapia génica basada en células o, como alternativa, para ensayar el efecto de compuestos en la expresión del gen del receptor o ligando TWEAK. Dichos análisis puede revelar aspectos tanto cuantitativos como cualitativos del patrón de expresión del gen del receptor o ligando TWEAK, incluyendo activación o inactivación del receptor de la expresión génica del receptor o ligando TWEAK.

En una realización de dicho esquema de detección, se sintetiza una molécula de ADNc a partir de una molécula de ARN de interés (por ejemplo, por transcripción inversa de la molécula de ARN en ADNc). Después se usa una secuencia del ADNc como molde para una reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como una reacción de amplificación por PCR, o similares. Los reactivos de ácido nucleico usados como reactivos de inicio de la síntesis (por ejemplo, cebadores) en las etapas de amplificación de transcripción inversa y ácido nucleico de este método se eligen entre los segmentos de ácido nucleico del gen del receptor o ligando TWEAK descritos anteriormente. Las longitudes preferidas de dichos reactivos de ácido nucleico son al menos 9-30 nucleótidos. Para la detección del producto amplificado, la amplificación de ácido nucleico puede realizarse usando nucleótidos marcados con radiactividad o sin radiactividad. Como alternativa, pueden producirse suficiente producto amplificado de modo que el producto pueda visualizarse por tinción con bromuro de etidio convencional o utilizando cualquier otro método de tinción de ácido nucleico adecuado.

Además, es posible realizar dichos ensayos de expresión génica del receptor o ligando TWEAK "*in situ*", es decir, directamente sobre secciones tisulares (fijas y/o congeladas) de tejido del paciente obtenido de biopsia o resecciones, de modo que no sea necesaria la purificación del ácido nucleico. Los segmentos de ácido nucleico del gen del receptor o ligando TWEAK descritos anteriormente pueden usarse como sondas y/o cebadores para dichos procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuevo, G. J., 1992, "PCR *In Situ* Hybridization: Protocols And Applications", Raven Press, NY).

Los compuestos identificados mediante ensayos tales como los descritos en este documento pueden ser útiles, por ejemplo, para modular la angiogénesis influida por la interacción receptor-ligando TWEAK. Dichos métodos para estimular o inhibir la angiogénesis influida por TWEAK se analizan en este documento.

Como alternativa, pueden diseñarse sistema de ensayo para identificar compuesto capaces de unirse al polipéptido receptor o ligando TWEAK de la invención e influir de este modo en la angiogénesis como resultado de esta interacción. Los compuestos identificados pueden ser útiles, por ejemplo, para modular la vascularización de tejidos o células diana, puede utilizarse en exploraciones para identificar compuestos que alteren las interacciones receptor-ligando TWEAK normales, o pueden por sí mismos alterar dichas interacciones.

El principio de los ensayos usados para identificar los compuestos que se unen al receptor o ligando TWEAK implica preparar una mezcla de reacción del receptor o ligando TWEAK y el compuesto de ensayo en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos componentes interaccionen y se unan, formando de este modo un complejo que puede retirarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden realizarse en una diversidad de modos. Por ejemplo, un método para realizar dicho ensayo para seleccionar compuestos que se unan al receptor TWEAK, implicaría anclar el receptor TWEAK o la sustancia de ensayo en una fase sólida y detectar los complejos receptor TWEAK/compuesto de ensayo anclados en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho método, el receptor TWEAK puede anclarse en una superficie sólida, y el compuesto de ensayo, que no está anclado, puede marcarse, directa o indirectamente. Como alternativa, estos mismos métodos podrían usarse para seleccionar compuestos de ensayo que se unan al ligando TWEAK en lugar del receptor.

En la práctica, puede utilizarse convenientemente placas de microtitulación como fase sólida. El componente anclado puede inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede conseguirse recubriendo simplemente la superficie sólida con una solución de la proteína y secándola. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, específico para la proteína a inmovilizar para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse por adelantado y almacenarse.

Para realizar el ensayo, el componente no inmovilizado se añade a la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Después de que se complete la reacción, se retiran los componentes que no han reaccionado (por ejemplo, por lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado en la superficie

sólida. La detección de complejos anclados en la superficie sólida puede conseguirse de varios modos. Cuando el componente no inmovilizado previamente está premarcado, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se formaron complejos. Cuando el componente no inmovilizado previamente no está premarcado, puede usarse una marcador indirecto para detectar complejos anclados en la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico para el componente no inmovilizado previamente (el anticuerpo, a su vez, puede marcarse directamente o marcarse indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado).

Como alternativa, puede realizarse una reacción en una fase líquida, separarse los productos de reacción de componentes sin reaccionar, y detectarse los complejos; por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico para el receptor o ligando TWEAK o el compuesto de ensayo para anclar cualquier complejo formado en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro componente del posible complejo para detectar complejos anclados.

Los compuestos identificados como agentes de unión para el receptor TWEAK o el ligando TWEAK pueden evaluarse adicionalmente para su capacidad de impedir la interacción receptor-ligando TWEAK, como se describe a continuación, y suprimir o promover de este modo la angiogénesis como resultado de la interacción receptor-ligando TWEAK. Dichos compuestos después pueden usarse terapéuticamente para estimular o inhibir la angiogénesis.

Los polipéptidos receptor y ligando TWEAK de la presente invención también pueden usarse en un ensayo de selección para identificar compuestos y pequeñas moléculas que interaccionen específicamente con el receptor o ligando TWEAK descrito para inhibir (antagonizar) o potenciar (agonizar) la interacción entre estas moléculas. Por tanto, por ejemplo, pueden usarse polipéptidos de la invención para identificar antagonistas y agonistas de células, preparaciones libres de células, bibliotecas químicas, y mezclas de productos naturales. Los antagonistas y agonistas pueden ser sustratos naturales o modificados, ligandos, enzimas, receptores, etc. de los polipéptidos de la presente invención, o pueden ser miméticos estructurales o funcionales de los polipéptidos. Los antagonistas potenciales de la interacción receptor-ligando TWEAK de la presente invención pueden incluir pequeñas moléculas, péptidos, y anticuerpos que se una a y ocupen un sitio de unión de los polipéptidos, causando que no estén disponibles para interaccionar y por lo tanto evitando su capacidad normal de modular la angiogénesis. Otros antagonistas potenciales son moléculas antisentido que pueden hibridar con ARNm *in vivo* y bloquear la traducción del ARNm en los polipéptidos de la presente invención. Los antagonistas potenciales incluyen pequeñas moléculas, péptidos y anticuerpos que se unen a los presentes polipéptidos TWEAK e influyen en la angiogénesis causada por las interacciones descritas de los polipéptidos TWEAK de la presente invención.

Los agonistas y antagonistas de molécula pequeña habitualmente son de un peso molecular de menos de 10K y pueden tener varias propiedades físico-químicas y farmacológicas que potencien la penetración celular, resistan la degradación y prolonguen sus vidas medias fisiológicas. (Gibbs, "Pharmaceutical Research in Molecular Oncology", *Cell*, Vol. 79, (1994).) Pueden usarse anticuerpos, que incluyen moléculas intactas así como fragmentos tales como Fab y F(ab')2, para unirse a e inhibir que los polipéptidos de la presente invención de bloqueen el comienzo de una cascada de señalización. Es preferible que los anticuerpos estén humanizados, y más preferiblemente que los anticuerpos sean humanos. Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por cualquiera de una diversidad de métodos bien conocidos.

Los métodos de selección específica son conocidos en la técnica y pueden incorporarse de forma extensiva en sistema de ensayo de alto rendimiento de modo que puedan explorarse grandes cantidades de compuestos de ensayo en una corta cantidad de tiempo. Los ensayos pueden realizarse en una diversidad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de exploración bioquímica, inmunoensayos, ensayos basados en células, etc. Estos formatos de ensayo son bien conocidos en la técnica. Los ensayos de selección de la presente invención son susceptibles a exploración de bibliotecas químicas y son adecuados para la identificación de candidatos de fármacos de molécula pequeña, anticuerpos, péptidos y antagonistas y agonistas.

Una realización de un método para identificar moléculas que antagonicen o inhiban la interacción receptor-ligando TWEAK implica añadir una molécula candidata a un medio que contenga células que expresan los polipéptidos de la presente invención; cambiar las condiciones de dicho medio de modo que, salvo por la presencia de la molécula candidata, interaccionen los polipéptidos; y observar la unión e inhibición de la angiogénesis. La unión de receptor y ligando TWEAK puede determinarse de acuerdo con ensayos de unión competitiva presentados anteriormente, y bien conocidos en la técnica. El efecto angiogénico de esta unión puede determinarse por ensayos de proliferación celular, tales como, por ejemplo, ensayos de densidad celular, u otros ensayos de proliferación celular que son bien conocidos en la técnica. La actividad de las células en contacto con la molécula candidata puede después compararse con las células idénticas que no se pusieron en contacto y agonistas y pueden identificarse antagonistas de las interacciones del polipéptido TWEAK de la presente invención. La medida de la actividad biológica puede realizarse por varios métodos bien conocidos tales como medida de la cantidad de proteína presente (por ejemplo, un ELISA) o de la actividad de la proteína. Una disminución en la estimulación biológica o activación indicaría un antagonista. Un aumento indicaría un agonista.

Los ensayos de exploración pueden diseñarse adicionalmente para encontrar moléculas que imiten la actividad biológica como resultado de las interacciones del polipéptido TWEAK de la presente invención. Las moléculas que imitan la actividad biológica de un polipéptido pueden ser útiles para potenciar la actividad biológica del polipéptido. Para identificar compuestos de agentes terapéuticamente activos que imiten la actividad biológica de un polipéptido, primero debe determinarse si una molécula candidata se une al polipéptido. Una molécula candidata de unión después

se añade a un ensayo biológico para determinar sus efectos biológicos. Los efectos biológicos de la molécula candidata después se comparan con los del polipéptido.

Adicionalmente, la formación de complejo en las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y proteína del gen del receptor o ligando TWEAK normal también puede compararse para la formación de complejos en mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y una proteína del gen del receptor o ligando TWEAK mutante. Esta comparación puede ser importante en aquellos casos en los que es deseable identificar compuestos que alteren las interacciones de proteínas del gen del receptor o ligando TWEAK mutantes pero no normales.

El ensayo para compuestos que impidan la interacción de los productos génicos del receptor o ligando TWEAK y los compañeros de unión pueden realizarse en un formato heterogéneo u homogéneo. Los ensayos heterogéneos implican anclar el producto génico del receptor o ligando TWEAK o el compañero de unión en una fase sólida y detectar los complejos anclados en la fase sólida al final de la reacción. En ensayos homogéneos, la reacción completa se realiza en una fase líquida. En cualquier enfoque, el orden de adición de los reactivos puede variarse para obtener diferente información acerca de los compuestos que se están ensayando. Por ejemplo, los compuestos de ensayos que impiden la interacción entre los productos génicos del receptor o ligando TWEAK y los compañeros de unión, por ejemplo, por competición, pueden identificarse realizando la reacción en presencia de la sustancia de ensayo; es decir, añadiendo la sustancia de ensayo a la mezcla de reacción antes de o simultáneamente con los productos génicos del receptor y ligando TWEAK. Como alternativa, los compuestos de ensayo que alteran los complejos formados, por ejemplo, compuestos con constantes de unión más elevadas que desplazan uno de los componentes de complejo, pueden ensayarse añadiendo el compuesto de ensayo a la mezcla de reacción después de que se hayan formado los complejos. Los diversos formatos se describen brevemente a continuación.

En un sistema de ensayo heterogéneo, el producto génico del receptor o ligando TWEAK, se ancla en una superficie sólida, mientras que la especie no anclada se marca, directa o indirectamente. En la práctica, se utilizan convenientemente placas de microtitulación. Las especies ancladas pueden inmovilizarse por uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede conseguirse simplemente recubriendo la superficie sólida con una solución del producto génico del receptor o ligando TWEAK y secándola. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado específico para la especie a anclar, para anclar las especies a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse por adelantado y almacenarse.

Para realizar el ensayo, el compañero de la especie inmovilizada se expone a la superficie recubierta con o sin el compuesto de ensayo. Después de que se complete la reacción, se retiran los componentes sin reaccionar (por ejemplo, por lavado) y permanecerá cualquier complejo formado inmovilizado en la superficie sólida. La detección de complejos anclados en la superficie sólida puede conseguirse de varios modos. Cuando las especies no inmovilizadas están premarcadas, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se formaron complejos. Cuando la especie no inmovilizada no está premarcada, puede usarse un marcador indirecto para detectar complejos anclados en la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico para la especie no inmovilizada inicialmente (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directamente o estar marcado indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado). Dependiendo del orden de adición de los componentes de reacción, pueden detectarse compuestos de ensayo que inhiban la formación de complejos o que alteran los complejos preformados.

Como alternativa, la reacción puede realizarse en una fase líquida en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, pueden separarse los productos de reacción de componentes sin reaccionar, y detectarse los complejos; por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico para uno de los componentes de unión para anclar cualquier complejo formado en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro compañero para detectar complejos anclados. De nuevo dependiendo del orden de adición de los reactivos a la fase líquida, pueden identificarse compuestos de ensayo que inhiben el complejo o que alteran complejos formados.

En una realización alternativa de la invención, puede usarse un ensayo homogéneo. En este enfoque, se prepara un complejo pre-formado del producto génico del receptor o ligando TWEAK en el que el producto génico del receptor o ligando TWEAK o sus compañeros de unión están marcados, pero la señal generada por el marcador se inactiva debido a la formación de complejo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.109.496 de Rubenstein que utiliza este enfoque para inmunoensayos). La adición de una sustancia de ensayo que compite con y desplaza una de la especie del complejo preformado provocará la generación de una señal por encima de la de fondo. De este modo, pueden identificarse sustancias de ensayo que alteran la interacción del producto génico del receptor o ligando TWEAK.

En una realización particular, el producto génico del receptor o ligando TWEAK puede prepararse para la inmovilización usando técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, puede fusionarse la región codificante del receptor o ligando TWEAK a un gen de la glutatión S-transferasa (GST) usando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, de modo tal que se mantenga su actividad de unión en la proteína de fusión resultante. El compañero de unión interactivo puede purificarse y usarse para producir un anticuerpo monoclonal, usando métodos practicados rutinariamente en la técnica. Este anticuerpo puede marcarse con el isotipo isótopo radioactivo <125>I, por ejemplo, por métodos practicados de forma rutinaria en la técnica. En un ensayo heterogéneo, por ejemplo, puede anclarse la proteína de fusión GST-receptor o ligando TWEAK a perlas de glutatión-agarosa. El producto génico del receptor o ligando TWEAK después puede añadirse en presencia o ausencia del compuesto de ensayo de un modo que permita que suceda la interacción y unión. Al final del periodo de reacción, puede retirarse por lavado el material no unido, y puede añadirse el

anticuerpo monoclonal marcado al sistema y dejar que se una a los componentes en complejo. La interacción entre los productos génicos del receptor y ligando TWEAK pueden detectarse midiendo la cantidad de radiactividad que permanece asociada con las perlas de glutatión-agarosa. Una inhibición satisfactoria de la interacción por el compuesto de ensayo provocará una disminución en la radiactividad medida.

Como alternativa, puede mezclarse una proteína de fusión GST-gen del receptor TWEAK y el producto génico del ligando TWEAK (o viceversa) juntos en líquido en ausencia de las perlas de glutatión-agarosa. El compuesto de ensayo puede añadirse durante o después de que se haya permitido que interaccionen las especies. Esta mezcla después puede añadirse a las perlas de glutatión-agarosa y se retira por lavado el material no unido. De nuevo, el grado de inhibición de la interacción del producto génico receptor-ligando TWEAK puede detectarse añadiendo el anticuerpo marcado y midiendo la radiactividad asociada con las perlas.

En otra realización de la invención, estas mismas técnicas pueden emplearse usando fragmentos peptídicos que corresponden a los dominios de unión de la proteína del receptor y/o ligando TWEAK, en lugar de una o ambas proteínas de longitud completa. Puede usarse cualquiera de varios métodos practicados de forma rutinaria en la técnica para identificar y aislar los sitios de unión. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, mutagénesis del gen que codifica una de las proteínas y exploración para la alteración de la unión en un ensayo de co-inmunoprecipitación. Después pueden seleccionarse las mutaciones de compensación en el gen que codifica la segunda especie en el complejo. El análisis de secuencia de los genes que codifican las proteínas respectivas revelará las mutaciones que corresponden a la región de la proteína implicada en la unión interactiva. Como alternativa, puede anclarse una proteína a una superficie sólida usando métodos descritos en esta Sección anteriormente, y dejarse interaccionar con y unirse a su compañero de unión marcado, que se ha tratado con una enzima proteolítica, tal como tripsina. Después del lavado, un péptido marcado, corto, que comprende el dominio de unión puede permanecer asociado con el material sólido, que puede aislarse e identificarse por secuenciación de aminoácidos. Además, el gen que codifica los segmentos puede modificarse para expresar fragmentos peptídicos de la proteína, que después pueden ensayarse para la actividad de unión y purificarse o sintetizarse.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, puede anclarse un producto génico del receptor o ligando TWEAK a un material sólido como se ha descrito, anteriormente, en esta Sección, fabricando una proteína de fusión GST-receptor o ligando TWEAK y permitiendo que se una a las perlas de glutatión-agarosa. El compañero de unión interactivo obtenido puede marcarse con un isótopo radiactivo, tal como <35>S, y escindirse con una enzima proteolítica tal como tripsina. Después pueden añadirse productos de escisión a la proteína de fusión anclada GST-receptor TWEAK o la proteína de fusión de ligando TWEAK y dejar que se unan. Después de retirar por lavado los péptidos no unidos, el material marcado unido, que representa el dominio de unión al compañero de unión, puede eluirse, purificarse y analizarse para la secuencia de aminoácidos por métodos bien conocidos. Los péptidos identificados de este modo pueden producirse sintéticamente o fusionarse a proteínas de facilitación apropiadas usando tecnología de ADN recombinante.

Las interacciones receptor-ligando TWEAK de la invención, *in vivo*, inician una cascada de acontecimientos que estimulan o suprimen la angiogénesis en un grupo de células o tejido diana. Las moléculas, tales como moléculas de ácido nucleico, proteínas, o moléculas pequeñas pueden, a su vez, influir en esta cascada. Los compuestos que alteran los efectos de interacción del receptor-ligando TWEAK de este modo pueden ser útiles para regular la angiogénesis.

El principio básico de los sistemas de ensayo usados para identificar los compuestos que interfieren con el efecto angiogénico o anti-angiogénico de la interacción receptor-ligando TWEAK implica preparar una mezcla de reacción que contenga el receptor y ligando TWEAK en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que los dos interaccionen y se unan, formando de este modo un complejo. Para ensayar un compuesto para la actividad inhibidora del efecto de esta interacción, se prepara la mezcla de reacción en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo puede incluirse inicialmente en la mezcla de reacción, o puede añadirse en un momento posterior a la adición del complejo receptor-ligando TWEAK. Las mezclas de reacción de control se incuban sin el compuesto de ensayo o con un placebo. Después se detecta la inhibición o potenciación de cualquier efecto del complejo TWEAK en la vascularización. La respuesta angiogénica normal en la reacción de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto impide la cascada de acontecimientos iniciada por la interacción receptor-ligando TWEAK. La angiogénesis potenciada en el cultivo que contiene compuestos de ensayo indica un estimulador del efecto del complejo receptor-ligando TWEAK.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar las realizaciones particulares y no limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo presenta la clonación e identificación del Receptor TWEAK.

Clonación de Expresión del ADNc del Receptor TWEAK

Para clonar el ADNc del Receptor TWEAK, se construyó un vector de expresión que codifica un líder de la hormona de crecimiento, un dominio de multimerización de cremallera de leucina, y el dominio extracelular C-terminal de TWEAK humano (véase Chicheportiche *et al.*, J. Biol. Chem. 272(51):32401, 1997). Este vector de expresión, que se llamó pDC409-LZ-TWEAK, comprendía la secuencia de ADN de la SEC ID Nº 1 y codificaba el polipéptido de la SEC ID Nº 2. Se produjeron sobrenadantes condicionados pCD409-LZ-TWEAK por transfección transitoria en

células CV1-EBNA. Estos sobrenadantes se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo de cabra policlonal anti-ratón que se había incubado previamente con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la cremallera de leucina. Se produjeron perlas de control mezclando las perlas recubiertas con sobrenadantes de células transfectadas con vector vacío.

Se transfectó una monocapa de células COS cultivadas en un matraz T175 con 15 μg de combinaciones de ADN de complejidad de 100.000 a partir de una biblioteca de expresión de ADNc HUVEC. Después de 2 días estas células se cambiaron de matraz, y se incubaron en 1,5 ml de medio de unión más leche en polvo desnatada al 5% durante 3 horas a 4 grados C en una rueda rotatoria. Las células se pre-aclararon añadiendo perlas de control y girándolas a 4 grados C durante 45 minutos adicionales después de lo cual se retiraron las células unidas a las perlas con un imán. El pre-aclarado se repitió 2-3 veces, después se añadieron las perlas recubiertas con TWEAK a las células y se giraron 30 minutos a 4 grados C. Las células que se unen a las perlas TWEAK se separaron por el uso de un imán y se lavaron 4x en PBS. Se extrajo el ADN plasmídico de estas células lisándolas en SDS al 0,1%, e introduciendo por electroporación los sobrenadantes en células DH101B. Las colonias se cultivaron durante una noche en medio selectivo de ampicilina. Los sobrenadantes se combinaron y usaron como una fuente de ADN plasmídico durante una ronda adicional de selección. Después de 2 rondas de selección, se recogieron clones positivos de la combinación resultante en base a su capacidad de unirse a TWEAK usando un protocolo de unión a portaobjetos como el descrito en la parte B, a continuación.

Se determinó que el ADNc del receptor TWEAK humano (también llamado TWEAKR) tenía la secuencia de la SEC ID Nº: 3, que codifica un polipéptido de 129 restos (SEC ID Nº: 4). El examen de la secuencia predice un polipéptido que tiene un dominio extracelular de aproximadamente 78 aminoácidos (restos 1-78 de la SEC ID Nº 4, que incluye el péptido señal), un dominio transmembrana de aproximadamente 23 aminoácidos (restos 79-101 de la SEC ID Nº 4) y un dominio intracelular de aproximadamente 28 aminoácidos (restos 102-129 de la SEC ID Nº 4). TWEAKR es el miembro más pequeño conocido de la familia del receptor de TNF. Tiene una región repetida rica en cisternas única en el dominio extracelular, en comparación con las 3-4 repeticiones de otros miembros de la familia del receptor de TNF. El polipéptido TWEAKR se describió previamente como una proteína transmembrana codificada por un clon de ADNc de hígado humano (documento WO 98/55508, véase también el documento WO 99/61471), pero no se había identificado como el receptor de TWEAK. Un homólogo murino, la Fn14 inducible por FGF (Meighan-Mantha *et al.,* J. Biol. Chem. 274(46):33166, 1999), es aproximadamente un 82% idéntica a la proteína humana, como se muestra por la alineación en la Figura 1.

El receptor TWEAK recién identificado se ensayó lado a lado con DR3 (que se había identificado como el receptor TWEAK por Marsters *et al.* Current Biology 8:525, 1998) para la capacidad de unirse a TWEAK.

B. *El Receptor TWEAK se Une a TWEAK*

Se transfectaron portaobjetos de células COS con vectores de expresión que contenían TWEAKR, DR3, o vector sin inserto (control). Después de dos días las células se incubaron con sobrenadantes concentrados de células CV-1 transfectadas con un vector que codifica la proteína de fusión del dominio extracelular de TWEAK de cremallera de leucina. Una hora después se lavaron las células y se sondearon con un anticuerpo marcado con I-125 contra el dominio de cremallera de leucina. Los portaobjetos se lavaron, fijaron y se autorradiografiaron usando una película de rayos x. Las células transfectadas con TWEAKR se unían a cantidades significativas de TWEAK. TWEAK no se unió a las células transfectadas con DR3 o las células de control. Este experimentó confirmó que el polipéptido TWEAK identificado en la parte A anterior, en lugar de DR3, es el receptor principal para TWEAK. Después del descubrimiento del receptor TWEAK funcional, otros investigadores también informaron de que DR3 no es el receptor principal para TWEAK (Kaptein *et al.,* FEBS Lett., 485 (2-3):135, 2000). La interacción de unión TWEAK-TWEAKR se caracterizó adicionalmente por análisis de Scatchard.

Se transfectaron células CV-1 con TWEAK de longitud completa humano y se mezclaron 1:30 con células Raji, que no expresan TWEAK. Las células se incubaron con diluciones en serie de receptor TWEAK humano-Fc marcado con 125-I durante 2 horas a 4 grados Celsius. Se separó la sonda libre y unida por microfuga de las muestras a través de una mezcla oleosa de ftalato en tubos de plástico. Se hizo el recuento gamma de los sobrenadantes y sedimentos. El análisis de Scatchard del ligando TWEAK que se une al receptor TWEAK mostró una constante de afinidad de unión (Ka) de aproximadamente 4,5 x 10^8 M^{-1}.

C. *El Receptor TWEAK se Expresa en Gran Medida en Tejido Cardiaco*

Para determinar el patrón de expresión del receptor TWEAK, se realizaron análisis de transferencia de Northern. Las transferencias de Northern de tejido múltiple humano se adquirieron de Clontech (Palo Alto, CA) y se sondearon con ADN de cebador aleatorio marcado con P-32 de la región codificante del receptor TWEAKR. Las transferencias se lavaron y autorradiografiaron usando películas de rayos x. Los resultados mostraron que en el adulto TWEAKR se expresa en gran medida en corazón, placenta, y algunas muestras de músculo esquelético. La fuerte expresión en el tejido cardiaco apoya adicionalmente la utilidad de TWEAKR en el diagnóstico y tratamiento de enfermedad cardiaca. En contraste con el adulto, los tejidos fetales expresaron TWEAKR de forma más ubicua; se observaron transcriptos de TWEAKR en el pulmón y el hígado.

Ejemplo 2

Este ejemplo presenta la producción recombinante de polipéptidos de fusión receptor TWEAK Fc solubles (TWEAKR-Fc).

Para construir el ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de TWEAKR fusionado a Fc, se unió un ácido nucleico que codifica los 79 aminoácidos N-terminales de TWEAKR, que incluye el líder (péptido señal), a un ácido nucleico que codifica una parte Fc de IgG1 humana. Las secuencias de esta construcción se muestran en la SEC ID Nº 6 (ácido nucleico) y la SEC ID Nº 7 (aminoácido). En la SEC ID Nº 7, los restos 1-27 son el péptido señal predicho (que se predice que se escindirá después de la secreción desde la célula; el sitio de escisión real se identificó por análisis de la secuencia N-terminal, véase a continuación), los restos 28-79 son del dominio extracelular de TWEAKR rico en cisteína, los restos 80-81 son del sitio de clonación de BglII, y el resto es la parte Fc. Después de la inserción en un vector de expresión de mamífero, y la expresión en y secreción desde las células hospedadoras de mamífero, esta construcción produjo un polipéptido denominado TWEAKR-Fc. El análisis de secuencia N-terminal determinó que el polipéptido secretado denominado TWEAKR-Fc tenía un extremo N-terminal correspondiente al resto 28 (Glu) de la SEC ID Nº 7. La actividad anti-angiogénica de TWEAKR-Fc se demostró usando ensayos tales como los descritos en los siguientes ejemplos. Se preparó una construcción de fusión a Fc análoga usando el dominio extracelular de TWEAKR murino.

Ejemplo 3

Este ejemplo presenta un ensayo de migración celular endotelial plana (cierre de heridas) útil para medir la actividad de los antagonistas del receptor de TWEAK. En este ensayo, se midió la migración celular endotelial como la velocidad de cierre de una herida circular en una monocapa de células cultivadas. La velocidad de cierre de la herida es lineal, y está regulada dinámicamente por agentes que estimulan e inhiben la angiogénesis *in vivo*.

Se aislaron, cultivaron, y usaron células endoteliales microvasculares renales humanas primarias, HRMEC, en el tercer pase después de descongelarse, como se describe en Martin *et al.*, *In vivo* Cell Dev Biol 33:261, 1997. Se generaron lesiones circulares replicadas, "heridas" (diámetro de 600-800 micrómetros) en monocapas de HRMEC confluyentes usando una taladradora con punta de silicio. En el momento de la herida se suplementó el medio (DMEM + BSA al 1%) con 20 ng/ml de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), EGF (4 ng/ml), y de 0,150 a 5 μg/ml de TWEAKR-Fc, o una combinación de 40 ng/ml de EGF y de 0,150 a 5 μg/ml de TWEAKR-Fc. El área de herida residual se midió como una función del tiempo (0-12 horas) usando un microscopio y software de análisis de imágenes (Bioquant, Nashville, TN). La velocidad de migración relativa se calculó para cada agente y combinación de agentes por regresión lineal del área de la herida residual representada en el tiempo. Los resultados se muestran en las Figuras 2-3.

En comparación con huIgG o medio+BSA, TWEAKR-Fc inhibía la migración endotelial inducida por PMA de un modo sensible a la dosis, reduciendo la velocidad de migración a niveles no estimulados a 5 μg/ml (Figura 2). Ni huIgG ni TWEAKR-Fc inhibió la migración basal (no inducida). Cuando se indujo la migración de HRMEC por EGF, TWEAKR-Fc inhibió la migración endotelial de un modo dependiente de la dosis, reduciendo la velocidad de migración a niveles no estimulados a 5 μg/ml (Figura 3).

Ejemplo 4

Este ejemplo representa un ensayo de bolsillo corneal de ratón útil para medir la actividad de los antagonistas del receptor TWEAK. En este ensayo, los agentes a ensayar para la actividad angiogénica o anti-angiogénica se inmovilizan en una forma de liberación lenta en un gránulo hydron, que se implanta en microbolsillos creados en el epitelio de la córnea de ratones anestesiados. La vascularización se mide como la aparición, densidad, y grado de crecimiento de vasos desde el límite de la córnea vascularizada en la córnea normalmente avascular.

Los gránulos hydron, como se escribe en Kenyon *et al.* Invest. Opthamol. & Visual Science 37:1625, 1996, incorporaban sucralfato con bFGF (90 ng/gránulo), bFGF e IgG (14 μg/gránulo, control), o bFGF y TWEAKR-Fc (14 μg). Los gránulos se implantaron quirúrgicamente en microbolsillos del estroma de la córnea creados por micro-disección de 1 mm medial al límite lateral de la córnea de ratones C57BL macho de 6-8 semanas de edad. Después de cinco días, en el pico de respuestas neovascular a bFGF, se fotografiaron las córneas, usando una lámpara de ranura Zeiss, a un ángulo incidente de 35-50º desde el eje polar en el meridiano que contiene el gránulo. La imágenes de digitalizaron y procesaron por filtros de sustracción de colores (Adobe Photoshop 4.0) para delinear los microvasos establecidos por el contenido de hemoglobina. El software de análisis de imágenes (Bioquant, Nashville, TN) se usó para calcular la fracción de la imagen de la córnea que estaba vascularizada, la densidad de los vasos en el área vascularizada, y la densidad de los vasos en la córnea total.

Como se muestra en la Tabla 1, TWEAKR-Fc (100 pmol) inhibió la angiogénesis de la córnea inducida por bFGF (3 pmol) reduciendo la densidad vascular al 50% de la inducida por FGF solo en FGF+IgG.

TABLA 1

Efecto de TWEAKR-Fc en la Angiogénesis Inducida por FGF en el Ensayo de Bolsillo Corneal de Ratón

Tratamiento	Reducción mayor del 50% en la cantidad y longitud de vasos n/n total (%)
FGF solo	0/2 (0%)
FGF+IgG	0/2 (0%)
FGF+TWEAKR-Fc	6/9 (67%)

Ejemplo 5

Este ejemplo presenta un ensayo de proliferación de células endoteliales útil para medir la actividad de un antagonista del receptor TWEAK. En este ensayo, se mide la proliferación de células endoteliales después de 4 días de crecimiento celular en pocillos de microtitulación usando una molécula de marcaje de células llamada calceína AM. Las esterasas expresadas por las células se escinden la calceína y provocan fluorescencia cuando se excita a 485 nm. La calceína no escindida no es fluorescente. La cantidad de fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de células endoteliales en el pocillo de cultivo. La proliferación de células endoteliales a menudo está regulada por agentes que estimulan y/o inhiben la angiogénesis *in vivo*.

Se obtuvieron HUVEC primarias (células endoteliales de la vena umbilical humana) a partir de una fuente comercial (Clonetics, Walkersville, MD), se cultivaron y usaron en el pase 2 a 7. Se establecieron cultivos duplicados añadiendo 3000 HUVEC a cada pocillo de microtitulación en medios basales de células endoteliales (EBM, un medio basal de células endoteliales que no contiene factores de crecimiento o suero y está basado en las formulaciones de medios desarrolladas por el Dr. Richard Ham de la University of Colorado, Clonetics) más FBS al 0,05% (suero bovino fetal). En el momento del inicio del cultivo se añadió FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos-2, 10 ng/ml) o TWEAK humano (100 ng/ml) a los cultivos en presencia de IgG humana (huIgG, control) o TWEAKR-Fc humano a concentraciones que varían de 0,08 μg/ml a 20 μg/ml (0,25 a 20 μg/ml para inducido por TWEAK y 0,08 a 6,7 μg/ml para inducido por FGF-2). Los cultivos que contienen HUVEC se incubaron durante 4 días a 37 grados C, CO_2 al 5%. En el cuarto día de cultivo se añadió calceína-AM 4 μM a los cultivos y 2 horas después se evaluaron los pocillos para la fluorescencia. Los resultados, expresados como los recuentos de fluorescencia medios (485-530 nm) para pocillos duplicados más o menos el SEM, como se muestran en las Figuras 4 y 5.

TWEAKR-Fc inhibe específicamente la proliferación de HUVEC inducidas por TWEAK de un modo dependiente de la dosis cuando se compara con huIgG que no afectaba a la proliferación inducida por TWEAK (Figura 4). Además, TWEAKR-Fc inhibía la proliferación basal de HUVEC observada durante el cultivo en EBM más FBS al 0,05%, en comparación con huIgG que no lo hacía. Es interesante observar que TWEAKR-Fc también inhibía la proliferación de HUVEC medida por FGF-2 a concentraciones mayores de 2 μg/ml, en comparación con huIgG que no afectaba a la respuesta proliferativa de HUVEC inducida por FGF-2 (Figura 5). Estos resultados muestran que TWEAKR-Fc inhibe la proliferación de HUVEC inducida por la adición de TWEAK humano recombinante exógeno. El TWEAKR-Fc inhibe parcialmente la proliferación de HUVEC inducida en suero que indica que HUVEC producen TWEAK endógeno que promueve el crecimiento/supervivencia de la EC (célula endotelial) por TWEAKR. La atenuación por TWEAKR-Fc de la proliferación inducida por FGF-2 indica que al menos parte de la respuesta de EC a FGF-2 depende de la interacción TWEAK/TWEAKR endógena.

Ejemplo 6

Este ejemplo presenta un modelo de isquemia/injerto cardiaco murino para medir la actividad de un antagonista del receptor TWEAK.

La supervivencia de tejido cardiaco transplantado heterotópicamente de un donante murino a piel de oreja de otro ratón genéticamente similar requiere una neovascularización adecuada por el corazón transplantado y el tejido adyacente, para promover la superficie y energía para la función muscular cardiaca. Una vasculatura inadecuada en el sitio del transplante causa excesiva isquemia al corazón, daño tisular, y fallo del tejido a injertar. Los agentes que antagonizan los factores implicados en la migración de células endoteliales en la formación de vasos pueden disminuir la angiogénesis en el sitio de transplante, limitando de este modo la función del tejido injertado y finalmente el propio injerto. Se usa un modelo de isoinjerto cardiaco heterotópico murino para demostrar los efectos de antagonistas de TWEAKR, incluyendo anticuerpos y TWEAKR-Fc, en neovascularización.

Se da a receptores BALB/c hembra (≈ 12 semanas de edad) injertos de corazón neonato de ratones donantes de la misma cepa. El tejido cardiaco donante se injerta en la punta de la oreja izquierda del receptor en el día 0 y los ratones se dividen en dos grupos. El grupo de control recibe IgG humana (Hu IgG) mientras que el otro grupo recibe el antagonista de TWEAKR, ambos por vía intraperitoneal. Los tratamientos se continúan durante cinco días consecutivos. La funcionalidad de los injertos se determina controlando la actividad pulsátil visible en los días 7 y 14 después del injerto. La inhibición del injerto funcional, se determina como función de la dosis de antagonista de TWEAKR. La histología de los corazones transplantados se examina para visualizar los efectos del antagonista de TWEAKR en edema en el sitio del transplante y la vasculatura del tejido hospedador y donante (usando, por ejemplo, tinción con Factor VIII).

Ejemplo 7

Este ejemplo presenta un método para tratar tumores con un antagonista del receptor TWEAK.

Los antagonistas de TWEAKR se ensayan en modelos animales de tumores sólidos. El efecto de los antagonistas de TWEAKR se determina midiendo la frecuencia tumoral y crecimiento tumoral.

Ejemplo 8

Este ejemplo presenta un ensayo basado en ELISA útil para determinar las propiedades de unión de moléculas de unión a TWEAK, por ejemplo, oligómeros TWEAKR-Fc monoméricos y multiméricos. Para este ejemplo, se usaron huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7), di-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 11), tri-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 13) y TWEAKR:DR5:Fc (SEC ID Nº 9).

Se recubrieron placas de inmunoensayo enzimático LINBRO®/TITERTEK™ de noventa y seis pocillos (ICN Biochemical, Aurora, OH) con TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7) a una concentración de 1 mg/ml en PBS, 50 μl/pocillo, se aplicó un precinto de placa, y se incubó durante una noche a 4ºC. Cada pocillo se lavó tres veces con PBST (PBS + TWEEN 20 al 0,1%; 200 μl/pocillo, después se incubaron durante una hora a 37ºC en PBST+ leche en polvo desnatada el 3% (NFDM).

En reacciones diferentes, se pre-incubó TWEAK marcado con FLAG (TWEAK-FLAG) con cada uno de los polipéptidos TWEAKR anteriores a temperatura ambiente durante 30 minutos, en DMEM + suero de bajo contenido en Ig al 0,5%, en placas de fondo en U de 96 pocillos a una concentración final de TWEAK-FLAG de 50 ng/ml y una concentración final de cada polipéptido TWEAKR de 9.000 a 4 ng/ml, en diluciones en serie de 3 veces.

La placa EIA se lavó de nuevo tres veces con PBST + NFDM al 3%. Se añadieron 50 μl/pocillo de mezcla ligando/receptor, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, después se lavaron tres veces con PBST + NFDM al 3%.

Se añadió anticuerpo biotinilado FLAG-M2, diluido 1:500 en PBST + NFDM al 3%, a 50 μl/pocillo, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBST + NFDM al 3%.

Se añadió SA-HRP, diluido 1:2000 en PBST + NFDM al 3%, a 50 μl/pocillo, después se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron cinco veces, se añadieron 100 μl/pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 5-20 minutos.

La reacción se detuvo con 50 μl/pocillo de H_3PO_4 1 M y se leyeron las absorbancia a $A_{450/570}$.

Como se muestra en la Figura 6, TWEAKR:Fc mostró la unión más débil, seguido por TWEAKR:DR5:Fc, después di-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 11), después tri-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 13). Por tanto, cuanto más solubles eran los dominios TWEAKR que comprendían la proteína de fusión, más fuerte se unían a TWEAK: Además, el aumento en la unión fue más que aditiva, como se muestra por la diferencia en la unión entre TWEAKR:Fc y di-TWEAKR:Fc.

Ejemplo 9

Este ejemplo presenta un ensayo de unión competitiva usando TWEAKR:Fc marcado con Europio útil para determinar las propiedades de unión de las moléculas de unión a TWEAK, por ejemplo, oligómeros TWEAKR:Fc monoméricos y multiméricos. Para este ejemplo, se usaron huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7), di-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 11), tri-TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 13) y TWEAKR:DR5:Fc (SEC ID Nº 9).

Se diluyó anticuerpo M2 anti-flag a una concentración de 4 μg/ml en $NaHCO_3$ 0,1 M. Se usaron 100 μl/pocillo para recubrir placas de fondo plano de 96 pocillos. Se aplicó un precinto de placas y las placas se incubaron a 4ºC durante una noche.

Cada pocillo se lavó cinco veces con PBST (PBS + TWEEN 20 al 0,1%), después se añadieron 200 μl/pocillo de PBST + NFDM al 3%. Las placas se incubaron durante una hora a 37ºC, después se lavaron cinco veces con PBST.

Se diluyó FLAG-TWEAK a 50 ng/ml en PBS y se añadieron a 100 μl/pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente, con agitación, durante una hora. Las placas se lavaron cinco veces más en PBST.

Los receptores no marcados y marcados con Europio se premezclaron en placas de fondo en U de 96 pocillos, se diluyeron en PBST + NFDM al 3% a una concentración final de 35 ng/ml para TWEAKR marcado por europio, diluciones de tres veces de receptores no marcados, a concentraciones finales de 9.000-12 ng/ml.

A cada pocillo se añadieron 100 μl de receptores pre-mezclados. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación, después se lavaron diez veces como anteriormente. Se añadieron 100 μl/pocillo de solución de potenciación (Perkin Elmer, 1244-105) y las placas se incubaron durante cinco minutos con agitación. Las absorbancias se leyeron a A_{615} en un lector de placa Wallac.

Como se muestra en la Figura 7, TWEARK monomérico demostró la peor capacidad de competir con TWEAKR:Fc marcado con europio por la unión a TWEAK, seguido por TWEAKR dímero y TWEAKR trimético.

Ejemplo 10

Este ejemplo representa un ensayo tipo ELISA útil para determinar las propiedades de unión de las moléculas de unión a TWEAK, por ejemplo, oligómeros TWEAKR:Fc monoméricos y multiméricos.

TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 15) es una proteína de fusión que comprende un resto de metionina N-terminal, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, cinco restos glicina, y un péptido derivado del fragmento Fc. TWEAKR:1KPEG: Fc (SEC ID Nº 17) es una proteína de fusión que comprende un resto de metionina N-terminal, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, un enlazador, y un péptido derivado del fragmento Fc. TWEAKR:1KPEG:TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 18) es una proteína de fusión que comprende un resto de metionina N-terminal, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, un enlazador, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, cinco restos de glicina, y un péptido derivado del fragmento Fc. TWEAKR:Gly5:TWEAKR:Gly5:Fc (SEC ID Nº 19) es una proteína de fusión que comprende un resto de metionina N-terminal, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, cinco restos de glicina, los restos 29 a 70 del receptor TWEAK, cinco restos de glicina y un péptido derivado del fragmento Fc.

Usando un ensayo estilo ELISA similar al descrito en el Ejemplo 8, se determinó que los oligómeros monoméricos (TWEAKR:Gly5:Fc y TWEAKR:1KPEG:Fc) se unían a TWEAK aproximadamente igual de bien, pero no tan bien como las construcciones oligoméricas diméricas (TWEAKR:1KPEG:TWEAKR:Gly5:Fc y TWEAKR:Gly5: TWEAKR:Gly5:Fc) (Figura 8).

Ejemplo 11

Este ejemplo presenta los resultados de un ensayo de unión a TWEAK basado en ELISA usando TWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7), TWEAKR 40mono-3 (SEC ID Nº 21), TWEAKR 40dimer-1 (SEC ID Nº 23), TWEAKR 40trimer-5 (SEC ID Nº 25), TWEAKR 40quad-2 (SEC ID Nº 27), TWEAKR 40quint-1 (SEC ID Nº 29), TWEAKR 43mono-F4 (SEC ID Nº 31), TWEAKR 43dimer-F2 (SEC ID Nº 33), TWEAKR 43trimer-1 (SEC ID Nº 35), TWEAKR 43quad-2 (SEC ID Nº 37), TWEAKR 43quint-3 (SEC ID Nº 39), TWEAKR 43hex-1 (SEC ID Nº 41) y TWEAKR 43sep-1 (SEC ID Nº 43). Se usó el protocolo descrito en el Ejemplo 8 excepto en que se omitió en el presente ejemplo BSA de los tampones de lavado. Los resultados se presentan en las Figuras 9-12.

Ejemplo 12

Este ejemplo presenta los resultados de un ensayo de unión competitiva usando TWEAKR:Fc marcado con europio como se ha descrito en el Ejemplo 9. En el presente ejemplo, se usaron huTWEAKR:Fc (SEC ID Nº 7), TWEAKR 40mono-3 (SEC ID Nº 21), TWEAKR 40dimer-1 (SEC ID Nº 23), TWEAKR 40trimer-5 (SEC ID Nº 25), TWEAKR 40quad-2 (SEC ID Nº 27), TWEAKR 40quint-1 (SEC ID Nº 29), TWEAKR 43mono-F4 (SEC ID Nº 31), TWEAKR 43dimer-F2 (SEC ID Nº 33), TWEAKR 43trimer-1 (SEC ID Nº 35), TWEAKR 43quad-2 (SEC ID Nº 37), TWEAKR 43quint-3 (SEC ID Nº 39), TWEAKR 43hex-1 (SEC ID Nº 41) y TWEAKR 43sep-1 (SEC ID Nº 43). Los resultados se presentan en las Figuras 13 y 14.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un primer fragmento soluble de un receptor TWEAK, un segundo fragmento soluble de un receptor TWEAK, y un dominio de oligomerización, donde dicho polipéptido se une a TWEAK, y dicho primer fragmento soluble consta de una secuencia que es al menos un 90%, 95%, o 100% idéntica a un secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

b. los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7;

c. los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y

d. los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

b. los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7;

c. los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y

d. los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

3. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un tercer, cuarto, quinto, sexto o séptimo fragmento soluble de un receptor TWEAK.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en el que dicho primer fragmento soluble, segundo fragmento soluble, tercer fragmento soluble, cuarto fragmento soluble, quinto fragmento soluble, sexto fragmento soluble, y séptimo fragmento soluble constan cada uno independientemente de una secuencia que es al menos un 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. los restos 29 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

b. los restos 28 a 79 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7;

c. los restos 30 a 73 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7; y

d. los restos 30 a 70 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 7

5. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un enlazador.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicho enlazador une dicho primer fragmento soluble del receptor TWEAK y dicho segundo fragmento soluble del receptor TWEAK.

7. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicho enlazador une dicho segundo fragmento soluble del receptor TWEAK y dicho dominio de oligomerización.

8. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un primer enlazador y un segundo enlazador, en el que dicho primer enlazador une dicho primer fragmento soluble del receptor TWEAK y dicho segundo fragmento soluble del receptor TWEAK, y dicho segundo enlazador une dicho segundo fragmento soluble del receptor TWEAK y dicho dominio de oligomerización.

9. El polipéptido de la reivindicación 5, en el que dicho enlazador comprende la secuencia de aminoácidos GGGGG (SEC ID Nº 45).

10. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho primer fragmento soluble y dicho segundo fragmento soluble están unidos juntos sin una secuencia polipeptídica intermedia.

11. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho primer fragmento soluble y dicho dominio de oligomerización están unidos juntos sin una secuencia polipeptídica intermedia.

12. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho primer fragmento soluble, dicho segundo fragmento soluble, y dicho dominio de oligomerización están unidos juntos, sin una secuencia polipeptídica intermedia, en un polipéptido lineal y contiguo.

13. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho dominio de oligomerización es N-terminal o C-terminal a dicho primer fragmento soluble de TWEAKR y dicho segundo fragmento soluble del receptor TWEAK.

14. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho dominio de oligomerización comprende una cremallera de leucina o un fragmento de un anticuerpo.

15. El polipéptido de la reivindicación 14, en el que dicho fragmento de un anticuerpo comprende un dominio de Fc.

16. El polipéptido de la reivindicación 1, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia que es al menos un 90%, 95% o 100% idéntica, a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. SEC ID Nº 9;

b. SEC ID Nº 11;

c. SEC ID Nº 13;

d. SEC ID Nº 15;

e. SEC ID Nº 17;

f. SEC ID Nº 18;

g. SEC ID Nº 19;

h. SEC ID Nº 21;

i. SEC ID Nº 23;

j. SEC ID Nº 25;

k. SEC ID Nº 27;

l. SEC ID Nº 29;

m. SEC ID Nº 31;

n. SEC ID Nº 33;

o. SEC ID Nº 35;

p. SEC ID Nº 37;

q. SEC ID Nº 39;

r. SEC ID Nº 41;

s. SEC ID Nº 43; y

t. SEC ID Nº 44.

17. Una proteína que comprende un primer polipéptido de la reivindicación 1 y un segundo polipéptido de la reivindicación 1, en la que dicho primer y segundo polipéptido están oligomerizados entre sí.

18. La proteína de la reivindicación 17 en la que la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicha segundo polipéptido.

19. La proteína de la reivindicación 17 en la que la secuencia de aminoácidos de dicho primer polipéptido no es idéntica a la secuencia de aminoácidos de dicho segundo polipéptido.

20. El uso del polipéptido de la reivindicación 1 para preparar una composición para inhibir un receptor TWEAK.

21. El uso del polipéptido de la reivindicación 1 para preparar una composición para inhibir la angiogénesis en un sujeto.

22. El uso de la reivindicación 21 en el que dicha composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. El uso de la reivindicación 21 en el que dicho sujeto es un mamífero.

24. El uso de la reivindicación 23 en el que dicho mamífero es un ser humano.

25. El uso del polipéptido de la reivindicación 1, para preparar una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o afección mediada o exacerbada por la angiogénesis.

26. El uso de la reivindicación 25 en el que dicha enfermedad o afección está **caracterizada** por neovascularización ocular.

27. El uso de la reivindicación 25 en el que dicha enfermedad o afección es un tumor sólido.

28. El uso de la reivindicación 27 en el que dicho uso comprende adicionalmente tratar a dicho sujeto con radiación.

29. El uso de la reivindicación 27 en la que dicha composición comprende adicionalmente un segundo agente quimioterapéutico.

30. El uso de la reivindicación 29 en el que dicho segundo agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por: un agente alquilante, un antimetabolito, un alcaloide de la vinca, un quimioterapéutico derivado de plantas, una nitrosourea, un antibiótico anti-tumoral, una enzima anti-tumoral, un inhibidor de topoisomerasa, un análogo de platino, un supresor adrenocortical, una hormona, un agonista hormonal, un antagonista hormonal, un anticuerpo, un inmunoterapéutico, un factor de células sanguíneas, un radioterapéutico, un modificador de la respuesta biológica, cisplatino, ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán, bleomicina, carboplatino, fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, metotrexato, taxol, aspariginasa, vincristina, vinblastina, una linfoquina, una citoquina, una interleuquina, un interferón, interferón alfa, interferón beta, interferón delta, TNF, clorambucilo, busulfán, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, citarabina, mecarptopurina, tioguanina, vindesina, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, L-asparaginasa, hidroxiurea, metilhidrazina, mitotano, tamoxifeno, y fluoximesterona.

31. El uso de la reivindicación 25 en el que dicha enfermedad o afección es una enfermedad o afección inflamatoria.

32. El uso de la reivindicación 31 en el que dicha composición comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico.

33. El uso de la reivindicación 32 en el que dicho segundo agente terapéutico inhibe una citoquina o un receptor de citoquina que promueve la inflamación.

34. El uso de la reivindicación 33 en el que dicho segundo agente terapéutico comprende un fragmento soluble de dicho receptor de citoquina, un anticuerpo que se une a dicha citoquina, o un anticuerpo que se une a dicho receptor en citoquina.

35. El uso de la reivindicación 32, en el que dicho segundo agente terapéutico activa un receptor que inhibe la inflamación.

36. El uso de la reivindicación 32 en el que dicho segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por ligando Flt3, ligando CD40, interleuquina-2, un antagonista de interleuquina-4, un antagonista de IL-13, interleuquina-12, ligando 4-1BB, un anticuerpo anti-4-1BB, un antagonista de TNF, un antagonista del receptor de TNF, TRAIL, un antagonista de CD148, un antagonista de VEGF, un antagonista del receptor de VEGF, un antagonista de IgE, y un antagonista de Tek.

37. Un ácido nucleico, o su complemento, que comprende una secuencia codifica dicho polipéptido de la reivindicación 1.

38. El ácido nucleico de la reivindicación 37, donde dicho ácido nucleico, o su complemento, hibrida, en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas con un segundo ácido nucleico, y dicho segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. SEC ID Nº 10;

b. SEC ID Nº 12;

c. SEC ID Nº 14;

d. SEC ID Nº 16;

e. SEC ID Nº 20;

f. SEC ID Nº 22;

g. SEC ID Nº 24;

h. SEC ID Nº 26;

i. SEC ID Nº 28;

j. SEC ID Nº 30;

k. SEC ID Nº 32;

l. SEC ID Nº 34;

m. SEC ID Nº 36;

n. SEC ID Nº 38;

o. SEC ID Nº 40; y

p. SEC ID Nº 42.

39. El ácido nucleico de la reivindicación 37, donde dicho ácido nucleico, o su complemento, comprende una secuencia que es al menos un 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. SEC ID Nº 10;

b. SEC ID Nº 12;

c. SEC ID Nº 14;

d. SEC ID Nº 16;

e. SEC ID Nº 20;

f. SEC ID Nº 22;

g. SEC ID Nº 24;

h. SEC ID Nº 26;

i. SEC ID Nº 28;

j. SEC ID Nº 30;

k. SEC ID Nº 32;

l. SEC ID Nº 34;

m. SEC ID Nº 36;

n. SEC ID Nº 38;

o. SEC ID Nº 40; y

p. SEC ID Nº 42.

40. El ácido nucleico de la reivindicación 37 donde dicho ácido nucleico codifica una secuencia polipeptídica seleccionada entre el grupo compuesto por:

a. SEC ID Nº 9;

b. SEC ID Nº 11;

c. SEC ID Nº 13;

d. SEC ID Nº 15;

e. SEC ID Nº 17;

f. SEC ID Nº 18;

g. SEC ID Nº 19;

h. SEC ID Nº 21;

i. SEC ID Nº 23;

j. SEC ID Nº 25;

k. SEC ID Nº 27;

l. SEC ID Nº 29;

m. SEC ID Nº 31;

n. SEC ID Nº 33;

o. SEC ID Nº 35;

p. SEC ID Nº 37;

q. SEC ID Nº 39;

r. SEC ID Nº 41;

s. SEC ID Nº 43; y

t. SEC ID Nº 44.

41. Un vector que comprende dicho ácido nucleico de la reivindicación 37.

42. El vector de la reivindicación 41, donde dicho vector es un vector de expresión.

43. Una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico de la reivindicación 37.

44. Un método para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 43 en condiciones que promueven la expresión de dicho polipéptido.

```
  1 MAPGWPRSLPQILVLGFGLVLMRAAAGEQAPGTSPCSSGSSWSADLDKCM 50
    ||  |  | | .:||||  | |:|. ||||||||.||| ||||||||||||
  1 MARGSLRRLLRLLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSSWSADLDKCM 50
              .         .         .         .         .
 51 DCASCPARPHSDFCLGCAAAPPAHFRLLWPILGGALSLVLVLALVSSFLV 100
    ||||| |||||||||||||||| |||||||||||||  || |.| |||
 51 DCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAPFRLLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLV 100
              .         .
101 WRRCRRREKFTTPIEETGGEGCPGVALIQ 129
    |||||||||||||||||||||| |||||
101 WRRCRRREKFTTPIEETGGEGCPAVALIQ 129
```

Fig. 1

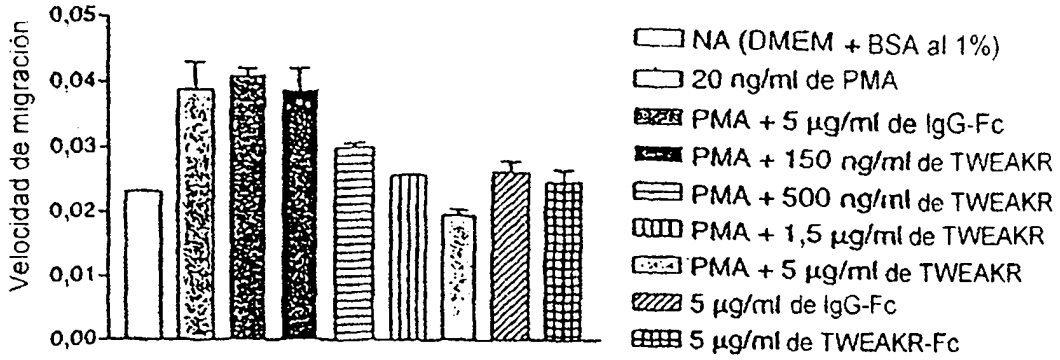

Velocidad de migración
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
NA (DMEM + BSA al 1%)
20 ng/ml de PMA
PMA + 5 µg/ml de IgG-Fc
PMA + 150 ng/ml de TWEAKR
PMA + 500 ng/ml de TWEAKR
PMA + 1,5 µg/ml de TWEAKR
PMA + 5 µg/ml de TWEAKR
5 µg/ml de IgG-Fc
5 µg/ml de TWEAKR-Fc

Fig. 2

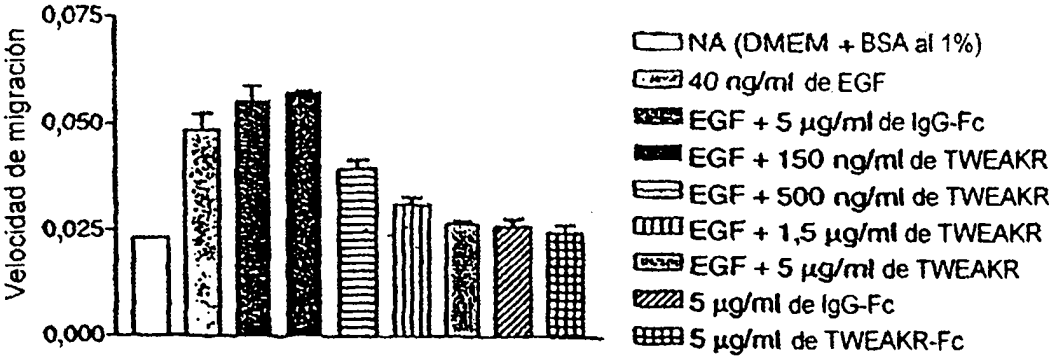

Velocidad de migración
0,075
0,050
0,025
0,000
NA (DMEM + BSA al 1%)
40 ng/ml de EGF
EGF + 5 µg/ml de IgG-Fc
EGF + 150 ng/ml de TWEAKR
EGF + 500 ng/ml de TWEAKR
EGF + 1,5 µg/ml de TWEAKR
EGF + 5 µg/ml de TWEAKR
5 µg/ml de IgG-Fc
5 µg/ml de TWEAKR-Fc

Fig. 3

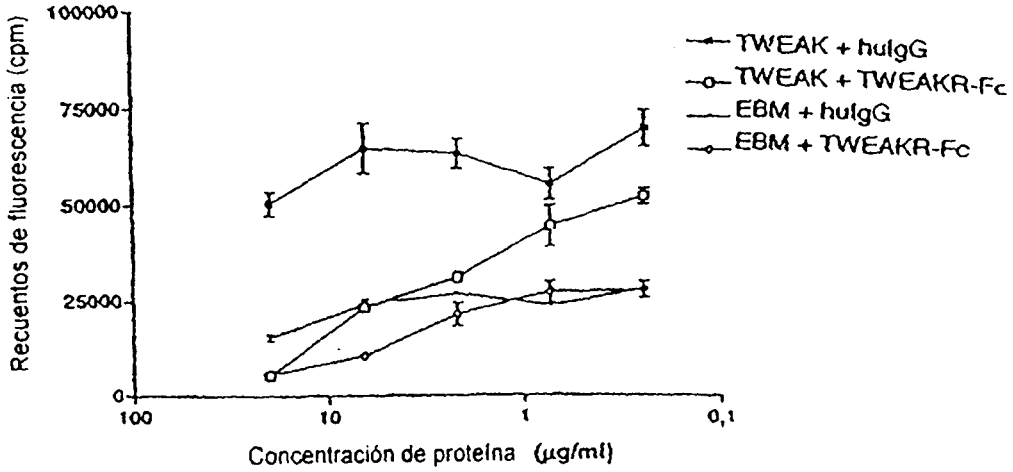

Recuentos de fluorescencia (cpm)
100000
75000
50000
25000
0
100
10
1
0,1
Concentración de proteína (µg/ml)
TWEAK + hulgG
TWEAK + TWEAKR-Fc
EBM + hulgG
EBM + TWEAKR-Fc

Fig. 4

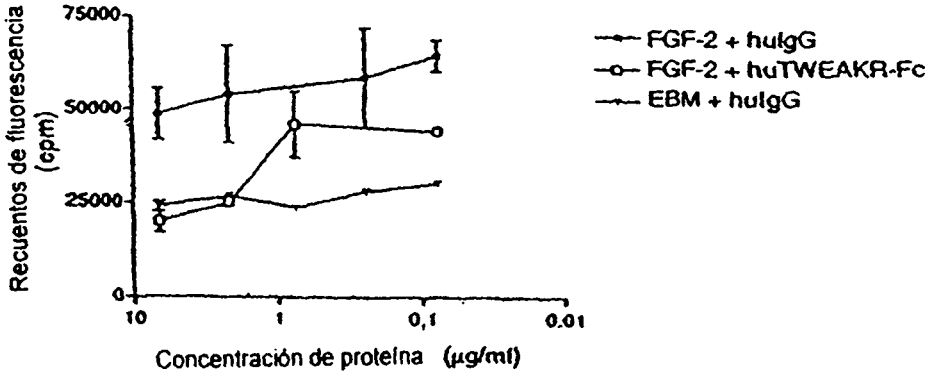

Recuentos de fluorescencia (cpm)
75000
50000
25000
0
10
1
0,1
0.01
Concentración de proteína (µg/ml)
FGF-2 + hulgG
FGF-2 + huTWEAKR-Fc
EBM + hulgG

Fig. 5

Fig. 6

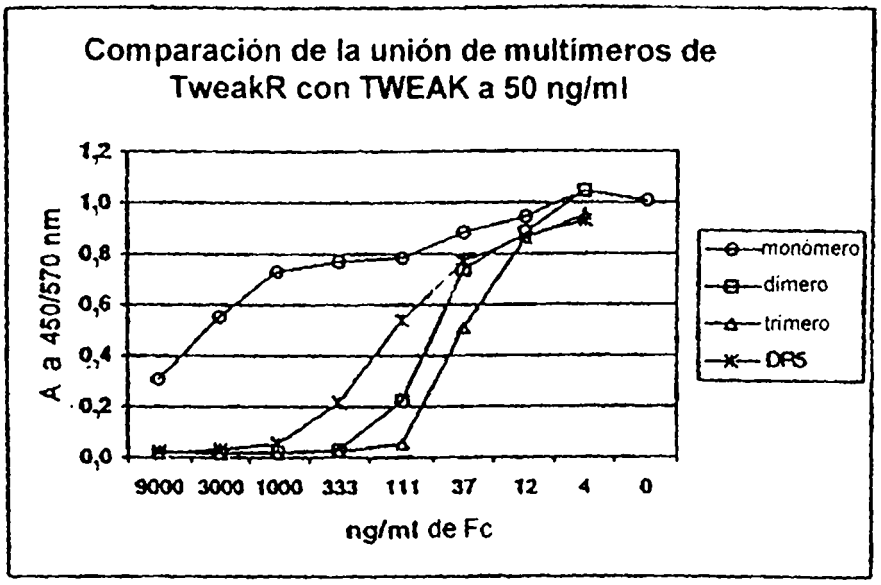

Comparación de la unión de multímeros de TweakR con TWEAK a 50 ng/ml
A a 450/570 nm
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
9000 3000 1000 333 111 37 12 4 0
ng/ml de Fc
monómero
dímero
trímero
DR5

Fig. 7

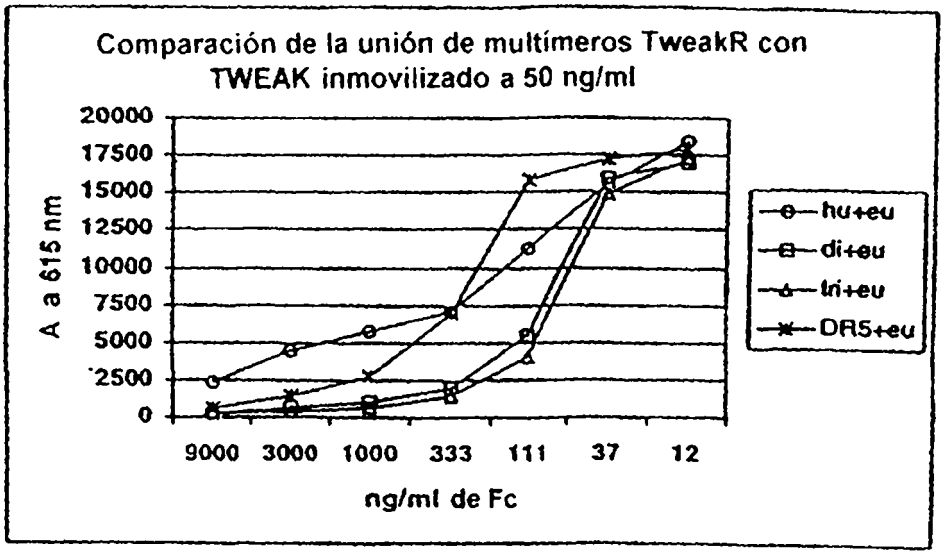
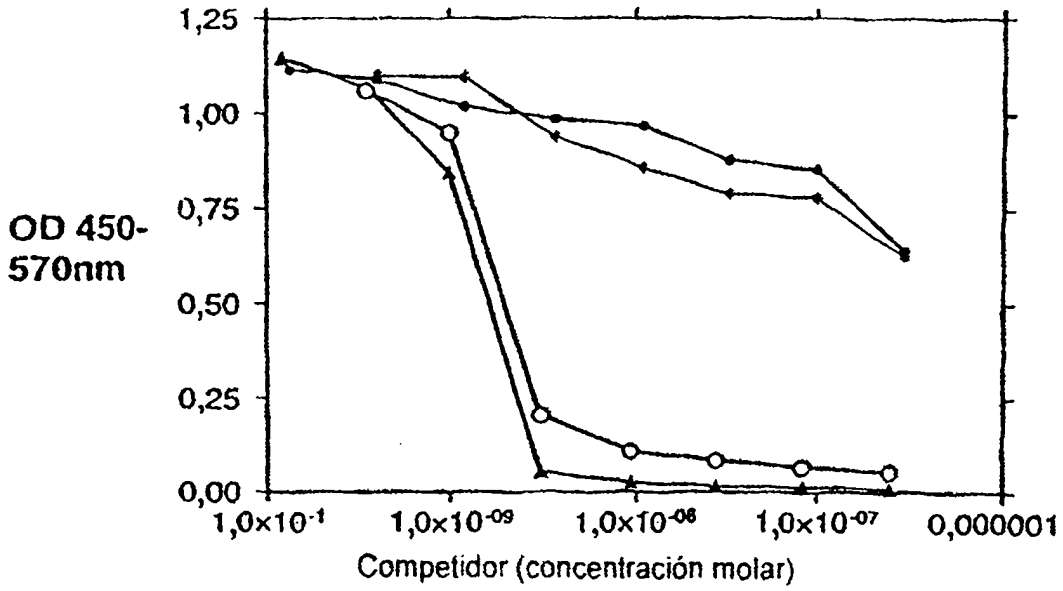

Comparación de la unión de multímeros TweakR con TWEAK inmovilizado a 50 ng/ml
A a 615 nm
20000
17500
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
9000
3000
1000
333
111
37
12
ng/ml de Fc
hu+eu
di+eu
tri+eu
DR5+eu

Fig. 8


OD 450-570nm
1,25
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
1,0x10-1
1,0x10-09
1,0x10-08
1,0x10-07
0,000001
Competidor (concentración molar)

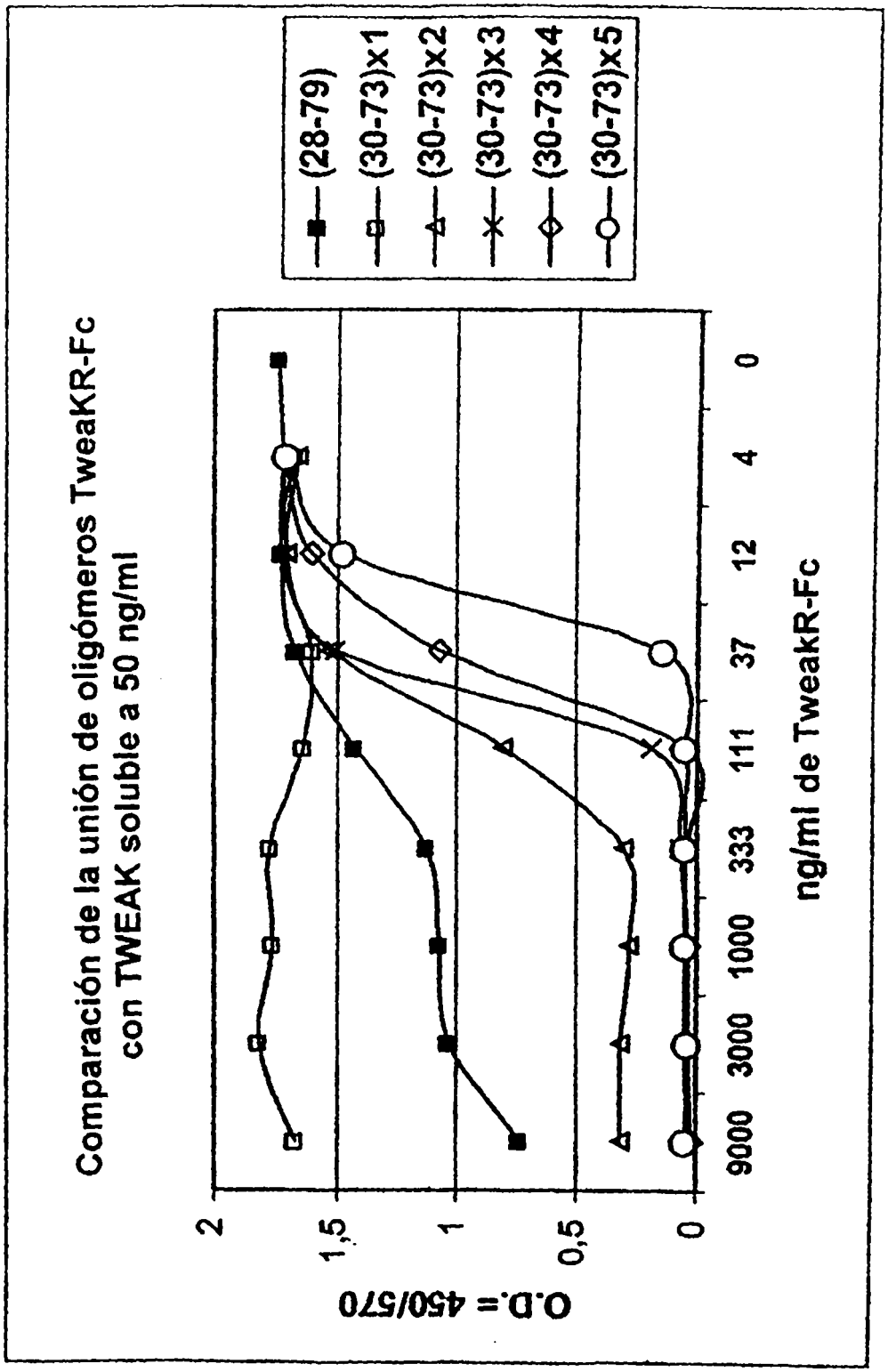

Comparación de la unión de oligómeros TweaKR-Fc
con TWEAK soluble a 50 ng/ml
(28-79)
(30-73)x1
(30-73)x2
(30-73)x3
(30-73)x4
(30-73)x5
O.D.= 450/570
2
1,5
1
0,5
0
9000
3000
1000
333
111
37
12
4
0
ng/ml de TweakR-Fc

FIGURA 9

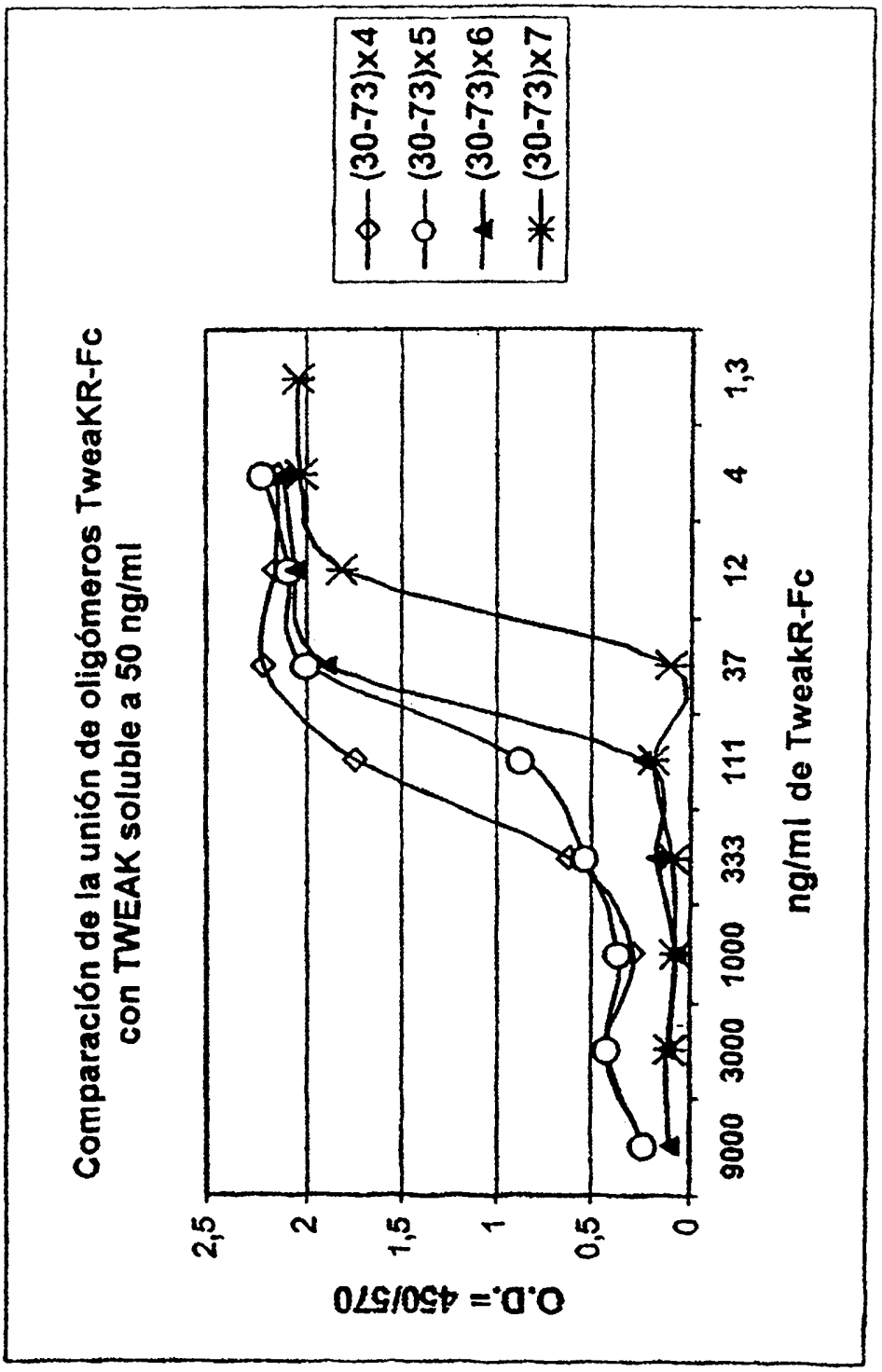

Comparación de la unión de oligómeros TweaKR-Fc
con TWEAK soluble a 50 ng/ml
(30-73)x4
(30-73)x5
(30-73)x6
(30-73)x7
O.D.= 450/570
2,5
2
1,5
1
0,5
0
9000
3000
1000
333
111
37
12
4
1,3
ng/ml de TweakR-Fc

FIGURA 10

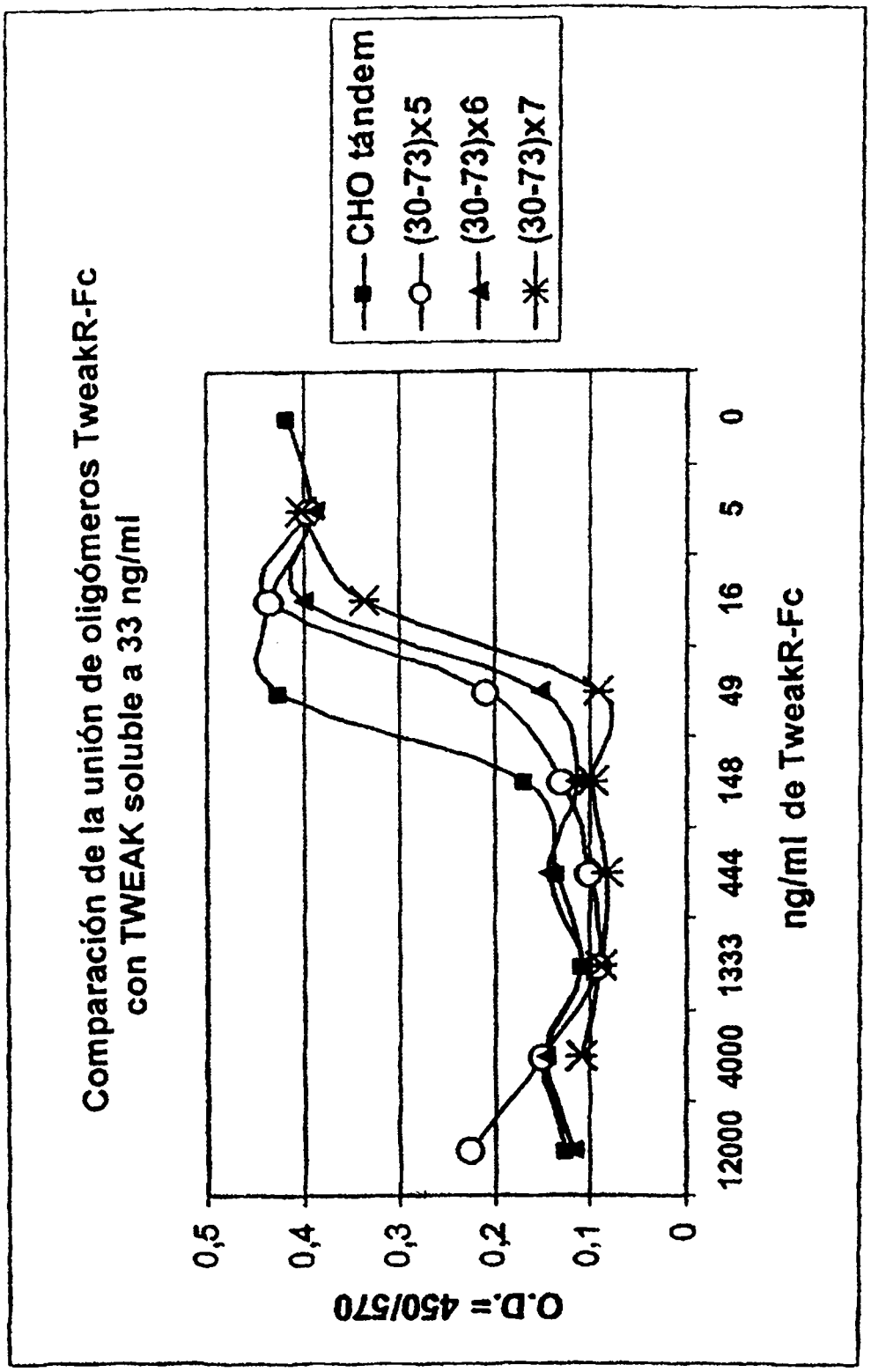

Comparación de la unión de oligómeros TweakR-Fc
con TWEAK soluble a 33 ng/ml
CHO tándem
(30-73)x5
(30-73)x6
(30-73)x7
O.D.= 450/570
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
12000 4000 1333 444 148 49 16 5 0
ng/ml de TweakR-Fc

FIGURA 11

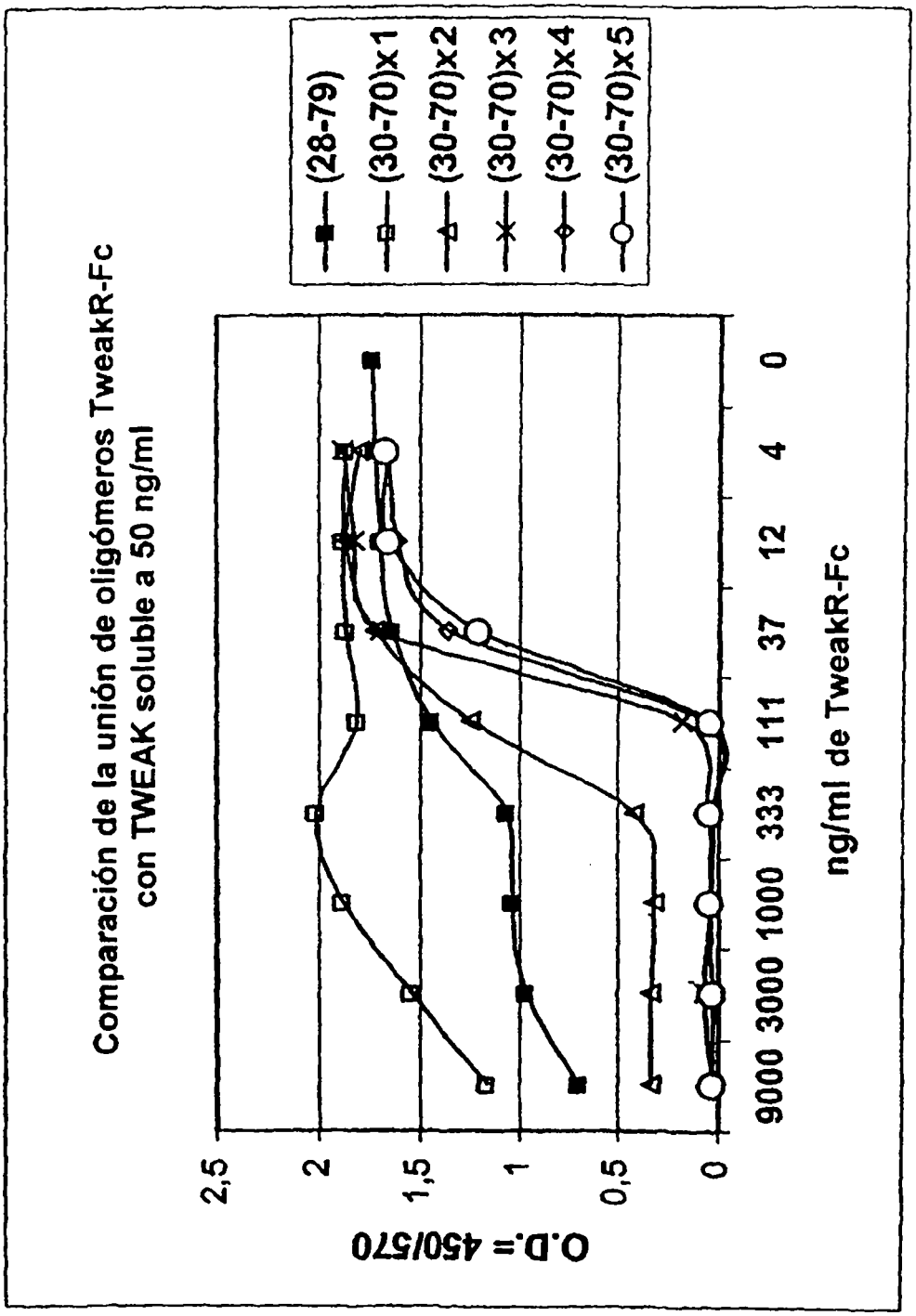

Comparación de la unión de oligómeros TweakR-Fc
con TWEAK soluble a 50 ng/ml
(28-79)
(30-70)x1
(30-70)x2
(30-70)x3
(30-70)x4
(30-70)x5
O.D.= 450/570
2,5
2
1,5
1
0,5
0
9000 3000 1000 333 111 37 12 4 0
ng/ml de TweakR-Fc

FIGURA 12

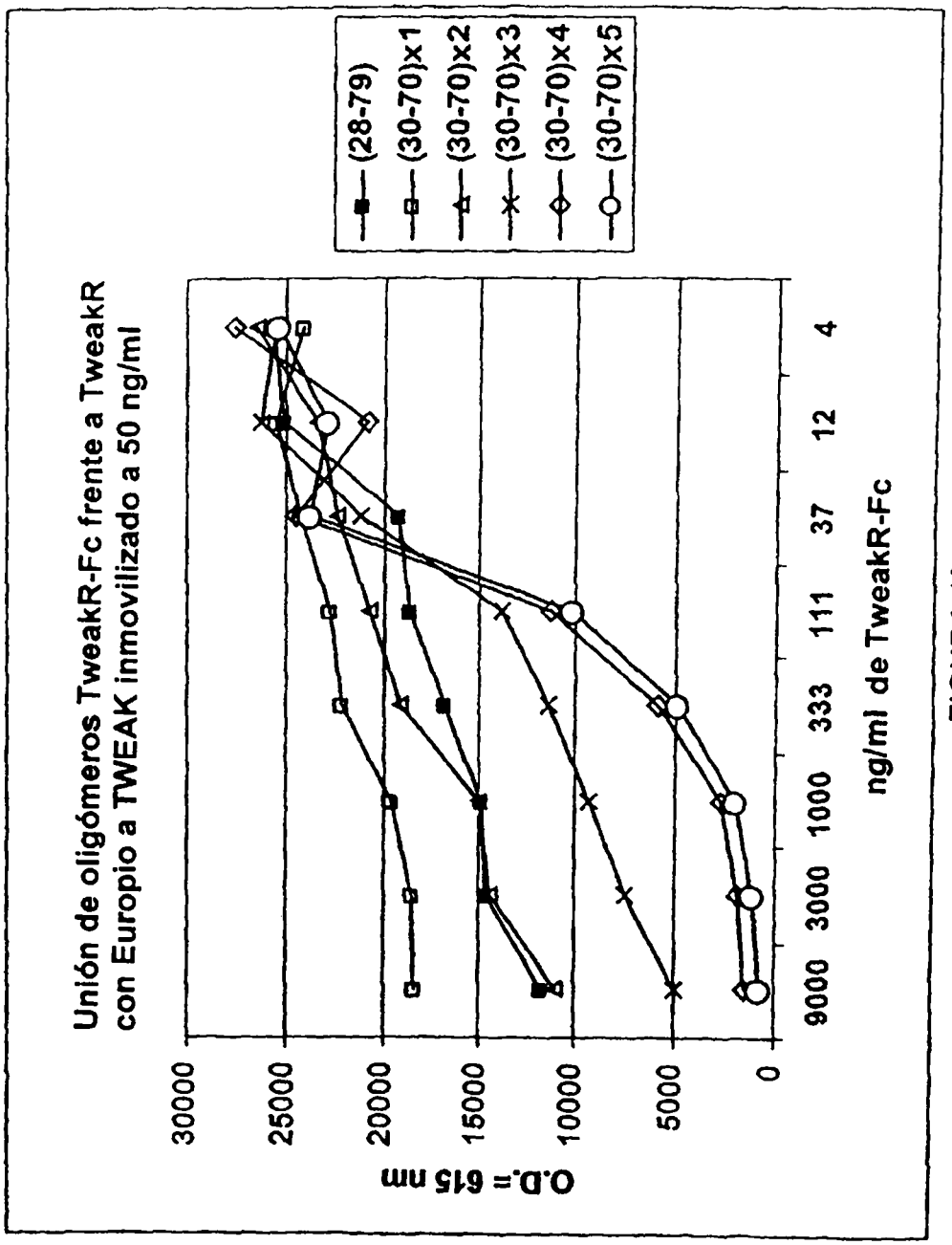

Unión de oligómeros TweakR-Fc frente a TweakR con Europio a TWEAK inmovilizado a 50 ng/ml
O.D.= 615 nm
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
9000 3000 1000 333 111 37 12 4
ng/ml de TweakR-Fc
(28-79)
(30-70)x1
(30-70)x2
(30-70)x3
(30-70)x4
(30-70)x5

FIGURA 13

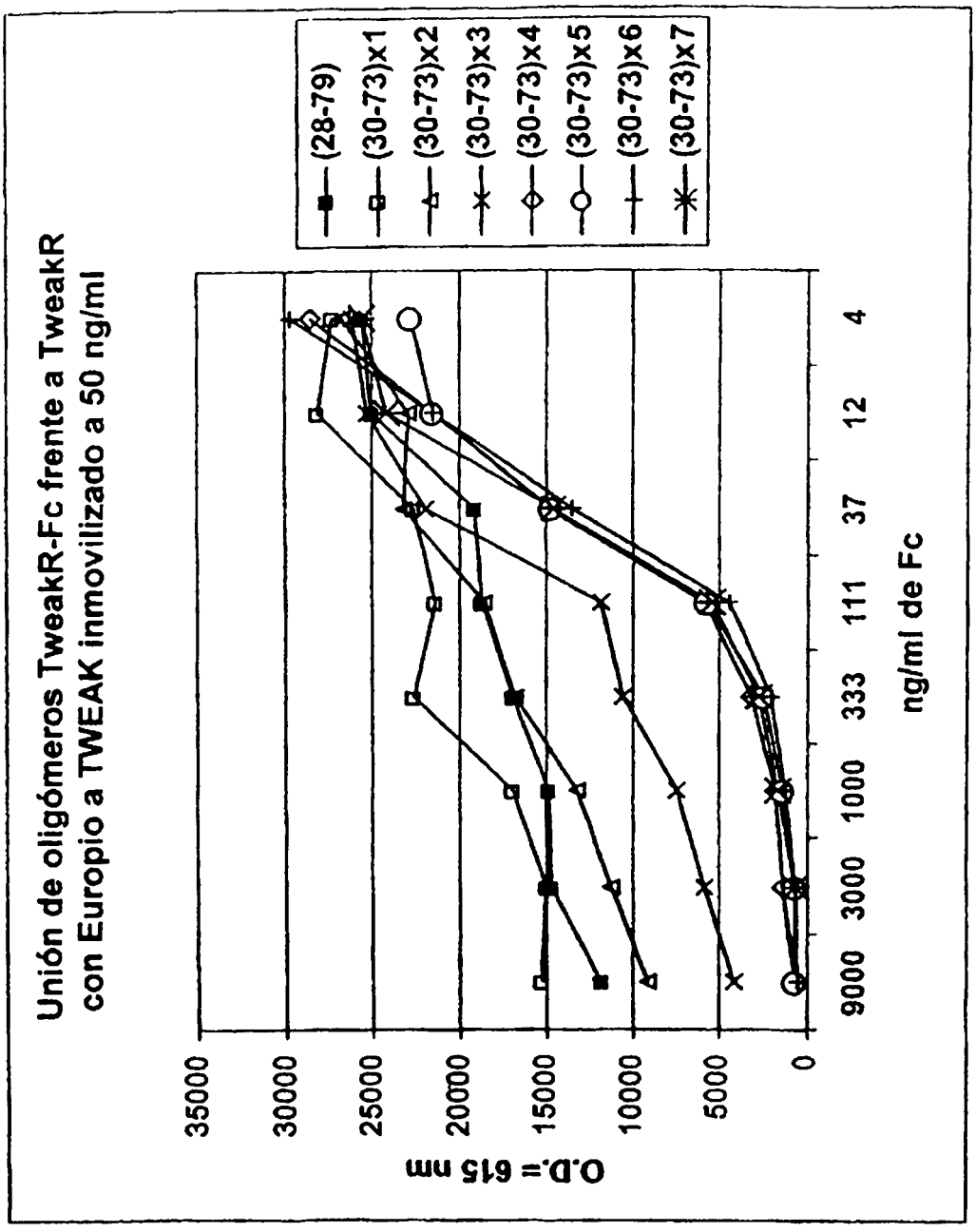

Unión de oligómeros TweakR-Fc frente a TweakR con Europio a TWEAK inmovilizado a 50 ng/ml
O.D.= 615 nm
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
9000 3000 1000 333 111 37 12 4
ng/ml de Fc
(28-79)
(30-73)x1
(30-73)x2
(30-73)x3
(30-73)x4
(30-73)x5
(30-73)x6
(30-73)x7

FIGURA 14

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.
Wiley, Steven, R.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS CON FRAGMENTOS SOLUBLES MULTIMÉRICOS Y OLIGOMÉRICOS DEL RECEPTOR TWEAK

<130> EP37768HV132wk

<140> -- sin asignar --
<141> -- sin asignar --

<150> US 60/490.036
<151> 24-07-2003

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 898
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> LZ-TWEAK

<220>
<221> CDS
<222> (52)..(873)

<400> 1

```
tctcgagggc cacgcgttta aacgtcgagg tacctatccc gggccgccac c atg gct       57
                                                          Met Ala
                                                          1

aca ggc tcc cgg acg tcc ctg ctc ctg gct ttt ggc ctg ctc tgc ctg       105
Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys Leu
        5                   10                  15

ccc tgg ctt caa gag ggc agt gca act agt tct gac cgt atg aaa cag       153
Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln
    20                  25                  30

ata gag gat aag atc gaa gag atc cta agt aag att tat cat ata gag       201
Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu
35                  40                  45                  50

aat gaa atc gcc cgt atc aaa aag ctg att ggc gag cgg act aga tct       249
Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr Arg Ser
                55                  60                  65

agt ttg ggg agc cgg gca tcg ctg tcc gcc cag gag cct gcc cag gag       297
Ser Leu Gly Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu
            70                  75                  80

gag ctg gtg gca gag gag gac cag gac ccg tcg gaa ctg aat ccc cag       345
Glu Leu Val Ala Glu Glu Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln
        85                  90                  95
```

```
aca gaa gaa agc cag gat cct gcg cct ttc ctg aac cga cta gtt cgg      393
Thr Glu Glu Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg
    100                 105                 110

cct cgc aga agt gca cct aaa ggc cgg aaa aca cgg gct cga aga gcg      441
Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala
115                 120                 125                 130

atc gca gcc cat tat gaa gtt cat cca cga cct gga cag gac gga gcg      489
Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala
                135                 140                 145

cag gca ggt gtg gac ggg aca gtg agt ggc tgg gag gaa gcc aga atc      537
Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile
            150                 155                 160

aac agc tcc agc cct ctg cgc tac aac cgc cag atc ggg gag ttt ata      585
Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile
        165                 170                 175

gtc acc cgg gct ggg ctc tac tac ctg tac tgt cag gtg cac ttt gat      633
Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp
    180                 185                 190

gag ggg aag gct gtc tac ctg aag ctg gac ttg ctg gtg gat ggt gtg      681
Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val
195                 200                 205                 210

ctg gcc ctg cgc tgc ctg gag gaa ttc tca gcc act gcg gcc agt tcc      729
Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser
                215                 220                 225

ctc ggg ccc cag ctc cgc ctc tgc cag gtg tct ggg ctg ttg gcc ctg      777
Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu
            230                 235                 240

cgg cca ggg tcc tcc ctg cgg atc cgc acc ctc ccc tgg gcc cat ctc      825
Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu
        245                 250                 255

aag gct gcc ccc ttc ctc acc tac ttc gga ctc ttc cag gtt cac tga      873
Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
    260                 265                 270

gcggccgcgg atctgtttaa actag                                         898
```

<210> 2

<211> 273

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 2

```
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1               5                   10                  15
```

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Thr Ser Ser Asp Arg Met
20 25 30

Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His
35 40 45

Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Thr
50 55 60

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

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

Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu
100 105 110

Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg
115 120 125

Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp
130 135 140

Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala
145 150 155 160

Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu
165 170 175

Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His
180 185 190

Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp
195 200 205

Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala
210 215 220

Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu
225 230 235 240

Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala
245 250 255

His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val
260 265 270

His

<210> 3

<211> 868

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(442)

<400> 3

```
gcttgaattc aataactata acggtcctaa ggtagcgaag aggacgtgca ct atg gct      58
                                                          Met Ala
                                                           1

cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg ctc tgg      106
Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly Leu Trp
        5                  10                  15

ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc acc gcc      154
Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala
    20                  25                  30

ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg      202
Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met
35                  40                  45                  50

gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc      250
Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly
                55                  60                  65

tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg ccc atc ctt      298
Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro Ile Leu
            70                  75                  80

ggg ggc gct ctg agc ctg acc ttc gtg ctg ggg ctg ctt tct ggc ttt      346
Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser Gly Phe
        85                  90                  95

ttg gtc tgg aga cga tgc cgc agg aga gag aag ttc acc acc ccc ata      394
Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr Pro Ile
    100                 105                 110

gag gag acc ggc gga gag ggc tgc cca gct gtg gcg ctg atc cag tga      442
Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile Gln
115                 120                 125

caatgtgccc cctgccagcc ggggctcgcc cactcatcat tcattcatcc attctagagc    502

cagtctctgc ctcccagacg cggcgggagc caagctcctc caaccacaag gggggtgggg    562

ggcggtgaat cacctctgag gcctgggccc agggttcagg ggaaccttcc aaggtgtctg    622

gttgccctgc ctctggctcc agaacagaaa gggagcctca cgctggctca cacaaaacag    682

ctgacactga ctaaggaact gcagcatttg cacaggggag gggggtgccc tccttcctag    742

aggccctggg ggccaggctg acttgggggg cagacttgac actaggcccc actcactcag    802

atgtcctgaa attccaccac gggggtcacc ctgggggggtt agggacctat ttttaacact    862

agaggg                                                               868
```

<210> 4

<211> 129

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                  10                  15

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

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Pro
65                  70                  75                  80

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe Val Leu Gly Leu Leu Ser
                85                  90                  95

Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
            100                 105                 110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Ala Val Ala Leu Ile
        115                 120                 125

Gln
```

<210> 5
<211> 129
<212> PRT
<213> *Mus sp.*

<400> 5

```
Met Ala Pro Gly Trp Pro Arg Ser Leu Pro Gln Ile Leu Val Leu Gly
1               5                  10                  15
```

Phe Gly Leu Val Leu Met Arg Ala Ala Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
20 25 30

Thr Ser Pro Cys Ser Ser Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Pro Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
50 55 60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala His Phe Arg Leu Leu Trp Pro
65 70 75 80

Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Val Leu Val Leu Ala Leu Val Ser
85 90 95

Ser Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg Arg Arg Glu Lys Phe Thr Thr
100 105 110

Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Glu Gly Cys Pro Gly Val Ala Leu Ile
115 120 125

Gln

<210> 6
<211> 932
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKR:Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(930)

<400> 6

atg gct cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg 48
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1 5 10 15

ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc 96
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
20 25 30

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag 144
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
35 40 45

```
tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc      192
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg aga      240
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg
65                  70                  75                  80

tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc      288
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
                85                  90                  95

gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc      336
Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            100                 105                 110

ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg      384
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        115                 120                 125

agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg      432
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    130                 135                 140

gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc      480
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
145                 150                 155                 160

acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg      528
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                165                 170                 175

aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc      576
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            180                 185                 190

ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca      624
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        195                 200                 205

cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag      672
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    210                 215                 220

gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc      720
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
225                 230                 235                 240

gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg      768
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                245                 250                 255

cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc      816
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
            260                 265                 270

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc      864
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        275                 280                 285

gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc      912
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    290                 295                 300

ctg tct ccg ggt aaa tga ac                                          932
Leu Ser Pro Gly Lys
305
```

<210> 7

<211> 309

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 7

```
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                  10                  15

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

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg
65                  70                  75                  80

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
                85                  90                  95

Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            100                 105                 110

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        115                 120                 125

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    130                 135                 140

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
145                 150                 155                 160

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                165                 170                 175
```

```
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            180                 185                 190

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    210                 215                 220

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
225                 230                 235                 240

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                245                 250                 255

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
            260                 265                 270

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        275                 280                 285

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
    290                 295                 300

Leu Ser Pro Gly Lys
305
```

<210> 8
<211> 1089
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKRDr5-Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1086)

<400> 8

```
atg gct cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg        48
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc        96
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
            20                  25                  30

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag       144
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45
```

```
tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc      192
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg gag      240
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65                  70                  75                  80

caa gcg cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc act cac tgg aat      288
Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Thr His Trp Asn
                85                  90                  95

gac ctc ctt ttc tgc ttg cgc tgc acc agg tgt gat tca ggt gaa gtg      336
Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val
            100                 105                 110

gag cta agt ccc tgc acc acg acc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc      384
Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
        115                 120                 125

cgg ctg ctt tgg aga tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc      432
Arg Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    130                 135                 140

cca gca cct gaa gcc gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca      480
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
145                 150                 155                 160

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc      528
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                165                 170                 175

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg      576
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            180                 185                 190

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag      624
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        195                 200                 205

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg      672
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    210                 215                 220

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac      720
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
225                 230                 235                 240

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg      768
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
                245                 250                 255

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag      816
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
            260                 265                 270

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat      864
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
        275                 280                 285
```

```
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac      912
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    290                 295                 300

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc      960
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
305                 310                 315                 320

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac     1008
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
                325                 330                 335

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg     1056
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
            340                 345                 350

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga                        1089
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355                 360
```

<210> 9

<211> 362

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 9

```
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

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

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65                  70                  75                  80

Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Thr His Trp Asn
                85                  90                  95

Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val
            100                 105                 110

Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
        115                 120                 125
```

Arg Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
130 135 140

Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
145 150 155 160

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
165 170 175

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
180 185 190

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
195 200 205

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
210 215 220

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
225 230 235 240

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
245 250 255

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
260 265 270

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
275 280 285

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
305 310 315 320

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
325 330 335

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
340 345 350

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
355 360

<210> 10

<211> 1086

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Di TWEAKR-Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1083)

<400> 10

```
atg gct cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg        48
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc        96
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
            20                  25                  30

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag       144
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc       192
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg gag       240
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65                  70                  75                  80

caa gcg cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg       288
Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala
                85                  90                  95

gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac       336
Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
            100                 105                 110

agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg       384
Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg
        115                 120                 125

ctg ctt tgg aga tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca       432
Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
    130                 135                 140

gca cct gaa gcc gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa       480
Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
145                 150                 155                 160

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg       528
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
                165                 170                 175

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac       576
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
            180                 185                 190
```

```
gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag      624
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
        195                 200                 205

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac      672
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
    210                 215                 220

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa      720
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
225                 230                 235                 240

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag      768
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
                245                 250                 255

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg      816
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
            260                 265                 270

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc      864
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
        275                 280                 285

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac      912
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
    290                 295                 300

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc      960
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
305                 310                 315                 320

tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc     1008
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                325                 330                 335

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag     1056
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
            340                 345                 350

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga                            1086
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355                 360
```

<210> 11

<211> 361

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 11

```
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
            20                  25                  30
```

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
35 40 45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
50 55 60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65 70 75 80

Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala
85 90 95

Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
100 105 110

Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg
115 120 125

Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
130 135 140

Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
145 150 155 160

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
165 170 175

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
180 185 190

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
195 200 205

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
210 215 220

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
225 230 235 240

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
245 250 255

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
260 265 270

```
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
        275                 280                 285

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

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
305                 310                 315                 320

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
                325                 330                 335

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
            340                 345                 350

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        355                 360
```

<210> 12

<211> 1242

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Tri TWEAKR-Fc

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1239)

<400> 12

```
atg gct cgg ggc tcg ctg cgc cgg ttg ctg cgg ctc ctc gtg ctg ggg      48
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

ctc tgg ctg gcg ttg ctg cgc tcc gtg gcc ggg gag caa gcg cca ggc      96
Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala Pro Gly
            20                  25                  30

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag     144
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc     192
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg gag     240
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65                  70                  75                  80

caa gcg cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg     288
Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala
                85                  90                  95
```

```
gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac      336
Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
            100                 105                 110

agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc ccc ttc cgg      384
Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg
        115                 120                 125

ctg ctt tgg gag caa gcg cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc      432
Leu Leu Trp Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser
    130                 135                 140

tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg      480
Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg
145                 150                 155                 160

gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct      528
Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro
                165                 170                 175

gcc ccc ttc cgg ctg ctt tgg aga tct tgt gac aaa act cac aca tgc      576
Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
            180                 185                 190

cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggc gcg ccg tca gtc ttc ctc      624
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
        195                 200                 205

ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag      672
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
    210                 215                 220

gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag      720
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
225                 230                 235                 240

ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag      768
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
                245                 250                 255

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc      816
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
            260                 265                 270

acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag      864
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
        275                 280                 285

gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa      912
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
    290                 295                 300

gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc      960
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
305                 310                 315                 320

cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa     1008
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                325                 330                 335
```

```
ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag     1056
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
            340                 345                 350

ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc     1104
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
        355                 360                 365

tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag     1152
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
    370                 375                 380

cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac     1200
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
385                 390                 395                 400

cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga             1242
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                405                 410
```

<210> 13

<211> 413

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 13

```
Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu Gly
1               5                   10                  15

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

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
        35                  40                  45

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
    50                  55                  60

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Glu
65                  70                  75                  80

Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala
                85                  90                  95

Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
            100                 105                 110

Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe Arg
        115                 120                 125
```

```
Leu Leu Trp Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser
    130                 135                 140

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

Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro
                165                 170                 175

Ala Pro Phe Arg Leu Leu Trp Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
            180                 185                 190

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
        195                 200                 205

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
    210                 215                 220

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
225                 230                 235                 240

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
                245                 250                 255

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
            260                 265                 270

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
        275                 280                 285

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
    290                 295                 300

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
305                 310                 315                 320

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
                325                 330                 335

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
            340                 345                 350

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
        355                 360                 365
```

```
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
    370                 375                 380

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
385                 390                 395                 400

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                405                 410
```

<210> 14

<211> 828

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> HuTWEAKr 29-70: Gly5: Fc

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(825)

<400> 14

```
atg caa gct cca ggt act gca cca tgt tct cgt ggt tct tct tgg tct        48
Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1               5                   10                  15

gct gat ctt gat aaa tgt atg gat tgt gct tct tgt cgt gct cgt cca        96
Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
            20                  25                  30

cat tct gat ttt tgt ctg ggt tgt gct gct gct ggt ggt ggt ggt ggt       144
His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45

gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg       192
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
    50                  55                  60

gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg       240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
65                  70                  75                  80

atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac       288
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
                85                  90                  95

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg       336
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
            100                 105                 110

cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac       384
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
        115                 120                 125

cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc       432
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
    130                 135                 140
```

```
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc      480
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
145                 150                 155                 160

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg      528
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
                165                 170                 175

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc      576
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
            180                 185                 190

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag      624
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
        195                 200                 205

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc      672
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
    210                 215                 220

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg      720
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
225                 230                 235                 240

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg      768
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
                245                 250                 255

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct      816
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
            260                 265                 270

ccg ggt aaa taa                                                     828
Pro Gly Lys
        275
```

<210> 15

<211> 275

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 15

```
Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1               5                   10                  15

Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
            20                  25                  30

His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
    50                  55                  60
```

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
65 70 75 80

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
100 105 110

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
115 120 125

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
130 135 140

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
145 150 155 160

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
180 185 190

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
195 200 205

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
210 215 220

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
225 230 235 240

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
245 250 255

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
260 265 270

Pro Gly Lys
275

<210> 16

<211> 879

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> HuTWEAKr 29-70: 1KPEG: Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(876)

<400> 16

```
atg caa gct cca ggt act gca cca tgt tct cgt ggt tct tct tgg tct        48
Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1               5                   10                  15

gct gat ctt gat aaa tgt atg gat tgt gct tct tgt cgt gct cgt cca        96
Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
            20                  25                  30

cat tct gat ttt tgt ctg ggt tgt gct gct gct ggt tcc gga tct gct       144
His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ser Ala
        35                  40                  45

acc ggt ggt tcc ggt tct acc gct tct tct gga tcc ggt tcc gct acc       192
Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr
    50                  55                  60

ggt gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg       240
Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
65                  70                  75                  80

ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc       288
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                85                  90                  95

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc       336
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            100                 105                 110

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag       384
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        115                 120                 125

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg       432
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    130                 135                 140

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat       480
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
145                 150                 155                 160

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc       528
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
                165                 170                 175

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag       576
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            180                 185                 190

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc       624
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        195                 200                 205
```

```
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg      672
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    210                 215                 220

gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      720
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
225                 230                 235                 240

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      768
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                245                 250                 255

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      816
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            260                 265                 270

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      864
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        275                 280                 285

tct ccg ggt aaa taa                                                 879
Ser Pro Gly Lys
    290
```

<210> 17

<211> 292

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 17

```
Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1               5                   10                  15

Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
            20                  25                  30

His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ser Ala
        35                  40                  45

Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr
    50                  55                  60

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
65                  70                  75                  80

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                85                  90                  95

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            100                 105                 110
```

```
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        115                 120                 125

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
145                 150                 155                 160

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
                165                 170                 175

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            180                 185                 190

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        195                 200                 205

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    210                 215                 220

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
225                 230                 235                 240

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                245                 250                 255

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            260                 265                 270

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        275                 280                 285

Ser Pro Gly Lys
    290
```

<210> 18

<211> 339

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR: 1KPEG: TWEAKR: Gly5: Fc

<400> 18

```
Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1               5                   10                  15
```

```
Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
            20                  25                  30

His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ser Gly Ser Ala
        35                  40                  45

Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr
    50                  55                  60

His Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
65                  70                  75                  80

Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
                85                  90                  95

His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly
            100                 105                 110

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
    130                 135                 140

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
145                 150                 155                 160

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                165                 170                 175

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
        195                 200                 205

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
    210                 215                 220

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                245                 250                 255
```

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
260 265 270

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
275 280 285

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
290 295 300

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
305 310 315 320

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
325 330 335

Pro Gly Lys

<210> 19

<211> 322

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR: Gly5: TWEAKR: Gly5: Fc

<400>19

Met Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser
1 5 10 15

Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro
20 25 30

His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala
50 55 60

Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
65 70 75 80

Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Asp
85 90 95

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
100 105 110

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
115 120 125

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
130 135 140

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
145 150 155 160

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
165 170 175

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
180 185 190

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
195 200 205

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

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
225 230 235 240

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
245 250 255

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
260 265 270

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
275 280 285

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
290 295 300

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
305 310 315 320

Gly Lys

<210> 20

<211> 867

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKR 40mono-3

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(867)

<400> 20

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gac aaa act     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr
    50                  55                  60

cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca     240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
65                  70                  75                  80

gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg     288
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                85                  90                  95

acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct     336
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            100                 105                 110

gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc     384
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        115                 120                 125

aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc     432
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    130                 135                 140

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac     480
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
145                 150                 155                 160

aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc     528
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                165                 170                 175

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg     576
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            180                 185                 190

ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc     624
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        195                 200                 205
```

```
ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc      672
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    210                 215                 220

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac      720
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
225                 230                 235                 240

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc      768
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                245                 250                 255

agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct      816
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            260                 265                 270

ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa      864
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        275                 280                 285

taa                                                                  867
```

<210> 21

<211> 288

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 21

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr
    50                  55                  60

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
65                  70                  75                  80

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                85                  90                  95

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            100                 105                 110
```

```
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        115                 120                 125

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
145                 150                 155                 160

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                165                 170                 175

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
            180                 185                 190

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
        195                 200                 205

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    210                 215                 220

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
225                 230                 235                 240

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                245                 250                 255

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            260                 265                 270

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        275                 280                 285
```

<210> 22

<211> 990

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 40dimer-1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<400> 22

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15
```

```
ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc        96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg       144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc       192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag       240
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc       288
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

ctg ggc tgc gct gca gca gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca       336
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa       384
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125

ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg       432
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    130                 135                 140

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac       480
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145                 150                 155                 160

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag       528
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
                165                 170                 175

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac       576
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            180                 185                 190

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa       624
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        195                 200                 205

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag       672
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    210                 215                 220

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg       720
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225                 230                 235                 240

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc       768
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                245                 250                 255
```

```
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac      816
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            260                 265                 270

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc      864
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        275                 280                 285

tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc      912
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    290                 295                 300

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag      960
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305                 310                 315                 320

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                             990
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 23

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        115                 120                 125
```

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 24

<211> 1113

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 40trimer-5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1113)

<400> 24

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag     240
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc     288
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc     336
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
            100                 105                 110

agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc     384
Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
        115                 120                 125

agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gac     432
Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp
    130                 135                 140

aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga     480
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
145                 150                 155                 160

ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc     528
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                165                 170                 175

tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa     576
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            180                 185                 190

gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat     624
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        195                 200                 205

aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt     672
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    210                 215                 220
```

```
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag      720
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
225                 230                 235                 240

gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag      768
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                245                 250                 255

aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac      816
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            260                 265                 270

acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg      864
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        275                 280                 285

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg      912
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    290                 295                 300

gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg      960
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305                 310                 315                 320

ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac     1008
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                325                 330                 335

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat     1056
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            340                 345                 350

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg     1104
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        355                 360                 365

ggt aaa taa                                                        1113
Gly Lys
    370
```

<210> 25

<211> 370

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 25

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45
```

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
50 55 60

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65 70 75 80

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
85 90 95

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
100 105 110

Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
115 120 125

Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp
130 135 140

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
165 170 175

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
180 185 190

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
195 200 205

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
210 215 220

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
225 230 235 240

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
260 265 270

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
275 280 285

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
290                 295                 300

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
305                 310                 315                 320

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                325                 330                 335

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            340                 345                 350

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        355                 360                 365

Gly Lys
    370
```

<210> 26

<211> 1236

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 40quad-2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1236)

<400> 26

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag     240
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc     288
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95
```

```
ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc      336
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
            100                 105                 110

agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc      384
Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
        115                 120                 125

agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca      432
Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala
    130                 135                 140

cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg      480
Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu
145                 150                 155                 160

gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac      528
Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp
                165                 170                 175

ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gac aaa act cac aca tgt cca ccg      576
Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            180                 185                 190

tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc      624
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        195                 200                 205

cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca      672
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    210                 215                 220

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac      720
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
225                 230                 235                 240

tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg      768
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                245                 250                 255

gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc      816
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
            260                 265                 270

ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc      864
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        275                 280                 285

aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa      912
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    290                 295                 300

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat      960
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
305                 310                 315                 320

gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc     1008
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                325                 330                 335
```

```
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag     1056
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            340                 345                 350

aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc     1104
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        355                 360                 365

ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg     1152
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
    370                 375                 380

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac     1200
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
385                 390                 395                 400

acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                     1236
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                405                 410
```

<210> 27

<211> 411

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
            100                 105                 110

Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
        115                 120                 125
```

```
Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala
    130                 135                 140

Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu
145                 150                 155                 160

Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp
                165                 170                 175

Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            180                 185                 190

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        195                 200                 205

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
    210                 215                 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
225                 230                 235                 240

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
                245                 250                 255

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
            260                 265                 270

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        275                 280                 285

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
    290                 295                 300

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
305                 310                 315                 320

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                325                 330                 335

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            340                 345                 350

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        355                 360                 365
```

```
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
    370                 375                 380

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
385                 390                 395                 400

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                405                 410
```

<210> 28

<211> 1359

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 40quint-1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1359)

<400> 28

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag     240
Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc     288
Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc     336
Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
            100                 105                 110

agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc     384
Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
        115                 120                 125

agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca     432
Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala
    130                 135                 140
```

```
cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg      480
Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu
145                 150                 155                 160

gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac      528
Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp
                165                 170                 175

ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc      576
Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
            180                 185                 190

cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg      624
Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
        195                 200                 205

tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca      672
Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
    210                 215                 220

gca gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg      720
Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240

ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc      768
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc      816
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag      864
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
        275                 280                 285

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg      912
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
    290                 295                 300

tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat      960
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                 310                 315                 320

ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc     1008
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
                325                 330                 335

atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag     1056
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
            340                 345                 350

gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc     1104
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
        355                 360                 365

agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg     1152
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380
```

```
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct      1200
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc      1248
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg      1296
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg      1344
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

tct ccg ggt aaa taa                                                 1359
Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 29

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 29

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys
65                  70                  75                  80

Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys
                85                  90                  95

Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly
            100                 105                 110

Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys
        115                 120                 125
```

Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala
130 135 140

Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu
145 150 155 160

Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp
165 170 175

Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
180 185 190

Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
195 200 205

Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
210 215 220

Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

```
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
    370                 375                 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385                 390                 395                 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
                405                 410                 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
            420                 425                 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 30

<211> 876

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 43mono-F4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(876)

<400> 30

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg     240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
65                  70                  75                  80

gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg     288
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                85                  90                  95
```

```
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac      336
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            100                 105                 110

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg      384
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        115                 120                 125

cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac      432
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    130                 135                 140

cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc      480
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
145                 150                 155                 160

aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc      528
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                165                 170                 175

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg      576
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            180                 185                 190

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc      624
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        195                 200                 205

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag      672
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    210                 215                 220

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc      720
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
225                 230                 235                 240

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg      768
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                245                 250                 255

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg      816
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            260                 265                 270

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct      864
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        275                 280                 285

ccg ggt aaa taa                                                     876
Pro Gly Lys
    290
```

<210> 31

<211> 291

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 31

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
65                  70                  75                  80

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                85                  90                  95

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            100                 105                 110

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        115                 120                 125

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    130                 135                 140

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
145                 150                 155                 160

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                165                 170                 175

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            180                 185                 190

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        195                 200                 205

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    210                 215                 220

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                245                 250                 255

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            260                 265                 270

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        275                 280                 285

Pro Gly Lys
    290
```

<210> 32

<211> 1008

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 43dimer-F2

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1008)

<400> 32

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gac aaa act cac     336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His
            100                 105                 110

aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt     384
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
```

```
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      432
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
    130                 135                 140

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag      480
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
145                 150                 155                 160

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag      528
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
                165                 170                 175

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc      576
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
            180                 185                 190

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag      624
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
        195                 200                 205

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      672
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
    210                 215                 220

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      720
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
225                 230                 235                 240

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      768
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
                245                 250                 255

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      816
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
            260                 265                 270

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc      864
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
        275                 280                 285

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg      912
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
    290                 295                 300

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg      960
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
305                 310                 315                 320

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa     1008
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330                 335
```

<210> 33

<211> 335

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 33

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His
            100                 105                 110

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
    130                 135                 140

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
145                 150                 155                 160

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
                165                 170                 175

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
            180                 185                 190

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
        195                 200                 205

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
    210                 215                 220

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
                245                 250                 255

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
            260                 265                 270

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

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
305                 310                 315                 320

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330                 335
```

<210> 34

<211> 1140

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 43trimer-1

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

<400> 34

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                   10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95
```

```
gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc      336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc      384
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg      432
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gac aaa act cac aca tgt cca ccg      480
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
145                 150                 155                 160

tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc      528
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
                165                 170                 175

cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca      576
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            180                 185                 190

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac      624
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
        195                 200                 205

tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg      672
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
    210                 215                 220

gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc      720
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
225                 230                 235                 240

ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc      768
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
                245                 250                 255

aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa      816
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
            260                 265                 270

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat      864
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
        275                 280                 285

gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc      912
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
    290                 295                 300

tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag      960
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
305                 310                 315                 320

aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc     1008
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
                325                 330                 335
```

ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1056
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
340 345 350

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1104
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
355 360 365

acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 1140
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 35

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 35

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
35 40 45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
50 55 60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65 70 75 80

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
85 90 95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
100 105 110

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
115 120 125

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
130 135 140

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
145 150 155 160

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
165 170 175

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
180 185 190

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
195 200 205

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
210 215 220

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
245 250 255

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
260 265 270

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
275 280 285

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
290 295 300

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
305 310 315 320

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
325 330 335

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
340 345 350

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
355 360 365

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 36

<211> 1272

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKR 43quad-2

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1272)

<400> 36

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc     336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc     384
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg     432
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc     480
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg     528
Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
                165                 170                 175

tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca     576
Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

gca cct cct gcc gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct     624
Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        195                 200                 205
```

```
gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      672
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    210                 215                 220

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      720
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
225                 230                 235                 240

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac      768
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                245                 250                 255

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac      816
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            260                 265                 270

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac      864
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        275                 280                 285

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc      912
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    290                 295                 300

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga      960
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
305                 310                 315                 320

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag     1008
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                325                 330                 335

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1056
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            340                 345                 350

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1104
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        355                 360                 365

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc     1152
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    370                 375                 380

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1200
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
385                 390                 395                 400

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1248
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                405                 410                 415

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                                    1272
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420
```

<210> 37

<211> 423

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 37

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

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

Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        195                 200                 205

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    210                 215                 220
```

```
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
225                 230                 235                 240

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                245                 250                 255

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            260                 265                 270

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        275                 280                 285

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    290                 295                 300

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
305                 310                 315                 320

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                325                 330                 335

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            340                 345                 350

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    370                 375                 380

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
385                 390                 395                 400

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                405                 410                 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            420
```

<210> 38

<211> 1404

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> TWEAKR 43quint-3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1404)

<400> 38

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc     336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc     384
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg     432
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc     480
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg     528
Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
                165                 170                 175

tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca     576
Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc     624
Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
        195                 200                 205

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     672
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
    210                 215                 220
```

```
cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc      720
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225                 230                 235                 240

gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg      768
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
                245                 250                 255

gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg      816
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            260                 265                 270

atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac      864
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        275                 280                 285

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg      912
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    290                 295                 300

cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac      960
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305                 310                 315                 320

cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc     1008
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                325                 330                 335

aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc     1056
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            340                 345                 350

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg     1104
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        355                 360                 365

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc     1152
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
    370                 375                 380

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag     1200
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385                 390                 395                 400

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc     1248
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
                405                 410                 415

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg     1296
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            420                 425                 430

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg     1344
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct     1392
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

ccg ggt aaa taa                                                    1404
Pro Gly Lys
465
```

<210> 39

<211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 39

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

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

Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190
```

Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
195 200 205

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
210 215 220

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

```
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        435                 440                 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    450                 455                 460

Pro Gly Lys
465
```

<210> 40
<211> 1536
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKR 43hex-1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1536)

<400> 40

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc     336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc     384
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg     432
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140
```

```
ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc      480
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg      528
Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
                165                 170                 175

tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca      576
Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      624
Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
        195                 200                 205

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg      672
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
    210                 215                 220

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc      720
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225                 230                 235                 240

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac      768
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
                245                 250                 255

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc      816
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
            260                 265                 270

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gac aaa act cac      864
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His
        275                 280                 285

aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt      912
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
    290                 295                 300

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc      960
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
305                 310                 315                 320

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag     1008
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
                325                 330                 335

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag     1056
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
            340                 345                 350

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc     1104
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
        355                 360                 365

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag     1152
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
    370                 375                 380
```

```
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc      1200
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
385                 390                 395                 400

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc      1248
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
                405                 410                 415

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg      1296
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
            420                 425                 430

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat      1344
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
        435                 440                 445

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc      1392
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
    450                 455                 460

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg      1440
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
465                 470                 475                 480

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg      1488
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
                485                 490                 495

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa      1536
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500                 505                 510
```

<210> 41

<211> 511

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

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

Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
        195                 200                 205

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
    210                 215                 220

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225                 230                 235                 240

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
                245                 250                 255

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
            260                 265                 270

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His
        275                 280                 285

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
    290                 295                 300

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
305                 310                 315                 320
```

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
340 345 350

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
355 360 365

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
370 375 380

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
385 390 395 400

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
405 410 415

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
420 425 430

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
435 440 445

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
450 455 460

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
485 490 495

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 42
<211> 1668
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> TWEAKR 43sept-1
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1668)

<400> 42

```
atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1               5                  10                  15

ggt tcc acc ggt gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc      96
Gly Ser Thr Gly Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
            20                  25                  30

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     144
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     192
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac     240
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc     288
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc     336
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc     384
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg     432
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
    130                 135                 140

ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc     480
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145                 150                 155                 160

cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg     528
Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala
                165                 170                 175

tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca     576
Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
            180                 185                 190

gca cct cct gcc gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc     624
Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
        195                 200                 205

tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg     672
Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
    210                 215                 220

cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc     720
Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225                 230                 235                 240
```

```
gca cca ggc acc gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac      768
Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
                245                 250                 255

ctg gac aag tgc atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc      816
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
            260                 265                 270

gac ttc tgc ctg ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gca cca ggc acc      864
Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
        275                 280                 285

gcc ccc tgc tcc cgc ggc agc tcc tgg agc gcg gac ctg gac aag tgc      912
Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
    290                 295                 300

atg gac tgc gcg tct tgc agg gcg cga ccg cac agc gac ttc tgc ctg      960
Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
305                 310                 315                 320

ggc tgc gct gca gca cct cct gcc gac aaa act cac aca tgt cca ccg     1008
Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
                325                 330                 335

tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc     1056
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            340                 345                 350

cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca     1104
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        355                 360                 365

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac     1152
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
    370                 375                 380

tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg     1200
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
385                 390                 395                 400

gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc     1248
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                405                 410                 415

ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc     1296
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            420                 425                 430

aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa     1344
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        435                 440                 445

ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat     1392
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
    450                 455                 460

gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc     1440
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
465                 470                 475                 480
```

```
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag     1488
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                485                 490                 495

aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc     1536
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            500                 505                 510

ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg     1584
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        515                 520                 525

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac     1632
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    530                 535                 540

acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                    1668
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545                 550                 555
```

<210> 43

<211> 555

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 43

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

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

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
        35                  40                  45

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
65                  70                  75                  80

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
                85                  90                  95

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
        115                 120                 125
```

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
130 135 140

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser
145 150 155 160

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

Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala
180 185 190

Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser
195 200 205

Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala
210 215 220

Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala
225 230 235 240

Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
245 250 255

Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser
260 265 270

Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Gly Thr
275 280 285

Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys
290 295 300

Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His Ser Asp Phe Cys Leu
305 310 315 320

Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
325 330 335

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
340 345 350

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
355 360 365

```
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
    370                 375                 380

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
385                 390                 395                 400

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                405                 410                 415

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            420                 425                 430

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
        435                 440                 445

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
    450                 455                 460

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
465                 470                 475                 480

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                485                 490                 495

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            500                 505                 510

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        515                 520                 525

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    530                 535                 540

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545                 550                 555
```

<210> 44

<211> 282

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> huTWEAKr 28-79: gly5: Fc

<400> 44

```
Met Glu Gln Ala Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp
1               5                   10                  15
```

Ser Ala Asp Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg
20 25 30

Pro His Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro
35 40 45

Phe Arg Gly Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
50 55 60

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
85 90 95

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
100 105 110

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
115 120 125

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
130 135 140

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
145 150 155 160

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
165 170 175

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
180 185 190

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
195 200 205

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
210 215 220

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
225 230 235 240

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
245 250 255

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
260 265 270

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275 280

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> enlazador

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5