



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 409**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04723552 .8**

96 Fecha de presentación : **26.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1606318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Proteínas de fusión Fc mejoradas.**

30 Prioridad: **26.03.2003 EP 03006949**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2009

73 Titular/es: **Apogenix GmbH**
Im Neuenheimer Feld 581
69120 Heidelberg, DE
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts

72 Inventor/es: **Walczak, Henning**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 327 409 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión Fc mejoradas.

5 La invención se refiere a proteínas de fusión que comprenden al menos un dominio de polipéptido biológicamente activo y un segundo dominio seleccionado de un dominio constante de inmunoglobulina.

10 Proteínas de fusión que comprenden un dímero de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina o un tetrámero de cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina, en las cuales una secuencia de aminoácidos de una pareja de fijación de ligando que es un receptor, una proteína portadora, una hormona, un factor de crecimiento o una enzima, se encuentra en sustitución de la región variable de al menos de una cadena de inmunoglobulina, se describen en EP-A-0526452. Una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular del receptor de muerte CD95 (APO-1; Fas) fusionado a un fragmento Fc de inmunoglobulina se describe en WO 95/27735. Derivados truncados en el terminal N de la molécula APO-1 fusionados opcionalmente a fragmentos Fc de inmunoglobulina se describen en EP-A-0965637. Una proteína de fusión constituida por fragmentos solubles IL-15R α y Fc se describe en WO 98/36768. Una proteína de fusión constituida por un mutante antagonista de IL-15 y un fragmento Fc IgG2a ha sido descrita por Kim *et al.* (*J. Immunol.* 160 (1998), 5742-5748).

20 Aunque se ha demostrado que proteínas de fusión como las arriba descritas tienen actividad biológica alta *in vitro* e *in vivo*, existen problemas con relación al potencial inmunógeno de tales moléculas dado que existe una región de fusión entre dos dominios proteínicos de origen diferente que comprenden una secuencia amino no existente naturalmente que puede provocar una respuesta inmune indeseable en un organismo al que se administre la proteína de fusión.

25 WO 02/066514 describe proteínas de fusión artificiales que tienen una inmunogenicidad reducida comparadas con la molécula no modificada parental cuando se exponen a una especie *in vivo*. Estas proteínas consisten esencialmente en una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma fusionado covalentemente a través de su término C al término N de una molécula biológicamente activa que no es una inmunoglobulina, preferiblemente un polipéptido o proteína o un fragmento biológicamente activo de los mismos. Las moléculas tienen secuencias de aminoácidos que están alteradas en una o más posiciones de residuos de aminoácido pero, en principio, tienen la misma actividad biológica comparadas con las moléculas inalteradas. Los cambios se producen en regiones de las moléculas que están identificadas como epítopes de células T, que contribuyen a una reacción inmunitaria en un hospedador vivo. Sin embargo, una desventaja de este procedimiento es que no todos los epítopes, particularmente los epítopes distintos de células B, pueden eliminarse fiablemente. Adicionalmente, la introducción de secuencias de aminoácidos no existentes naturalmente puede conducir a la generación de neo-epítopes.

Por esta razón, ha sido un objeto de la presente invención proporcionar proteínas de fusión que tienen al menos dos dominios de origen diferente que tienen un potencial inmunógeno reducido.

40 Se describe una proteína de fusión que comprende

(i) al menos un primer dominio que comprende un polipéptido biológicamente activo y

45 (ii) un segundo dominio heterólogo que comprende al menos una porción de un dominio constante de inmunoglobulina,

en la cual existe al menos un solapamiento de aminoácidos entre el primer dominio y el segundo dominio en la región de fusión.

50 La proteína de fusión puede ser una proteína monómera o una proteína multímera, v.g. una proteína dímera o tetrámera, que puede formarse por multimerización por la vía del domino constante de inmunoglobulina.

55 El diseño de una proteína de fusión comprende: i) la selección de al menos un primer dominio y un segundo dominio que es heterólogo al primer dominio y ii) la selección de al menos un aminoácido terminal que es común al primer y al segundo dominio, v.g. el o los últimos aminoácidos del primer dominio se selecciona(n) de tal modo que los mismos son idénticos al primer o primeros aminoácidos del segundo dominio. Preferiblemente, el solapamiento tiene una longitud de uno, dos o tres aminoácidos. Así, se obtiene una proteína de fusión que está exenta de una transición no existente naturalmente entre el último aminoácido de un dominio y el primer aminoácido de otro dominio.

60 El o los primeros dominios está o están localizados en el término N de la proteína de fusión, mientras que el segundo dominio está localizado en el término C. Así, al menos un aminoácido del terminal carboxi de un primer dominio se solapa con al menos un ácido del terminal amino del segundo dominio.

65 El segundo dominio puede estar localizado en el término N de la proteína de fusión y el o los primeros dominios está o están localizados en el término C. Así, al menos un aminoácido carboxiterminal del segundo dominio se solapa con al menos un ácido del terminal amino de un primer dominio.

En los casos en que la proteína de fusión comprende más de uno, v.g. dos o tres, primeros dominios, estos dominios están localizados preferiblemente de modo secuencial en el término N o el término C de la proteína de fusión, y el segundo dominio en el término C o en el término N, respectivamente. Debe indicarse que los primeros dominios en tales proteínas pueden ser iguales o diferentes. Las transiciones entre los primeros dominios individuales están diseñadas preferiblemente de tal manera que existe también al menos un solapamiento de aminoácido (y por tanto no una transición no existente naturalmente entre el último aminoácido de un dominio y el primer aminoácido del otro dominio) entre los primeros dominios individuales. Proteínas de fusión que comprenden primeros dominios múltiples se describen en WO 00/18932.

El primer dominio de la proteína de fusión comprende un polipéptido biológicamente activo, es decir un polipéptido que es capaz de interactuar con, v.g. fijarse a, una pareja de fijación, v.g. otro polipéptido, en su ambiente natural en una célula o en un organismo y que es preferiblemente capaz de exhibir una actividad farmacológica. El primer dominio es preferiblemente un polipéptido distinto de inmunoglobulina. El primer dominio puede ser un polipéptido existente naturalmente o una variante del mismo que tiene actividad biológica deseada, v.g. aumentada o reducida, o un fragmento de un polipéptido existente naturalmente o una variante del mismo. El primer dominio se selecciona preferiblemente del dominio de fijación de ligando de un receptor y un dominio de fijación de receptor de un ligando. Los términos “ligando” y “receptor” deben entenderse en este contexto de tal manera que los ligandos se definen como proteínas que se sabe funcionan para unirse específicamente a moléculas receptoras. El término “receptor” incluye proteínas receptoras solubles o ancladas a la membrana que tienen una región transmembranal hidrófoba o un ancla fosfolipídica. Adicionalmente, el término “receptor” abarca proteínas portadoras tales como hormonas, proteínas celulares adhesivas, lectinas, factores de crecimiento, enzimas, etc.

El primer dominio es un dominio receptor de fijación de ligando que comprende el dominio extracelular de un receptor anclado a la membrana o un fragmento de fijación de ligando del mismo. El receptor puede seleccionarse de receptores de muerte, receptores de factores de crecimiento y receptores de citoquinas. El receptor puede seleccionarse de CD95 (APO-1; Fas), receptores TRAIL, receptores TNF, receptores VEGF, un receptor de interleuquina tal como IL-15R α . El receptor puede ser CD95, un receptor TRAIL, v.g. el receptor-1 TRAIL, el receptor-2 TRAIL, el receptor-3 TRAIL, o el receptor-4 TRAIL o un receptor TNF, v.g. el receptor-1 TNF o el receptor-2 TNF.

El primer dominio es un dominio de ligando de fijación de receptor, tal como el ligando CD95, TRAIL, TNF, v.g. TNF- α o TNF- β , factores de crecimiento, v.g. VEGF y citoquinas, tales como interferones o interleuquinas, v.g. IL-15 o variantes de los mismos.

La proteína de fusión comprende primeros dominios múltiples que pueden ser iguales o diferentes. Un ejemplo de una proteína de fusión múltiple de este tipo es una proteína de fusión VEGF Trap, que comprende el segundo dominio extracelular del receptor 1 VEGF (Flt-1) con el tercer dominio del receptor 2 VEGF (KDR/Flk-1) y una región constante de IgG.

La proteína del primer dominio es preferiblemente una proteína de mamífero, más preferiblemente una proteína humana. Para propósitos terapéuticos en particular, se prefiere el uso de proteínas humanas.

El segundo dominio de la proteína de fusión comprende al menos una porción de un dominio constante de inmunoglobulina, v.g. un dominio constante pesado de inmunoglobulina o un dominio constante ligero de inmunoglobulina. Preferiblemente, el segundo dominio comprende al menos una porción de un dominio constante pesado de inmunoglobulina. El dominio constante pesado de inmunoglobulina es preferiblemente un fragmento Fc que comprende el dominio CH2 y CH3 y, opcionalmente, al menos una parte de la región bisagra. El dominio de inmunoglobulina puede ser un dominio de inmunoglobulina IgG, IgM, IgD o IgE, o un dominio de inmunoglobulina modificado derivado de los mismos. Preferiblemente, el segundo dominio comprende al menos una porción de un dominio constante de inmunoglobulina IgG. El dominio de inmunoglobulina IgG puede seleccionarse de dominios IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de dominios modificados tales como los descritos en US 5.925.734. El dominio de inmunoglobulina puede exhibir funciones efectoras, particularmente funciones efectoras seleccionadas de ADCC y/o CDC. En algunas realizaciones, sin embargo, pueden utilizarse dominios de inmunoglobulina modificados que tienen funciones efectoras modificadas, v.g. al menos parcialmente delecionadas.

El diseño de la proteína de fusión de la presente invención comprende una selección del o de los aminoácidos terminales del primer dominio y del segundo dominio a fin de crear un solapamiento de al menos un aminoácido entre ambos dominios. Con objeto de alcanzar esta meta, es usualmente necesario deleccionar uno o varios aminoácidos de un primer y/o segundo dominio y/o añadir uno o varios amino-ácidos del dominio adyacente existente naturalmente al primer y/o segundo dominio. Por ejemplo, puede ser necesario proporcionar un primer dominio que tenga una deleción de preferiblemente hasta 10 y, más preferiblemente hasta 6 aminoácidos, v.g. 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 aminoácidos de los límites del dominio existentes naturalmente. Por otra parte, puede ser necesario añadir preferiblemente hasta 10 y, más preferiblemente, hasta 6 aminoácidos, v.g. 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 aminoácidos de un dominio adyacente existente naturalmente al primer y/o segundo dominio. Cuando se deleccionan y/o añaden aminoácidos, sin embargo, debe tenerse precaución a fin de que la actividad biológica del primer dominio y/o el segundo dominio no se vea afectada desfavorablemente.

La proteína de fusión de la invención comprende una secuencia señal N-terminal que permite la secreción de una célula hospedadora después de expresión recombinante. La secuencia señal puede ser una secuencia señal que es homóloga al primer dominio de la proteína de fusión. Alternativamente, la secuencia señal puede ser también

una secuencia señal heteróloga, v.g. la secuencia del péptido señal Ig κ o la secuencia señal Ig λ . En una realización diferente, la proteína de fusión está exenta de una secuencia N-terminal, representando así la forma madura de la proteína de fusión.

5 El solapamiento entre el primer y el segundo dominio o entre los dos primeros dominios tiene una longitud de preferiblemente 1, 2 ó 3 aminoácidos. Más preferiblemente, el solapamiento tiene una longitud de un solo aminoácido. Ejemplos de solapamiento de aminoácidos son S, E, K, H, T, P y D.

10 La presente invención se explica en detalle a continuación con relación a varias realizaciones específicas preferidas. Debe indicarse, sin embargo, que proteínas de fusión adicionales de la invención pueden fabricarse por medios análogos.

15 En una primera realización preferida, el primer dominio es el dominio extracelular de CD95 humana. El dominio extracelular de la proteína de fusión comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos hasta el aminoácido 170, 171, 172 ó 173 de CD95 humana. Preferiblemente, el dominio extracelular de CD95 está fusionado con un fragmento Fc de IgG humana, v.g. un fragmento Fc de IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos de la molécula CD95 humana se muestra en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos del dominio de la cadena constante de IgG1 humana se muestra en la Figura 2. Se prefiere especialmente la proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las Figuras 3A y 3B, en donde la secuencia de aminoácidos solapante es S.

20 El primer dominio puede ser el dominio extracelular de un receptor TRAIL humano, v.g. el receptor-1 TRAIL humano, el receptor-2 TRAIL humano, el receptor-3 TRAIL humano y el receptor-4 TRAIL humano. El dominio extracelular comprende la secuencia de aminoácidos hasta el aminoácido 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 (TRAILR-1), 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210 (TRAILR-2 largo), 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191 (TRAILR-2 largo - sin repetición), 179, 180, 181, 182, 183, 184 (TRAILR-2 corto), 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, (TRAILR-3), 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161 (TRAILR-3 sin repetición) y 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 (TRAILR-4). Se describe especialmente el receptor-2 TRAIL humano. El dominio del receptor TRAIL humano extracelular puede estar fusionado con un fragmento Fc de IgG-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de receptores TRAIL humanos se muestran en la Figura 4 (TRAILR-1), Figura 6 (TRAILR-2 largo), 30 Figura 9 (TRAILR-2 corto), Figura 11 (TRAILR-3) y Figura 14 (TRAILR-4). Ejemplos específicos de proteínas de fusión comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en las Figuras 5, 7, 8, 10, 12, 13 y 15.

35 La proteína de fusión puede comprender un primer dominio que es el dominio extracelular de un receptor TNF humano, v.g. un receptor-1 de TNF humano o un receptor-2 de TNF humano. El dominio extracelular comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos hasta el aminoácido 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211 (TNF-R1) o 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257 (TNF-R2). El dominio extracelular del receptor TNF humano puede estar fusionado a un fragmento Fc de IgG-1 humana. Las secuencias de aminoácidos de receptores TNF humanos se muestran en las Figuras 16 (TNF-R1) y 18 (TNF-R2). Ejemplos específicos de proteínas de fusión comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en las Figuras 17 y 19.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se ha descrito arriba. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de DNA, v.g. una molécula de DNA bicatenario o monocatenario, o una molécula de RNA. La molécula de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión o un precursor de la misma, v.g. una pro- o pre-proforma de la proteína de fusión que puede 45 comprender una secuencia señal u otras porciones de aminoácidos heterólogos para secreción o purificación que están localizadas preferiblemente en el término N y/o C de la proteína de fusión. Las porciones de aminoácidos heterólogos pueden estar enlazadas al primer y/o segundo dominio por la vía de un sitio de escisión con proteasa, v.g. un sitio de escisión de Factor X_a, trombina o proteasa IgA.

50 La molécula de ácido nucleico puede estar enlazada operativamente a una secuencia de control de la expresión, v.g. una secuencia de control de la expresión que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora deseada. La molécula de ácido nucleico puede estar localizada en un vector, v.g. un plásmido, un bacteriófago, un vector viral, un vector de integración de cromosomas, etc. Ejemplos de secuencias de control de la expresión y vectores adecuados han sido descritos por ejemplo por Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, y Ausubel *et al.* (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John 55 Wiley & Sons.

Pueden utilizarse diversos sistemas vector de expresión/célula hospedadora para expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión de la presente invención. Células hospedadoras adecuadas incluyen, pero 60 sin carácter limitante, células procariotas tales como bacterias, v.g. *E. coli*, células hospedadoras eucariotas tales como células de levadura, células de insecto, células de plantas o células de animales, preferiblemente células de mamífero y, más preferiblemente, células humanas.

65 Adicionalmente, la solicitud se refiere a un organismo no humano transformado o transfectado con una molécula de ácido nucleico como se ha descrito arriba. Tales organismos transgénicos pueden generarse por métodos conocidos de transferencia genética que incluyen recombinación homóloga.

ES 2 327 409 T3

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como agente activo al menos una proteína de fusión o una molécula de ácido nucleico que codifica la misma en donde el primer dominio es el dominio extracelular CD95 para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos asociados con apoptosis.

5

En esta realización de la invención, la composición puede utilizarse en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos seleccionados de trastornos autoinmunes, SIDA, trastornos cardíacos, v.g. infarto de miocardio, trastornos de rechazo inverso, rechazo de trasplantes, deterioro cerebral, v.g. derrame cerebral, lesiones de la médula espinal, v.g. paraplejia, sepsis, hepatitis, trastornos asociados con inflamación, lesión de reperfusión isquémica y trastornos renales. Estos trastornos y trastornos adicionales que pueden tratarse por administración de proteínas de fusión de receptores de muerte, particularmente proteínas de fusión CD95, se describen en WO 95/27735, WO 99/50413, WO 01/41803, EP-A-0 965 637 y EP-A-0 992 243.

15

La proteína de fusión se administra a un individuo que se encuentra en necesidad de ello, particularmente un paciente humano, en una dosis suficiente para el tratamiento de las condiciones específicas por medios adecuados. Por ejemplo, la proteína de fusión puede formularse con una composición farmacéutica junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse de acuerdo con protocolos estándar. La composición farmacéutica puede administrarse sistémicamente, v.g. por vía intraperitoneal, intramuscular o intravenosa, o localmente, v.g. por vía intranasal, subcutánea o intratecal. Se prefiere la administración intravenosa.

20

La dosis de la proteína de fusión administrada dependerá por su puesto del individuo a tratar, del peso del individuo, del tipo y gravedad de la lesión, de la modalidad de administración y del criterio del médico prescriptor. Para la administración de las proteínas de fusión CD95 o TRAIL-R, es adecuada una dosis diaria de 0,001 a 100 mg/kg.

25

Además, se describe un método de fabricación de una proteína de fusión que comprende

(i)

al menos un primer dominio que comprende una proteína biológicamente activa fusionada a

(ii)

un segundo dominio que comprende al menos una porción de un dominio constante de inmunoglobulina con potencial inmunógeno reducido, en donde el primer dominio está fusionado al segundo dominio con solapamiento de al menos un aminoácido.

Adicionalmente, se describe una proteína de fusión que comprende:

(i)

al menos un primer dominio que comprende un polipéptido biológicamente activo fusionado a

(ii)

un segundo dominio heterólogo que es capaz de oligomerizar la proteína de fusión, en donde existe al menos un solapamiento de un aminoácido entre el primer y segundo dominio en la región de fusión.

35

Proteínas de fusión que comprenden segundos dominios heterólogos que son capaces de oligomerizar las proteínas de fusión en ausencia de terceras proteínas se describen en WO 01/49866 y WO 02/090553, por ejemplo. La presencia de al menos un solapamiento de un aminoácido, v.g. solapamiento de uno, dos o tres aminoácidos, entre el primer y el segundo dominio en las proteínas de fusión conduce - como se ha explicado arriba - a proteínas de fusión con potencial inmunógeno reducido.

45

El primer dominio en esta proteína de fusión oligomerizante se define como anteriormente. El primer dominio puede ser un dominio extracelular de un receptor anclado a la membrana, o un fragmento de fijación de ligando del mismo. El receptor se selecciona de CD95, un receptor TRAIL, particularmente el receptor-2TRAIL y un receptor TNF, particularmente el receptor-2TNF. Alternativamente, el primer dominio puede ser un dominio de ligando de fijación de receptor, en donde el ligando se selecciona preferiblemente de ligando CD95, TRAIL y TNF. Ejemplos específicos de primeros dominios preferidos son como se ha descrito arriba.

55

El segundo dominio de la proteína de fusión comprende una porción oligomerizante de una proteína. Preferiblemente, el segundo dominio es capaz de di-, tri-, tetra- o pentamerizar la proteína de fusión. En este contexto, se hace referencia particular a la descripción de WO 01/49866 y WO 02/090553. Ejemplos preferidos de segundos dominios son C1q, MBP (Proteína de Fijación de Manosa), SP-A (Proteína-A Tensioactiva de Pulmón), SP-D (Proteína-D Tensioactiva de Pulmón), BC (Conglutinina de Suero Bovino), CL43 (Colectina-43 de Bovino), ACRP-30 (una proteína de la familia C1q) y COMP (Proteína Matriz Oligómera de Cartílago) o el dominio de colágeno de EDA o un derivado funcionalmente activo del mismo. Se prefieren especialmente porciones de ACRP-30, particularmente de la proteína ACRP-30 humana, v.g. los aminoácidos 18 a 108, 18 a 110 de COMP.

60

Como se ha descrito arriba, el o los primeros dominios de la proteína de fusión pueden estar localizados en el término N o C, y el segundo dominio en el término C o N. Adicionalmente, tanto el primer como el segundo dominio son preferiblemente de la misma especie, más preferiblemente de origen humano. Adicionalmente, las características

65

ES 2 327 409 T3

relativas a realizaciones preferidas de las proteínas de fusión basadas en inmunoglobulinas se aplican también a las proteínas de fusión oligomerizantes.

5 El potencial inmunógeno reducido de la proteína de fusión es resultado de la falta de transiciones existentes no naturalmente entre el primer y el segundo dominio en las proteínas de fusión, lo que conduce a su vez a un potencial reducido para la formación de neo-epítopes resultantes de la fusión entre dos polipéptidos heterólogos.

La presente invención se ilustra adicionalmente por las Figuras y Ejemplos que siguen.

10 Leyenda de las figuras

Figura 1: la secuencia de aminoácidos de la proteína humana CD95 (APO-1; Fas);

Figura 2: la secuencia de aminoácidos de la región C de la cadena de IgG-1 humana;

15 Figuras 3A y 3B: un ejemplo preferido de una proteína de fusión IgG1 CD95-Fc con un aminoácido solapante;

Figura 4: la secuencia de aminoácidos del receptor-1 TRAIL humano;

20 Figura 5: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1 Fc TRAILR-1 con aminoácidos solapantes;

Figura 6: la secuencia de aminoácidos del receptor-2TRAIL humano (forma larga);

25 Figura 7: ejemplos preferidos de proteínas de fusión TRAILR-2 (largo) Fc IgG1 con aminoácidos solapantes, con inclusión de una secuencia de repetición;

Figura 8: ejemplos preferidos de proteínas de fusión TRAILR-2 (forma larga) Fc con aminoácidos solapantes (sin secuencia de repetición);

30 Figura 9: la secuencia de aminoácidos de TRAILR-2 humano (forma corta);

Figura 10: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1 TRAILR-2 (corto) Fc con aminoácidos solapantes;

Figura 11: la secuencia de aminoácidos del receptor R-3 TRAIL humano;

35 Figura 12: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1 TRAILR-3 Fc con aminoácidos solapantes (con inclusión de repeticiones);

40 Figura 13: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1 TRAILR-3 Fc con aminoácidos solapantes (sin inclusión de repeticiones);

Figura 14: la secuencia de aminoácidos del receptor-4TRAIL humano;

Figura 15: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1 TRAILR-4 Fc con aminoácidos solapantes;

45 Figura 16: la secuencia de aminoácidos del receptor-1 del factor de necrosis tumoral humano;

Figura 17: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1TNFR-1 Fc con aminoácidos solapantes;

50 Figura 18: la secuencia de aminoácidos del receptor-2 del factor de necrosis tumoral humano;

Figura 19: ejemplos preferidos de proteínas de fusión IgG1TNF-R2 Fc con aminoácidos solapantes.

55 Ejemplo 1

Proteína de fusión constituida por el dominio extracelular de CD95 humana y el dominio Fc de IgG1 humana con aminoácidos solapantes

60 Dominio extracelular de CD95 humana

Bases 221-736 de CD95 humana (Genbank Acc. No. X63717). Secuencia utilizada de Oehm, A., Oehm, A., "Purification and Molecular Cloning of the APO-1 Cell Surface Antigen, a Member of the Tumour Necrosis Factor/Nerve Growth Factor Receptor Superfamily," Journal of Biological Chemistry Vol. 267, No.15, pp.10709-10715, 1992. Se creó cDNA a partir de RNA total aislado de Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) de sangre de donantes por RT-PCR utilizando el iniciador Oligo dT. Se utilizaron PCRs para amplificar el cDNA del dominio extracelular de CD95 por inclusión de un sitio de restricción Hind III y una secuencia Kozak en el 5' del dominio extracelular y en el 3' un sitio Bgl II (terminación del dominio extracelular).

ES 2 327 409 T3

Iniciadores PCR para la amplificación de cDNA de CD95 con polimerasa Taq:

Sentido huCD95-Hind III: TATA AAGCTT GCC ACC ATG CTG GGC ATC TG (SEQ ID NO:21)

5 Antisentido huCD95-Bgl II: TATA AGATCT GGA TCC TTC CTC TTT GC (SEQ ID NO:2)

Dominio Fc de IgG1 humana

10 Secuencia: 2050-2745 pb. Secuencia utilizada de Ellison, J., "The nucleotide sequence of human immunoglobulin C gene", Nucleic Acid Research, Volumen 10 Número 13, 1982. Se creó cDNA a partir de RNA total aislado de Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) de sangre de donantes por RT-PCR utilizando iniciador Oligo dT. Se utilizó una PCR para amplificar el cDNA de Fc de IgG1 humana (bisagra parcial-CH3) por inclusión de un sitio de restricción Bgl II en el 5' del iniciador y en el 3' del iniciador después del codón de parada, un sitio Xho I.

15 Iniciadores PCR para la amplificación de cDNA de Fc de IgG1 con polimerasa Taq:

Sentido hulG1Fc-Bgl111: TATA AGATCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TG (SEQ ID NO: 3)

20 Antisentido hulG1Fc-Xho1: TATA CTCGAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GG (SEQ ID NO: 4)

Procedimiento de clonación

25 Después de la amplificación, el producto PCR de Fc de IgG1 se digirió con Bgl II y Xho I. El producto PCR de CD95 se digirió con Hind III y Bgl II y pcDNA3.1 (con promotor CMV) con Hind III y Xho I. Los productos se purificaron por extracción con gel (kit Qiagen).

30 Los fragmentos hulG1Fc y CD95 se ligaron con ligasa T4 en pcDNA3.1. Después de transfección de células químicamente competentes One Shot Top 10 (E. coli) de Invitrogen, Pedido #C4040-10 y amplificación, se realizó una preparación de plásmido con el kit Qiagen Plasmid Prep.

35 Se realizó una ligación en tres puntos por digestión de pcDNA3.1 con Hind III y Xho I, CD95 EC con Hind III y Bgl II, y hulG1Fc con Bgl II y Xho I. La presencia de la inserción CD95-hulG1Fc en pcDNA3.1 se verificó por secuenciación y análisis con enzimas de restricción. El vector que contenía la inserción se digirió con Hind III y Xba I y la inserción se ligó en pcDNA3.1 que contenía el promotor EF-1.

40 La secuencia Kozak del constructo original CD95-FC se cambió de GCCACCATGC a GCCGCCACCATGG por amplificación del producto CD95-FC completo con los iniciadores SEQ ID 5 y SEQ ID 6.

Iniciadores para Cambio de la Secuencia Kozak de GCCACCATGC a GCCGCCACCATGG:

45 ShuCD95EC_altKozak TATA AAGCTT GCC GCC ACC ATG GTG GGC ATC (SEQ ID NO. 5)

AS698 hulG1Fc-Xho1 TATA CTCGAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GG (SEQ ID NO:6)

Procedimiento de Clonación

50 El producto PCR se clonó en el vector pcDNA3.1/V5 His Topo de Invitrogen (Pedido #K4800-01), digerido con Hind III y Xba I así como pcDNA3.1 que contenía el promotor pEF y se ligó con ligasa T4.

Expresión y Aislamiento

55 El constructo que codificaba el producto final se transfectó en líneas de células adecuadas para expresión de proteínas. La transfección puede realizarse por cualquier método estándar conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen electroporación, transferencia mediada por liposomas, transfección con fosfato de calcio. Líneas de células adecuadas para la expresión incluyen células 293T, células COS-1, COS-7 y CHO. Pueden utilizarse otras líneas de células.

60 En este ejemplo, se transfectaron transitoriamente células 293T por el método del fosfato de calcio. Alternativamente, se transfectaron células CHO utilizando FuGene6 y se seleccionaron clones estables.

65 La proteína deseada puede purificarse a partir del medio de cultivo de células por métodos cromatográficos. Los métodos incluyen, pero sin carácter limitante, cromatografía de afinidad en columnas de proteína G o proteína A,

ES 2 327 409 T3

cromatografía de cambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión de tamaños o una combinación de estos métodos.

5 En el ejemplo, el sobrenadante se purificó en columnas de IgG (Amersham Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, conduciendo a un producto altamente purificado en un solo paso.

Ejemplo 2

10 *Proteína de fusión consistente en el receptor-2TRAIL y el dominio Fc de IgG 1 humana con aminoácidos solapantes*

Dominio Fc de IgG 1 humana

15 Secuencia utilizada de Ellison, J., "The nucleotide sequence of human immunoglobulin C gene", Nucleic Acid Research, Volumen 10, Número 13, 1982. Se creó cDNA a partir de RNA total aislado de Linfocitos de Sangre Periférica (PBL) de sangre de donantes por RT-PCR utilizando el iniciador Oligo dT. Se utilizó una PCR para amplificar el cDNA de Fc de IgG1 humana (bisagra parcial-CH3) con una secuencia solapante a TRAILR2 en el extremo 5' y en el extremo 3' después del codón de parada un sitio EcoRI.

20 I. Iniciador: Sentido_hulgG1 (SEQ ID NO: 7)

II. Iniciador: Antisentido_ERIhulgG1 (SEQ ID NO: 8)

25 *TRAILR2*

30 Secuencia utilizada de Walczak H., "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL" The EMBO Journal Vol.16, No.17, pp.5386-5397, 1997. (Número de acceso DDBJ/EMBL/GenBank: AF016849). Se creó cDNA a partir de RNA total aislado de linfocitos de sangre periférica (PBL) de sangre de donantes por RT-PCR utilizando un iniciador Oligo dT. Se utilizó una PCR para purificar el cDNA del dominio TRAILR2 por inclusión de un sitio de restricción Hind III y una secuencia Kozak en el extremo 5' y en el extremo 3' una secuencia solapante para IgG1 humana.

35 III. Iniciador: Sentido_HIII_TRAILR2 (SEQ ID NO: 9)

TATA aag ctt gcc gcc acc atg gaa caa cgg gga cag aac

IV. Iniciador: Antisentido_TRAILR2 (SEQ ID NO: 10)

40 gtg agt ttt gtc aca aga GGC AGG AGT CCC TGG (Letras mayúsculas => parte huTRAIL-R2, al revés)

Procedimiento de clonación

45 A continuación de la amplificación se realizó una extracción con gel para aislar las inserciones modificadas. Se realizó luego una tercera PCR utilizando ambos fragmentos. Debido al solapamiento de ambos fragmentos y los iniciadores en el extremo, esta PCR se une en un solo producto. Después de ello el producto se digirió con Hind III y EcoRI y se ligó en un vector de expresión adecuado, v.g. pcDNA3.1 (Invitrogen).

50 III. Iniciador: Sentido_HIII_TRAILR2 (SEQ ID NO: 11)

TATA aag ctt gcc gcc acc atg gaa caa cgg gga cag aac

II. Iniciador: Antisentido_ERIhulgG1 (SEQ ID NO: 12)

55 TATA gaa ttc tca ttt acc cgg aga cag gg

Expresión

60 El constructo se clonó y expresó en células hospedadoras adecuadas como se describe en el Ejemplo 1.

65

Ejemplo 3

Uso de un constructo CD95-Fc para la regeneración y recuperación funcional después de lesión de la médula espinal

5 El constructo CD95-Fc con aminoácidos solapantes como se describe en el Ejemplo 1 se utilizó para el tratamiento de lesiones de la médula espinal en un modelo de ratón como ha sido descrito por Demjen *et al.*, *Nat Med.* (7 de marzo de 2004). Se encontró que la administración del constructo promueve la regeneración y recuperación funcional después de lesión de la médula espinal.

10

Ejemplo 4

Uso del constructo CD95-Fc para la atenuación del deterioro cerebral en el derrame cerebral

15 El constructo CD95-Fc con aminoácidos solapantes se investigó respecto a su influencia en la muerte por isquemia primaria y lesión secundaria por inflamación en un modelo de ratón como se describe por Martín-Villalba *et al.* (*Cell Death Differ.* 8 (2001), 679-686). Se encontró que la administración del constructo CD95-Fc daba como resultado una disminución significativa tanto en los volúmenes de infarto como en la mortalidad.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que comprende

- 5 (i) al menos un primer dominio que comprende un dominio de fijación de ligando del receptor CD95 fusionado a
- 10 (ii) un segundo dominio heterólogo que comprende un fragmento Fc de un dominio constante pesado de inmunoglobulina que comprende el dominio CH2 y CH3 y opcionalmente al menos una parte de la región bisagra

en donde existe al menos solapamiento de un aminoácido entre el primer dominio y el segundo dominio en la región de fusión,

15 en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en las Figuras 3A o 3B, para reducir el potencial inmunógeno de la proteína de fusión en el contexto de aplicaciones terapéuticas.

20 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde las aplicaciones terapéuticas se seleccionan de profilaxis y/o tratamiento de derrame cerebral, lesiones de la médula espinal y trastornos de rechazo inverso.

25 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 ó 2, en donde el dominio de inmunoglobulina exhibe funciones efectoras, particularmente funciones efectoras seleccionadas de ADCC y/o CDC.

4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el primer dominio y/o el segundo dominio de la proteína de fusión comprende una delección de preferiblemente hasta 6 aminoácidos.

30 5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el primer dominio y/o el segundo dominio de la proteína de fusión comprende una adición de preferiblemente hasta 6 aminoácidos.

6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia señal N-terminal.

35 7. la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de fusión carece de una secuencia señal N-terminal.

40 8. Molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para reducir el potencial inmunógeno de la proteína de fusión en el contexto de aplicaciones terapéuticas.

9. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde las aplicaciones terapéuticas se seleccionan de profilaxis y/o tratamiento de derrame cerebral, lesiones de la médula espinal y trastornos de rechazo inverso.

45 10. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 8 ó 9, en donde la molécula de ácido nucleico está enlazada operativamente a una secuencia de control de la expresión.

50 11. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la molécula de ácido nucleico está localizada en un vector.

55 12. Una composición farmacéutica para reducir el potencial inmunógeno de una proteína de fusión en el contexto de aplicaciones terapéuticas, que comprende como agente activo dicha proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

60 13. La composición de la reivindicación 12 para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos seleccionados de derrame cerebral, lesiones de la médula espinal y trastornos de rechazo inverso.

Figura 1

CD95

>sp|P25445|TNR6_Precursor del miembro 6 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (receptor FASL) (antígeno FAS de superficie mediador de apoptosis) (antígeno Apo-1) (CD95)-Homo sapiens(Humano).

```

1                               60
MLGIWTLPL VLTSVARLSS KSVNAQVTDI NSKGLELRKT VTTVETQNLGLHHDGQFCH
61                               120
KPCPPGERKA RDCTVNGDEP DCVPCQEGKE YTDKAHFSSK CRRCLCDEG HGLEVEINCT
121                               180
RTQNTKCRCK PNFFCNSTVC EHCDPCTKCE HGIIECTLT SNTKCKEES RSNLWLCLL
181                               240
LLPIPLIVWV KRKEVQKTCR KHRKENQGS ESPTLNPETV AINLSDVDLS KYITTIAGVM
241                               300
TLSQVKGFRV KNGVNEAKID EIKNDNVQDT AEQKVQLLRN WHQLHGKKEA YDTLIKDLKK
301                               335
ANLCTLAEKI QTIILKDITS DSENSFRNE IQSLV

```

AA 1-16 Péptido señal (potencial)

AA 17-173 Dominio extracelular (potencial)

AA 47-83 CRD1

AA 84-127 CRD2

AA 174-190 Transmembranal (potencial)

AA 191-335 Citoplásmico (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 2

IgG1

>sp|P01857|GC1_Región C de la cadena de Ig gamma-1 HUMANA - Homo sapiens (Humano).

```
1                               60
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
61                               120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCFAPELLGG
121                               180
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
181                               240
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
241                               300
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301                               330
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
```

AA 99-110 región bisagra

AA 111-223 región CH2

AA 224-330 región CH3

Variantes D239E, L241M

Figura 3A

CD95-Fc (AA 1-172 CD95 y AA 102-230 IgG1)

```

1                                     60
MLGIWTLPL VLTSVARLSS KSVNAQVTDI NSKGLELRKT VTTVETQNL E GLHHDGQFCH
61                                     120
KPCPPGERKA RDCTVNGDEP DCVPCQEGKE YDKAHFSSK CRRRLCDEG HGLEVEINCT
121                                     180
RTQNTKCRCK PNFFCNSTVC EHCDPCKCE HGIIECTLT SNTKCKEEGS RSCDKTHTCP
181                                     240
PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLHIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
241                                     300
KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
301                                     360
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY
361                                     400
SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
    
```

Figura 3B

Ejemplo de una proteína de fusión CD95-Fc con solapamiento de un aminoácido:

Dominio extracelular CD95		huIgG1	
131	173	99	120
PNFFCNSTVC EHCDPCKCE HGIIECTLT SNTKCKEEGS RSN		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
PNFFCNSTVC EHCDPCKCE HGIIECTLT SNTKCKEEGS RSCDKTHTCP PCPAPELLGG			

Figura 4

3. TRAIL-R1

>sp|000220|T10A_Precursor del miembro 10A de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (Receptor de muerte 4) (Receptor 1 del ligando inductor de apoptosis afín a TNF) (Receptor-1 TRAIL) (TRAIL-R1) - Homo sapiens (Humano).

```

1                                     60
MAPPPARVHL GAFLAVTPNP GSAASGTEAA AATPSKVWGS SAGRIEPRGG GRGALPTSMG
61                                     120
QHGPSARARA GRAPGPRPAR EASPRLRVHK TFKFVVVGV LQVVPSSAAT IKLHDQSIGT
121                                    180
QQWEHSPLGE LCPPGSHRSE HPGACNRCTE GVGYTNASNN LFACLPCTAC KSDEEERSPC
181                                    240
TTRNTACQC KPGTFRNDNS AEMCRKCSRG CPRGMVKVKD CTPWSDIECV HKESGNGHNI
241                                    300
WVILVTVLV PLLLVAVLIV CCCIGSGCGG DPKCMDRVCF WRLGLLRGPG AEDNAHNEIL
301                                    360
SNADSLSTFV SEQQMESQEP ADLTGVTVQS PGEAQCLLGP AEAEGSQRRR LLVPANGADP
361                                    420
TETLMLFFDK FANIVPFD SW DQLMRQLDLT KNEIDVVV RAG TAGPGDALYA MLMKWVNKTG
421                                    468
RNASIHTLLD ALERMEERHA KEKIQDLLVD SGKFIYLEDG TGSAVSLE

```

AA 1-23 Péptido señal (potencial)

AA 24-239 Dominio extracelular (potencial)

AA 107-145 CRD1

AA 147-188 CRD2

AA 189-229 CRD3

AA 240-262 Transmembranal (potencial)

AA 263-468 Citoplásmico (potencial)

Figura 5

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R1-Fc con aminoácidos solapantes:

Dominio extracelular Trail R1		huIgG1	
201	239	99	120
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKESGNGHN		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	239	99	120
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKESGNGHN		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	239	99	120
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKEŠGNGHN		EP KŠCDKTHTCP PCPAPELLGG	
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKEŠCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	239	99	120
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKESGNGHN		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
AEMCRKCSRG CPRGMVKVD CTPWSDIECV HKESGNGHTCP PCPAPELLGG			

Figura 6

4. TRAIL-R2 (largo)

>sp|014763|T10B_Precursor del miembro 10B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (Receptor de muerte 5) (Receptor 2 del ligando inductor de apoptosis afín a TNF) (Receptor-2 TRAIL) (TRAIL-R2) - Homo sapiens (Humano).

```

1                                     60
MEQRGQNAPA ASGARKRHGP GPREARGARP GPRVPKTLVL VVAVLLLVLS AESALITQQD
61                                     120
LAFQQRAAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHISED GEDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD
121                                     180
SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRITGC PRGMVKVGDC TPWSDIECVH
181                                     240
KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLLWKKV
241                                     300
LPYLKIGICSG GGGDPERVDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV
301                                     360
NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRLLVPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK
361                                     420
LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLLDALETLG ERLAKQKIED
421                                     440
HLLSSGKFMY LEGNADSAMS

```

AA 1-55 Péptido señal (potencial)

AA 56-110 Dominio extracelular (potencial)

AA 57-94 CRD1

AA 97-137 CRD2

AA 138-178 CRD3

AA 192-206 TAPE

AA 211-231 Transmembranal (potencial)

AA 232-440 Citoplásmico (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 7

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R2 (largo)-Fc con aminoácidos solapantes (con inclusión de "repeticiones"):

Dominio extracelular Trail R2 (largo)		huIgG1	
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCSDKTHTCP PCPAPELLGG			
Realización preferida como se describe en EP 03006949.6)			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	210	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTPASPCS		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE APAVEETVTS SPGTHTCP PCPAPELLGG			

Figura 8

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R2 (largo)-Fc con aminoácidos solapantes (sin inclusión de "repeticiones"):

Dominio extracelular Trail R2 (largo)		huIgG1	
171	191	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE A		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHSGE P KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	191	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE A		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	191	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE A		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTKHS CDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	191	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE A		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTHTCP PCPAPELLGG			
171	191	99	120
TPWSDIECVH KESGTKHSGE A		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
TPWSDIECVH KESGTHTCP PCPAPELLGG			

Figura 9

5. TRAIL-R2 (corto)

>sp|014763|T10B_Precursor del miembro 10B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (Receptor de muerte 5) (Receptor 2 del ligando inductor de apoptosis afín a TNF) (Receptor-2 TRAIL) (TRAIL-R2) - Homo sapiens (Humano).

```

1                                     60
MEQRGQNAPA ASGARKRHGF GPREARGARP GPRVPKTLVL VVAAVLLLVS AESALITQQD
61                                     120
LAPQQRAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHISED GRDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD
121                                    180
SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRGTC PRGMVKGDC TPWSDIECVH
181                                    240
KESGIIIGVT VAAVVLIVAV FVCKSLLWKK VLPYLKGICS GGGGDPERVD RSSQRPGAED
241                                    300
NVLNEIVSIL OPTQVPEQEM EVQEPAEPTG VNMLSPGESE HLEPAEAER SQRRRLVPA
301                                    360
NEGDPTETLR QCFDDFADLV PFDSWEPLMR KGLMDNEIK VAKAEAAGHR DTLYTMLIKW
361                                    411
VNKTGRDASV HTLLDALETG GERLAKQKIE DHLLSSGKFM YLEGNADSAM S

```

AA 1-55 Péptido señal

AA 56-184 Dominio extracelular (potencial)

AA 57-94 CRD1

AA 97-137 CRD2

AA 138-178 CRD3

AA 213-202 Transmembranal (potencial)

AA 203-411 Citoplásmico (potencial)

Figura 11

6. TRAIL-R3

>sp|014798|T10C_Precursor del miembro 10C de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (Receptor de reclamo 1) (DcR1) (Receptor 3 del ligando inductor de apoptosis afín a TNF) (Receptor-3 TRAIL) (TRAIL-R3) (Receptor Trail w

```

1 60
MARIPKTLKF VVVIVAVLLP VLAYSATTAR QEEVPOQTVA PQQQRHSFKG EECPAGSHRS
61 120
EHTGACNPCT EGVDYTNASN NEPSCFPCTV CKSDQKHKSS CTMTRDTVCQ CKEGTFRNEN
121 180
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQC EEFGANAIVE TPAAEETMNT SPGTPAPAAE
181 240
ETMNTSPGTP APAAEETMTT SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPASSHY
241 259
LSCTIVGIIV LIVLLIVFV

```

AA 1-23 Péptido señal

AA 24-236 Dominio extracelular

AA 29-66 CRD1

AA 69-109 CRD2

AA 110-149 CRD3

AA 162-236 5 x 15 AA repeticiones de cinta en tándem

AA 237-259 eliminado en forma madura (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 12

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R3-Fc con aminoácidos solapantes (con inclusión de "repeticiones"):

Dominio extracelular Trail-R3		huIgG1	
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
201	236	99	120
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPGTPAPAAE ETMTTSPGTP APAAEETMTT SPGTPA KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			

ES 2 327 409 T3

Figura 13

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R3-Fc con aminoácidos solapantes (sin inclusión de "repeticiones"):

Dominio extracelular Trail-R3		huIgG1	
121	161	99	120
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
121	161	99	120
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
121	161	99	120
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
121	161	99	120
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE THTCP PCPAPELLGG			
121	161	99	120
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATVE T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
SPEMCRKCSR CPSGEVQVSN CTSWDDIQCV EEFGANATHTCP PCPAPELLGG			

Figura 14

7. TRAIL-R4

>sp|Q9UBN6|T10D_Precursor del miembro 10D de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (Receptor de reclamo 2) (DcR2)(Receptor 4 del ligando inductor de apoptosis afin a TNF) (Receptor-4 TRAIL) (TRAIL-R4) (Receptor TRAIL con un dominio de muerte truncado) - Homo sapiens

```

1                                     60
MGLWGQSVPT ASSARAGRYP GARTASGTRP WLLDPKILKF VVFIVAVLLP VRVDSATIPR
61                                     120
QDEVPOQTVA PQQQRSLKE EECPAGSHRS EYTGACNPCT EGVDTIASN NLPSCLLCTV
121                                     180
CKSGQTNKSS CTTTRDTCVQ CEKGSFQDKN SPEMCRTCRT GCPRGMVKVS NCTPRSDIKC
181                                     240
KNESAAASSTG KTPAAEETVI TILGMLASPY HYLIIIVVLV IILAVVVVGF SCRKKFISYL
241                                     300
KGICSGGGGG PERVHRVLFRR RSCPSRVPG AEDNARNETL SNRYLQPTQV SEQEIQGQEL
301                                     360
AELTGVTVES PEEPQRLLLEQ AEAEGQRRR LLVPVNDADS ADISTLLDAS ATLEEGHAKE
361                                     386
TIQDQLVGSE KLFYEDEAG SATSCL

```

AA 1-55 Péptido señal

AA 56-211 Dominio extracelular (potencial)

AA 58-97 CRD1

AA 98-139 CRD2

AA 140-180 CRD3

AA 212-232 Transmembranal (potencial)

AA 233-386 Citoplásmico (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 15

Ejemplos de proteínas de fusión Trail-R4-Fc con aminoácidos solapantes:

Dominio extracelular Trail-R4		huIgG1	
171	211	99	120
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY H		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY H		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY H		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT THTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY H		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
NCTPRSDIKC KNESAASSTG KTPAAEETVT TILGMLASPY H THTCP PCPAPELLGG			

Figura 16

1. TNF-R1

>sp|P19438|TR1A_Precursor del miembro 1A de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (p60) (TNF-R1) (TNF-R1) (p55) (CD120a) [Contiene: Proteína 1 de fijación del factor de necrosis tumoral (TBPI)] - Homo sapiens (Humana).

```

1
MGLSTVPDLL LPLVLELLV GIYPSGVIGL VPHLGDREKR DSVCPQGKYI HPQNNsicCT 60
61
KCHKGTLYLN DCPGPGQDTD CRECESGSFT ASENHLRHCL SCSKCRKEMG QVEISSCTVD 120
121
RDTVCGCRKN QYRHYWSENLFQCFNCSLCL NGTVHLSCQE KQNTVCTCHA GFFLRENECV 180
181
SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT TVLLPLVIFV GLCLLSLLFI GLMYRYQRWK 240
241
SKLYSIVCGK STPEKEGELE GTTtkPLAPN PSFSPTPGFT PTLGFSPVPS STFTSSSTYT 300
301
PGDCPNFAAP RREVAPPYQG ADPILATALA SDPIPnPLQK WEDSAHKPQS LDTDDPATLY 360
361
AVVENVPPLR WKEFVRRRLGL SDHEIDRLEL QNGRCLREAQ YSMLATWRRR TPRREATLEL 420
421
LGRVLRDMDL LGCLEdieEA LCGPAALPPA PSLLR 455

```

AA 1-21 Péptido señal

AA 22-211 Dominio extracelular (potencial)

AA 43-82 CRD1

AA 83-125 CRD2

AA 126-166 CRD3

AA 167-196 CRD4

AA 212-234 Transmembranal (potencial)

AA 235-455 Citoplásmico (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 17

Ejemplos de proteínas de fusión TNF-R1-Fc con aminoácidos solapantes:

Dominio extracelular TNF-R1		huIgG1	
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSKDKTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDKHTHTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT THTCP PCPAPELLGG			
171	211	99	120
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGT T		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
GFFLRENECV SCSNCKKSLE CTKLCLPQIE NVKGTEDSGTHTHTCP PCPAPELLGG			

Figura 18

2. TNF-R2

>sp|P20333|TR1B_Precursor del miembro 1B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral humano (receptor 2 del factor de necrosis tumoral) (p80) (TNF-R2) (p75) (CD120b) (Etanercept) [Contiene: Proteína 2 de fijación del factor de necrosis tumoral (TBPII)] - Homo sapiens (Humana).

```

1                                     60
MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA QMCCSKCSPG
61                                     120
QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC SSDQVETQAC TREQNRICTC
121                                     180
RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA RPGTETS DVV CKPCAPGTFS NTTSSDIDCR
181                                     240
PHQICNVVAI PGNASMDAVC TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS
241                                     300
FLLPMGPPSP AEGSTGDFAL PVGLIVGVTA LGLLIIGVVN CVIMTQVKKK PLCLQREAKV
301                                     360
PHLPADKARG TQGPQQHLL ITAPSSSSSS LESSASALDR RAPTRNQPQA PGVEASGAGE
361                                     420
ARASTGSSDS SPGGHGTQVN VTCIVNVCSS SDHSSQCSSQ ASSTMGDIDS SPSESPKDEQ
421                                     461
VPPSKEECAAF RSQLETPETL LGSTEEKPLP LGVPDAGMKP S

```

AA 1-22 Péptido señal

AA 23-257 Dominio extracelular (potencial)

AA 39-76 CRD1

AA 77-118 CRD2

AA 119-162 CRD3

AA 163-201 CRD4

AA 258-287 Transmembranal (potencial)

AA 288-461 Citoplásmico (potencial)

ES 2 327 409 T3

Figura 19

Ejemplos de proteínas de fusión TNF-R2-Fc con aminoácidos solapantes:

Dominio extracelular TNF-R2		huIgG1	
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGKSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGDKTHTCP PCPAPELLGG			
221	257	99	120
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGD		EP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	
STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTHTCP PCPAPELLGG			