

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 084**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2018** **PCT/US2018/028753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2018** **WO18195527**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2018** **E 18726576 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024** **EP 3612556**

54 Título: **Constructos de LAMP mejorados**

30 Prioridad:

22.04.2017 US 201762488741 P
23.08.2017 US 201762549119 P
23.08.2017 US 201762549033 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.03.2025

73 Titular/es:

IMMUNOMIC THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
15010 Broschart Road Suite 250
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

HEILAND, TERI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 3 004 084 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

Constructos de LAMP mejorados

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención se refiere a constructos de LAMP mejorados y a su uso en el tratamiento de sujetos que padecen enfermedad infecciosa, diabetes, alergias, trastornos hiperproliferativos y/o cáncer. Adicionalmente, los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento pueden usarse para generar anticuerpos en vertebrados no humanos preferiblemente en los que el genoma de los vertebrados no humanos comprende al menos parcialmente regiones de inmunoglobulina humana y/o regiones de inmunoglobulina humanizada. También se describen protocolos de sensibilización-refuerzo usando los constructos mejorados de LAMP descritos en el presente documento.

Discusión de la técnica relacionada

En la siguiente discusión, se describirán algunos artículos y métodos con fines de antecedentes e introductorios. Nada de lo contenido en el presente documento debe interpretarse como una "admisión" de técnica anterior. El solicitante se reserva expresamente el derecho a demostrar, cuando sea apropiado, que los artículos y métodos a los que se hace referencia en el presente documento no constituyen técnica anterior según las disposiciones reglamentarias aplicables.

Las vacunas de ADN son candidatos nuevos y prometedores para el desarrollo de vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Se ha demostrado que son seguras y la falta de respuestas inmunitarias frente a una estructura principal de vector puede ser una ventaja definitiva si se requieren ciclos repetitivos de vacunación para lograr beneficios clínicos. Sin embargo, una desventaja percibida de las vacunas de ADN convencionales es su baja inmunogenicidad en seres humanos. Una etapa limitante clave en la inmunogenicidad de vacunas de ADN basadas en epítipo puede ser el acceso de epítipos a la ruta de presentación de MHCII a células T, lo cual es probable que sea un proceso estocástico en el caso de una vacuna sin tecnología de direccionamiento.

La patente estadounidense n.º 5.633.234 describe proteínas quiméricas que comprenden un dominio antigénico de hemaglutinina (HA) de influenza modificada y una señal de direccionamiento endosómico/lisosómico citoplasmática que dirige eficazmente antígenos a ese compartimento. Se procesó el dominio antigénico y se presentaron péptidos del mismo en la superficie celular en asociación con moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se usó la cola citoplasmática de LAMP-1 para formar el dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico de la proteína quimérica.

La patente estadounidense n.º 8.318.173 extiende estas observaciones iniciales para describir proteínas quiméricas (y los ADN correspondientes que codifican para estas proteínas) que comprenden la proteína Gag de VIH-1 insertada entre el dominio luminal completo y un dominio transmembrana de LAMP-1. Se introdujo este constructo en células dendríticas que después se notificó que seleccionaban como diana la ruta de MHC II.

Este enfoque ha demostrado ser útil para aumentar las respuestas celular y humoral frente a varios antígenos de virus, E7 de papilomavirus humano, proteína de membrana de virus del dengue, proteína de membrana gp160 de VIH-1, Gag p55 de VIH-1, proteína de membrana del Nilo occidental, proteína NS3 del virus de la hepatitis C y pp65 de citomegalovirus (véase, por ejemplo, Bonini, *et al.*, J. Immunol. 166: 5250-5257, 2001). La respuesta inmunitaria potenciada puede atribuirse a la ubicación conjunta de LAMP con MHC II y al procesamiento y suministro más eficientes de péptidos antigénicos. Además, se notifica que el direccionamiento por LAMP da como resultado la presentación de un número aumentado de epítipos inmunogénicos, induciendo por tanto una respuesta inmunitaria cualitativamente ampliada en comparación con antígeno no dirigido. Por ejemplo, Fernandes *et al.*, 2000, Eur. J. Immunol. 30(8): 2333-43, demostraron un aumento en el número de péptidos presentados de un antígeno de OVA sometido a tráfico por LAMP codificado en un vector de vaccinia. De 12 péptidos generados a partir de OVA suministrados de manera exógena, 9 se presentaron mediante una quimera de OVA/LAMP, en comparación con tan sólo 2 por el constructo sin LAMP. Arruda *et al.*, J. Immunol. 177 (2006), 2265-2275, describen un constructo que comprende el dominio antigénico de gag p55 de VIH situado detrás del dominio de LAMP de DC-LAMP y delante del dominio transmembrana y citoplasmático de dicho DC-LAMP. El documento WO2015/200357 describe constructos que comprenden un alérgeno de cacahuete ubicado detrás de una secuencia señal y un dominio de estabilización/tráfico intraorgánulos y delante de un dominio transmembrana y un dominio de direccionamiento endosómico/lisosómico.

Aunque se ha determinado que el dominio citoplasmático de LAMP es necesario (junto con una secuencia señal y dominio transmembrana), no siempre es suficiente para el tráfico endosómico/lisosómico de todos los antígenos. En vez de eso, se ha mostrado que también se requiere el dominio luminal completo de LAMP para el tráfico de proteínas a la ruta vesicular lisosómica.

Sin embargo, incluso con la presencia del dominio luminal completo y la cola transmembrana/citoplasmática completa de LAMP ("constructos de LAMP completos"), se ha encontrado cada vez más que la eficacia de un antígeno particular para producir una respuesta inmunitaria depende en gran medida de la secuencia particular usada en estos constructos. De hecho, se ha encontrado que diferentes fragmentos antigénicos de la misma proteína, cuando se insertan en los constructos de LAMP completos, no producen la misma respuesta inmunitaria. Algunas veces el fragmento de antígeno genera una respuesta inmunitaria y otras veces no. Estas observaciones hacen que la capacidad para predecir previamente qué secuencia antigénica particular de una proteína de interés producirá una respuesta inmunitaria sea difícil con los constructos de LAMP completos.

Además, en la generación de los constructos de LAMP completos, se ha observado de manera repetida que se requiere el dominio luminal completo para expresar y procesar un antígeno de manera apropiada. Por ejemplo, en Godinho *et al.*, PLoS ONE 9(6): 9(6): e99887, doi: 10.1371/journal.pone.0099887, los autores notificaron que el dominio luminal completo e intacto era la región mínima necesaria para dirigir un antígeno a los lisosomas y que fragmentos del dominio luminal no funcionaban. Véase la misma referencia en la página 6.

Específicamente, los autores de Godinho mostraron que, al retirar completamente el primer dominio luminal y parte del segundo dominio luminal (es decir, constructo de T1-Lum/gag), se reduce tanto la expresión de proteína como la respuesta de anticuerpos. De manera similar, al retirar el 25 % del primer dominio luminal pero tener un segundo dominio luminal intacto (es decir, T2-lum/gag), aumentaron comparativamente tanto la expresión de proteína como la respuesta de anticuerpos pero todavía fueron menores que los resultados obtenidos con el constructo de LAMP completo.

Además, los autores reconocieron que la capacidad para producir una respuesta inmunitaria depende del antígeno particular y de los epítomos usados en estos constructos de LAMP completos. Por ejemplo, en la página 9, columna 2, los autores mencionan que "por consiguiente, estudios anteriores demostraron que vacunas de ADN que generan Gag secretado como VLP, o en una forma soluble, inducen diferentes niveles de activación de células T y B, que también fueron diferentes de la respuesta inducida por Gag citoplasmático". Sin embargo, la inserción de una secuencia antigénica entre el dominio luminal completo de LAMP y el dominio transmembrana/citoplasmático completo de LAMP, tal como se ha descrito en la bibliografía, da como resultado secuencias de polinucleótido tan grandes que se vuelve o bien demasiado costoso de producir a niveles comerciales o bien impráctico desde un punto de vista científico. Además, el documento WO2011/046996 da a conocer variantes de LAMP/gag truncadas (figura 2) en las que el dominio luminal está truncado y notifica una respuesta de células T CD4 y CD8 inferior cuando se usan estos constructos truncados en comparación con constructos que comprenden el dominio luminal de longitud completa.

Por tanto, existe una necesidad de diseñar constructos de LAMP nuevos y mejorados que puedan usarse como vacunas para tratar eficazmente, por ejemplo, alergias, enfermedad infecciosa, diabetes, trastornos hiperproliferativos y/o cáncer. Además, una vez mejorados, estos nuevos constructos de LAMP pueden usarse para generar anticuerpos.

Sumario de la invención

Este sumario se proporciona para introducir una selección de conceptos de una forma simplificada que se describen adicionalmente más adelante en la descripción detallada. No se pretende que este sumario identifique características clave o esenciales del objeto reivindicado, ni se pretende usarse para limitar el alcance del objeto reivindicado. Otras características, detalles, utilidades y ventajas del objeto reivindicado resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada escrita incluyendo los aspectos ilustrados en los dibujos adjuntos y definidos en las reivindicaciones adjuntas.

Un objetivo de esta invención es proporcionar constructos novedosos ("constructos de LAMP mejorados") que comprenden fragmentos y/o variantes específicos de dominios de LAMP que presentan eficazmente un(os) antígeno(s) de interés al sistema inmunitario para generar una respuesta inmunitaria potenciada. Estos constructos de LAMP mejorados dirigen eficazmente los antígenos al compartimento lisosómico/endosómico en el que se procesan y se presentan a moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de modo que se estimulan preferiblemente células T cooperadoras y/o se generan anticuerpos.

Los constructos de LAMP mejorados y métodos descritos en el presente documento pueden producir una respuesta inmunitaria en un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria frente a los epítomos de los antígenos en el constructo de LAMP mejorado (por ejemplo, vacuna). Las vacunas arman al sistema inmunitario del sujeto de tal manera que el sistema inmunitario puede detectar y destruir lo que contiene los antígenos de las vacunas en el sujeto. Los constructos de LAMP mejorados y métodos descritos en el presente documento pueden producir una respuesta inmunitaria de Th1 en el sujeto. Las respuestas inmunitarias de Th1 pueden incluir secreción de citocinas inflamatorias (por ejemplo, IFN γ , TNF α) por un subconjunto de células inmunitarias (por ejemplo, células T específicas de antígeno). En algunos casos, las citocinas inflamatorias activan otro subtipo de células inmunitarias (por ejemplo, células T citotóxicas) que pueden destruir lo que contiene el antígeno en el sujeto.

En algunos casos, los epítomos y/o antígenos usados en los constructos de LAMP mejorados y métodos descritos en el presente documento pueden reconocerse por el sistema inmunitario de un sujeto para producir una respuesta

inmunitaria de Th1 y liberar citocinas de tipo I. La respuesta de Th1 puede iniciarse mediante la interacción entre el epítipo y la célula T, más específicamente, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresado por la célula T. Por ejemplo, la unión de alta afinidad de un epítipo a un receptor de MHC puede estimular una respuesta de Th1. Los receptores de MHC pueden ser al menos uno de una pluralidad de tipos de receptores de MHC. Los receptores de MHC que interaccionan con una célula T pueden variar a través de individuos en una población.

En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de tipo 1. En algunos casos, la respuesta inmunitaria está caracterizada por una razón de producción de citocinas de tipo I con respecto a producción de citocinas de tipo II que es mayor de 1. En algunos casos, la respuesta inmunitaria está caracterizada por una razón de producción de citocinas de tipo I con respecto a producción de citocinas de tipo II que es menor de 1. En algunos casos, la respuesta inmunitaria está caracterizada por una razón de producción de IFN γ con respecto a producción de IL-10 que es mayor de 1. En algunos casos, la respuesta inmunitaria está caracterizada por una razón de producción de IFN γ con respecto a producción de IL-10 que es menor de 1.

Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar composiciones mejoradas para su uso en medicina, en particular para su uso en métodos de tratamiento para cáncer y/o trastornos hiperproliferativos produciendo una respuesta inmunitaria antitumoral mediante estimulación de células T cooperadoras.

Los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar alergias, tales como, por ejemplo, alergias alimentarias (por ejemplo, alérgenos de cacahuete, tales como Ara H1, H2 y/o H3), o alérgenos ambientales, tales como, por ejemplo, polen (polen de árboles, tal como, por ejemplo, CRY J1 o CRY J2), caspa de perro, saliva de gato o ácaros del polvo. Otras enfermedades y/o trastornos que pueden tratarse usando los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, enfermedad infecciosa y diabetes.

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento. La invención también proporciona un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno para generar anticuerpos. El constructo de LAMP mejorado puede comprender un ácido nucleico en el que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión. En un aspecto preferido, el constructo de LAMP mejorado es un vector de vacuna, adecuado para vacunar a un paciente. En otro aspecto, la invención proporciona un vehículo de suministro que comprende el constructo de LAMP mejorado para facilitar la introducción de la molécula de ácido nucleico que codifica para el antígeno en una célula. El vehículo de suministro puede estar basado en lípido (por ejemplo, una formulación de liposoma), basado en virus (por ejemplo, que comprende proteínas virales que encapsulan la molécula de ácido nucleico) o basado en célula.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición inyectable que comprende un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno de interés para producir una respuesta inmunitaria (por ejemplo, generación de anticuerpos) en un mamífero frente a un antígeno. En realizaciones preferidas, esta vacuna genera una respuesta de Th1 preferible con respecto a una respuesta de Th2. Los constructos de LAMP mejorados comprenden al menos un epítipo de un antígeno.

La invención también proporciona una célula que comprende cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento que pueden usarse para generar una respuesta inmunitaria. En un aspecto, la célula es una célula presentadora de antígenos. La célula presentadora de antígenos puede ser una célula presentadora de antígenos profesional (por ejemplo, una célula dendrítica, macrófago, célula B y similares) o una célula presentadora de antígenos modificada por ingeniería (por ejemplo, una célula presentadora de antígenos no profesional modificada por ingeniería para expresar moléculas requeridas para la presentación de antígenos, tales como moléculas de la clase II del MHC). Las moléculas requeridas para la presentación de antígenos pueden derivarse de otras células, por ejemplo, que se producen de manera natural, o pueden a su vez estar modificadas por ingeniería (por ejemplo, mutarse o modificarse para expresar propiedades deseadas, tales como afinidad superior o inferior para un epítipo antigénico). En un aspecto, la célula presentadora de antígenos no expresa ninguna señal coestimulante y el antígeno es un autoantígeno.

También se da a conocer un kit que comprende una pluralidad de células que comprenden cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento. Al menos dos de las células expresan diferentes moléculas de la clase II del MHC, y cada célula comprende el mismo constructo de LAMP. En un aspecto, se proporciona un kit que comprende un constructo de LAMP mejorado y una célula para recibir el vector.

Además se da a conocer un animal transgénico comprende al menos una de las células y/o al menos uno de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento o un animal transgénico que comprende al menos una de las células descritas en el presente documento.

Los constructos de la presente invención pueden usarse en un método para generar una respuesta inmunitaria en un animal (por ejemplo, un ser humano o un vertebrado no humano) frente a un antígeno, que comprende: administrar al animal una célula tal como se describió anteriormente, en los que la célula expresa, o puede inducirse para expresar, el constructo de LAMP mejorado en el animal. En un aspecto, la célula comprende una molécula de la clase II del

MHC compatible con proteínas de MHC del animal, de tal manera que el animal no genera una respuesta inmunitaria frente a la molécula de la clase II del MHC. En un aspecto, el animal es un ser humano.

- 5 En un aspecto adicional, los constructos de la presente invención pueden usarse en un método para producir una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, que comprende administrar a un animal, tal como un ser humano o un vertebrado no humano, cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento. Preferiblemente, el constructo de LAMP mejorado es infeccioso para una célula del animal. Por ejemplo, el constructo de LAMP mejorado puede ser un vector viral, tal como un constructo de LAMP mejorado de vaccinia.
- 10 También se contemplan protocolos de sensibilización-refuerzo. Por ejemplo, la invención proporciona además el uso de los constructos en un método para generar una respuesta inmunitaria en un animal frente a un antígeno, que comprende sensibilizar el animal con un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno tal como se describe en el presente documento seguido por al menos un refuerzo del animal con el antígeno o un antígeno relacionado (por ejemplo, un segundo antígeno derivado de la misma secuencia de proteína o una altamente similar).
- 15 Pueden usarse mezclas de antígenos en cualquiera o ambas de la etapa de sensibilización y la de refuerzo. Se ha mostrado que el uso de un constructo de LAMP mejorado para la etapa de sensibilización seguido por una etapa de refuerzo de antígeno produce significativamente títulos superiores, indicando la potencia de LAMP en la potenciación de la respuesta de anticuerpos.
- 20 En un aspecto adicional, se obtiene una célula a partir de un paciente, se introduce el constructo de LAMP mejorado descrito en el presente documento en la célula y vuelve a introducirse la célula o progenie de la célula en el paciente. En un aspecto, la célula es una célula madre que puede diferenciarse para dar una célula presentadora de antígenos. Se contempla específicamente el uso en los tratamientos de pacientes humanos así como uso veterinario.
- 25 La presente invención también comprende el uso de los constructos de la invención en métodos de generación de anticuerpos en un vertebrado no humano en el que al vertebrado no humano se le inyecta un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno de interés tal como se describe en el presente documento. Entonces se presenta eficazmente el antígeno de interés al sistema inmunitario con la ayuda de LAMP en el vertebrado no humano para producir anticuerpos frente al antígeno.
- 30 Específicamente, combinando la presentación del antígeno de interés con LAMP, entonces se transporta eficazmente el antígeno a los compartimentos endosómicos/lisosómicos citoplasmáticos, en los que puede procesarse el antígeno y presentarse péptidos del mismo en la superficie celular en asociación con moléculas de la clase II de histocompatibilidad mayor (MHC).
- 35 Estos anticuerpos generados pueden aislarse a partir de la sangre del vertebrado (como anticuerpos policlonales) y después aislarse adicionalmente para generar anticuerpos monoclonales usando técnicas convencionales.
- 40 El genoma del vertebrado no humano puede comprender una región de inmunoglobulina parcialmente humana introducida, comprendiendo dicha región introducida secuencias codificantes y secuencias no codificantes de locus de región variable de inmunoglobulina humana basadas en el locus de región variable de inmunoglobulina endógena del vertebrado no humano. Preferiblemente, se retira al menos parte o la totalidad de la región de inmunoglobulina endógena del genoma del vertebrado no humano.
- 45 En algunos aspectos, la producción de anticuerpos monoclonales humanos en el vertebrado no humano requiere que el huésped tenga al menos un locus que exprese proteínas de inmunoglobulina de cadena pesada humana y un locus que exprese proteínas de inmunoglobulina de cadena ligera humana.
- 50 En algunos aspectos, el locus de locus de región variable de inmunoglobulina parcialmente humana comprende secuencias codificantes de V_H humanas y secuencias de V_H no codificantes basadas en la región de V_H endógena del vertebrado no humano. En estos aspectos, el locus de región variable de inmunoglobulina parcialmente humana comprende además secuencias codificantes de genes D y J humanos y secuencias de genes D y J no codificantes basadas en el genoma endógeno del huésped vertebrado no humano.
- 55 En otros aspectos, la región de inmunoglobulina comprende una región introducida que comprende secuencias codificantes de V_L humanas y secuencias de V_L no codificantes basadas en la región de V_L endógena del vertebrado no humano. Más preferiblemente, la región de inmunoglobulina parcialmente humana introducida que comprende secuencias codificantes de V_L humanas comprende además secuencias codificantes de gen J humano y secuencias de gen J no codificantes basadas en el genoma endógeno del huésped vertebrado no humano.
- 60 En determinados aspectos, el vertebrado es un mamífero, y preferiblemente el mamífero es un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata. En otros aspectos, el vertebrado es un ave, por ejemplo, un pollo. Otros vertebrados no humanos incluyen conejos, llamas, camellos, una vaca, una cobaya, un hámster, un perro, un gato, un caballo, un primate no humano, un simio (por ejemplo, un mono o un macaco), un mono (por ejemplo, tití, babuino, macaco rhesus), o un macaco (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón).
- 65

La región de inmunoglobulina parcialmente humana puede comprender regiones codificantes de gen de V_H humano, y comprende además i) secuencias codificantes de genes D y J humanos y ii) secuencias pre-DJ y de genes DJ no codificantes basadas en el genoma endógeno del huésped vertebrado no humano. En otros aspectos, las regiones codificantes de gen de V_H se derivan (al menos parcialmente) de otras fuentes, por ejemplo, pueden ser secuencias diseñadas de manera racional o de otra manera, secuencias que son una combinación de secuencias humanas y otras diseñadas, o secuencias de otra especie, tal como primates no humanos.

En aún otro aspecto específico, la región de inmunoglobulina parcialmente humana comprende regiones codificantes de gen de V_L humano, y comprende además i) secuencias codificantes de gen J humano y ii) secuencias de gen J no codificantes basadas en el genoma endógeno del huésped vertebrado no humano. En un aspecto específico, la región de inmunoglobulina parcialmente humana comprende regiones codificantes de V_H humanas, secuencias codificantes de genes D y J humanos, y secuencias pre-DJ y de genes D y J no codificantes basadas en el genoma endógeno del huésped vertebrado no humano.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en la producción y/u optimización de anticuerpos, incluyendo anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, para usos de diagnóstico y terapéuticos. Los hibridomas que producen tales anticuerpos también son un objeto adicional de la invención.

Estos y otros aspectos, objetivos y características se describen a continuación en más detalle.

Breve descripción de las figuras

Los objetivos y características de la invención pueden entenderse mejor con referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

La figura 1 ilustra el esquema general de diferentes tipos de constructos de LAMP mejorados (identificados como ILC-1, ILC-2, ILC-3, ILC-4, ILC-5 e ILC-6) que pueden usarse tal como se describe en el presente documento.

La figura 2A ilustra los dominios de las proteínas LAMP definidas en el presente documento mientras que la figura 2B define los límites de aminoácidos específicos de estos dominios para LAMP-1 humana (SEQ ID NO: 1), LAMP-2 humana (SEQ ID NO: 2), LAMP-3 humana (SEQ ID NO: 3), LIMP-2 humana (SEQ ID NO: 4), endolina humana (SEQ ID NO: 5), macrosailina humana (SEQ ID NO: 80), LAMP-5 humana (SEQ ID NO: 93) y LIMBIC humana (SEQ ID NO: 67). Tal como se describe en el presente documento, los dominios lumenales de LAMP, dominios de homología, dominios transmembrana, la cola citoplasmática y las secuencias señal pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados ILC-1, ILC-2, ILC-3, ILC-4, ILC-5 e ILC-6 tal como se describe en el presente documento.

La figura 3 proporciona alineación de proteínas LAMP-1 encontradas en otras especies en comparación con LAMP-1 humana (SEQ ID NO: 1). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LAMP-1 humana en las figuras 2 y la figura 3 con las alineaciones mostradas en la figura 3.

La figura 4 proporciona alineación de proteínas LAMP-2 encontradas en otras especies en comparación con LAMP-2 humana (SEQ ID NO: 2). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LAMP-2 humana en las figuras 2 y la figura 4 con las alineaciones mostradas en la figura 4.

La figura 5 proporciona alineación de proteínas LAMP-3 encontradas en otras especies en comparación con LAMP-3 humana (SEQ ID NO: 3). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LAMP-3 humana en las figuras 2 y la figura 5 con las alineaciones mostradas en la figura 5.

La figura 6 proporciona alineación de proteínas de LIMP-2 encontradas en otras especies en comparación con LIMP-2 humana (SEQ ID NO: 4). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LIMP-2 humana en las figuras 2 y la figura 6 con las alineaciones mostradas en la figura 6.

La figura 7 proporciona alineación de proteínas de LIMBIC encontradas en otras especies en comparación con LIMBIC humana (SEQ ID NO: 67). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LIMBIC humana en las figuras 2 y la figura 7 con las alineaciones mostradas en la figura 7.

La figura 8 proporciona alineación de proteínas de endolina encontradas en otras especies en comparación con endolina humana (SEQ ID NO: 5). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para endolina humana en las figuras 2 y la figura 8 con las alineaciones mostradas en la figura 8.

La figura 9 proporciona alineación de proteínas de macrosailina encontradas en otras especies en comparación con macrosailina humana (SEQ ID NO: 80). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para macrosailina humana en las figuras 2 y la figura 9 con las alineaciones mostradas en la figura 9.

La figura 10 proporciona alineación de proteínas LAMP-5 encontradas en otras especies en comparación con LAMP-5 humana (SEQ ID NO: 93). Los dominios equivalentes de estas otras especies pueden usarse para generar los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento y pueden identificarse fácilmente comparando los dominios identificados para LAMP-5 humana en las figuras 2 y la figura 10 con las alineaciones mostradas en la figura 10.

La figura 11 muestra resultados obtenidos cuando se inmunizaron ratones con HVEM-LAMP, HVEM, o LAMP en el día 0, 7 y 14. En el día 28, se extrajo sangre de los ratones y se aislaron muestras de suero. Se examinó IgG específica de HVEM mediante ELISA. Los datos representan la media geométrica de títulos de anticuerpos $\pm$ DE geométrica, n=6. ** valor de p <0,01.

La figura 12 muestra resultados obtenidos cuando se inmunizaron ratones con HVEM-LAMP, HVEM, o LAMP en el día 0, 7 y 14. En el día 35, se administró un refuerzo a los ratones con 5 μ g de proteína de HVEM en presencia de adyuvante de alumbre. Se extrajo sangre de los ratones en el día 49 y se aislaron muestras de suero. Se examinó IgG específica de HVEM mediante ELISA. Los datos representan la media geométrica de títulos de anticuerpos $\pm$ DE geométrica, n=6. *** valor de p <0,001; **** valor de p <0,0001.

La figura 13 muestra que LAMP altera la afinidad de unión de epítomos en CRD3/4 de HVEM.

La figura 14 confirma la expresión de proteína de constructos de LAMP mejorados sometidos a prueba. En cada una de las figuras 14-17, las etiquetas "constructo de LAMP completo", ILC-1, ILC-2, ILC-3 e ILC-4 corresponden a los constructos tal como se representan en la figura 1.

La figura 15 muestra que los constructos de LAMP mejorados inducen células T efectoras de Th1 que producen IFN γ .

La figura 16 muestra que un constructo de LAMP mejorado particular (por ejemplo, ILC-4 tal como se muestra en la figura 1) produjo una respuesta de células T significativamente superior frente a todas las combinaciones de péptidos de survivina.

La figura 17 muestra que las células T CD4 son la principal fuente de células productoras de IFN γ y que los constructos de LAMP mejorados demuestran un aumento de la población de células de memoria efectoras CD4 con respecto al constructo de LAMP completo.

La figura 18 muestra que los constructos de LAMP mejorados produjeron una respuesta de IgG total específica de survivina más intensa en ratones BALB/c.

La figura 19 proporciona la secuencia de aminoácidos de cada constructo de LAMP sometido a prueba. La secuencia señal de cada constructo se representa en letras minúsculas y subrayadas; la secuencia de survivina se representa en letras mayúsculas en blanco, sombreadas en negro; el dominio luminal se representa en letras en cursiva y mayúsculas y el dominio transmembrana/citosólico se representa en letras mayúsculas y sombreadas en gris, y en ILC-4, el segundo dominio de homología está en negrita. Pueden incluirse aminoácidos adicionales (LE y EF) como parte de los ligadores de clonación.

Descripción detallada

La invención proporciona constructos de LAMP mejorados y ácidos nucleicos que codifican para los mismos que pueden usarse para generar vacunas y/o usarse para producir anticuerpos. Más específicamente, la invención proporciona un constructo de LAMP que comprende dos dominios de homología de un dominio luminal de una proteína LAMP, y un dominio antigénico, en el que el dominio de antígeno está colocado entre los dos dominios de homología, y en el que el constructo de LAMP comprende además un dominio transmembrana y una cola citosólica de una proteína LAMP. Los constructos de LAMP mejorados pueden usarse para modular o potenciar una respuesta inmunitaria. En un aspecto preferido, la invención proporciona el uso de los constructos de LAMP mejorados en un método para tratar a un paciente con una alergia, enfermedad infecciosa, diabetes, cáncer o un trastorno

hiperproliferativo proporcionando un constructo de LAMP mejorado descrito en el presente documento. Los constructos de LAMP mejorados también pueden usarse para producir anticuerpos en vertebrados no humanos, y preferiblemente en mamíferos no humanos.

5 Definiciones

Se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos que se usan en la siguiente descripción escrita.

10 Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas. El término “una molécula de ácido nucleico” incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

15 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “que comprende” signifique que los constructos de LAMP mejorados y métodos incluyen los elementos mencionados, pero no excluyen otros elementos. “Consistir esencialmente en”, cuando se usa para definir constructos de LAMP mejorados y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación. Por tanto, un constructo de LAMP mejorado que consiste esencialmente en los elementos tal como se definen en el presente documento no excluirá contaminantes traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. “Consistir en” significará excluir más que elementos traza de otros componentes y etapas de método sustanciales para administrar los constructos de LAMP mejorados de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

25 El término “alrededor de” o “aproximadamente” significa dentro de un intervalo aceptable para el valor particular tal como se determina por un experto habitual en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferiblemente hasta el 10 %, más preferiblemente hasta el 5 %, y todavía más preferiblemente hasta el 1 % de un valor dado. De manera alternativa, particularmente con respecto a procesos o sistemas biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y
30 más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. A menos que se mencione lo contrario, el término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular, tal como ± 1 -20 %, preferiblemente ± 1 -10 % y más preferiblemente ± 1 -5 %.

35 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor mencionado o intermedio en ese intervalo mencionado queda abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, salvo cualquier límite específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también quedan incluidos en la
40 invención.

Tal como se usa en el presente documento, “el compartimento lisosómico/endosómico” se refiere a vacuolas ácidas unidas a membrana que contienen moléculas de LAMP en la membrana, enzimas hidrolíticas que funcionan en el procesamiento de antígenos, y moléculas de la clase II del MHC para reconocimiento y presentación de antígenos.
45 Este compartimento funciona como sitio para la degradación de materiales foráneos internalizados a partir de la superficie celular mediante cualquiera de una variedad de mecanismos incluyendo endocitosis, fagocitosis y pinocitosis, y de material intracelular suministrado a este compartimento mediante fenómenos autolíticos especializados (de Duve, Eur. J. Biochem. 137: 391, 1983). El término “endosoma” tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, abarca un lisosoma.

50 Tal como se usa en el presente documento, un “orgánulo relacionado con lisosoma” se refiere a cualquier orgánulo que comprende lisosomas e incluye, pero no se limita a, MIIC, CIIV, melanosomas, gránulos secretores, gránulos líticos, gránulos densos en plaquetas, gránulos de basófilos, gránulos de Birbeck, fagolisosomas, lisosomas secretores y similares. Preferiblemente, un orgánulo de este tipo carece de receptores de 6-fosfato de manosa y comprende
55 LAMP, pero puede comprender o no una molécula de la clase II del MHC. Para revisiones, véase, por ejemplo, Blott y Griffiths, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2002; Dell'Angelica, *et al.*, The FASEB Journal 14: 1265-1278, 2000.

60 Tal como se usan en el presente documento, los términos “polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico” se usan de manera intercambiable para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término “polinucleótido” incluye, por ejemplo, moléculas monocatenarias, bicatenarias y de triple hélice, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, moléculas antisentido, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos
65 ramificados, aptámeros, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender

moléculas de ácido nucleico modificadas (por ejemplo, que comprenden bases modificadas, azúcares y/o ligadores internucleótidos).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácido o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas mediante enlaces peptídicos o mediante otros enlaces (por ejemplo, como ésteres, éteres y similares).

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina e isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga (por ejemplo, más de aproximadamente 10 aminoácidos), el péptido se denomina habitualmente polipéptido o proteína. Aunque el término "proteína" abarca el término "polipéptido", un "polipéptido" puede ser menor que una proteína de longitud completa.

15 Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido de LAMP" se refiere a las proteínas de membrana asociadas a lisosoma de mamífero LAMP-1 humana, LAMP-2 humana, LAMP-3 humana, LAMP-2 humana, endolina humana, LIMBIC humana, LAMP-5 humana o macrosailina humana tal como se describe en el presente documento, así como ortólogos (tales como, por ejemplo, las proteínas LAMP mostradas en las figuras 3-10) y variantes alélicas.

20 Tal como se usa en el presente documento, "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se transcriben polinucleótidos para dar ARNm y/o se traducen para dar péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm transcrito a partir del ADN genómico.

25 Tal como se usa en el presente documento, "bajo control transcripcional" u "operativamente unido" se refiere a la expresión (por ejemplo, transcripción o traducción) de una secuencia de polinucleótido que se controla mediante una juxtaposición apropiada de un elemento de control de la expresión y una secuencia codificante. En un aspecto, una secuencia de ADN está "operativamente unida" a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción de esa secuencia de ADN.

30 Tal como se usa en el presente documento, "secuencia codificante" es una secuencia que se transcribe y traduce para dar un polipéptido cuando se coloca bajo el control de secuencias de control de la expresión apropiadas. Los límites de una secuencia codificante se determinan mediante un codón de iniciación en el extremo 5'-terminal (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'-terminal (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, una secuencia procariota, ADNc a partir de ARNm eucariota, una secuencia de ADN genómico a partir de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción estarán habitualmente ubicadas en 3' con respecto a la secuencia codificante.

40 Tal como se usa en el presente documento, dos secuencias codificantes "corresponden" una a la otra si las secuencias o sus secuencias complementarias codifican para las mismas secuencias de aminoácidos.

45 Tal como se usa en el presente documento, "secuencia señal" designa la secuencia de translocación al retículo endoplasmático. Esta secuencia codifica para un péptido señal que se comunica a una célula para dirigir un polipéptido al que está unido (por ejemplo, mediante un enlace químico) a un compartimento vesicular del retículo endoplasmático, para entrar en un orgánulo exocítico/endocítico, para suministrarse a cualquiera de un compartimento vesicular celular, la superficie celular o para secretar el polipéptido. Esta secuencia señal se corta algunas veces por la célula en la maduración de una proteína. Pueden encontrarse secuencias señal asociadas con una variedad de proteínas nativas para procariotas y eucariotas.

50 Tal como se usa en el presente documento, "tráfico" designa el movimiento o la progresión del polipéptido codificado por el constructo de LAMP mejorado a través de orgánulos o compartimentos celulares en el trayecto desde el retículo endoplasmático rugoso hasta el compartimento endosómico/lisosómico u orgánulos relacionados en los que se produce el procesamiento de antígeno y unión a MHC II.

55 Tal como se usa en el presente documento, un "constructo de LAMP mejorado" y un "constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno" y un "constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno de interés" se usan de manera intercambiable. Las diferentes disposiciones de los constructos de LAMP mejorados se ilustran en la figura 1 como ILC1-ILC6. Además, el uso de un "constructo de LAMP mejorado" abarca tanto la secuencia de polinucleótido del constructo de LAMP mejorado así como la proteína codificada por la secuencia de polinucleótido del constructo de LAMP mejorado.

60 Tal como se usa en el presente documento, un "vehículo de suministro de constructo de LAMP mejorado" se define como cualquier molécula o grupo de moléculas o macromoléculas que pueden transportar un constructo de LAMP mejorado al interior de una célula huésped (por ejemplo, tal como genes o fragmentos génicos, moléculas antisentido, ribozimas, aptámeros y similares) y que se produce en asociación con un constructo de LAMP mejorado tal como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “suministro de constructo de LAMP mejorado”, o “transferencia de constructo de LAMP mejorado”, se refiere a la introducción del constructo de LAMP mejorado en una célula huésped, independientemente del método usado para la introducción. Los constructos de LAMP mejorados introducidos pueden mantenerse de manera estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable requiere normalmente que el constructo de LAMP mejorado introducido o bien contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o bien se integre en un replicón de la célula huésped tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial.

Tal como se usa en el presente documento, un “constructo de LAMP mejorado viral” se refiere a un virus o partícula viral que comprende el constructo de LAMP mejorado que va a suministrarse al interior de una célula huésped, ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de constructos de LAMP mejorados virales incluyen, pero no se limitan a, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares. En aspectos en los que la transferencia génica está mediada por un vector adenoviral, un constructo de LAMP mejorado incluye el genoma de adenovirus o parte del mismo, y un gen no adenoviral seleccionado, en asociación con proteínas de la cápside adenoviral.

Tal como se usa en el presente documento, “transferencia génica mediada por adenovirus” o “transducción adenoviral” se refiere al proceso mediante el cual un constructo de LAMP mejorado se transfiere al interior de una célula huésped gracias la entrada del adenovirus en la célula. Preferiblemente, el constructo de LAMP mejorado puede replicarse y/o integrarse y transcribirse dentro de la célula.

Tal como se usa en el presente documento, “partículas de adenovirus” son viriones de adenovirus individuales compuestos por una cápside externa y un constructo de LAMP mejorado, en las que la cápside está compuesta además por proteínas de la envuelta de adenovirus. Las proteínas de la envuelta de adenovirus pueden modificarse para comprender un polipéptido de fusión que contiene un ligando polipeptídico unido de manera covalente a la proteína viral, por ejemplo, para dirigir la partícula adenoviral a un tipo particular de célula y/o tejido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “administrar” o “inmunizar” o “inyectar” un constructo de LAMP mejorado se refiere a transducir, transfectar, microinyectar, introducir por electroporación o administrar a la célula el constructo de LAMP mejorado. En algunos aspectos, se introducen constructos de LAMP mejorados en una célula diana poniendo en contacto la célula diana con una célula de suministro (por ejemplo, mediante fusión celular o mediante lisis de la célula de suministro cuando está en proximidad a la célula diana).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “sensibilización-refuerzo” describe el uso de un constructo de LAMP mejorado descrito en el presente documento usado para sensibilizar una respuesta de células T seguido por el uso de un segundo constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno, una vacuna de ADN que comprende un antígeno o un antígeno recombinante para reforzar la respuesta. Estas inmunizaciones de sensibilización-refuerzo heterólogas producen respuestas inmunitarias de mayor altura y amplitud de lo que puede lograrse mediante sensibilización y refuerzo con el mismo vector. La sensibilización con un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno inicia células de memoria; la etapa de refuerzo expande la respuesta de memoria. Preferiblemente, el uso de los dos agentes diferentes no produce respuestas uno frente al otro y, por tanto, no interfieren en la actividad uno del otro. Se contemplan específicamente mezclas de antígenos en la etapa de sensibilización y/o refuerzo. El refuerzo puede producirse una o múltiples veces.

Tal como se usa en el presente documento, “hibridación” se refiere a una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótido. La formación de enlaces de hidrógeno puede producirse mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen, o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos cadenas que forman una estructura de dúplex, tres o más cadenas que forman un complejo de múltiples cadenas, una única cadena que se hibrida consigo misma, o cualquier combinación de los mismos. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un proceso más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido por una ribozima.

Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región de polipéptido) que tiene un determinado porcentaje (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 99 %) de “identidad de secuencia” con respecto a otra secuencia significa que, cuando se alinean al máximo, usando programas de software rutinarios en la técnica, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias.

Dos secuencias son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, y preferiblemente al menos aproximadamente el 80 %, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o el 95 % de los nucleótidos coinciden a lo largo de la longitud definida de las secuencias de ADN. De manera

similar, dos secuencias de polipéptido son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 66 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, y preferiblemente al menos aproximadamente el 80 %, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o el 95 % de los residuos de aminoácido del polipéptido coinciden a lo largo de una longitud definida de la secuencia de polipéptido. Pueden identificarse secuencias que son sustancialmente homólogas comparando las secuencias usando software convencional disponible en bancos de datos de secuencias. También pueden identificarse secuencias de ácido nucleico sustancialmente homólogas en un experimento de hibridación de tipo Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas tal como se definen para ese sistema particular. Definir condiciones de hibridación apropiadas se encuentra dentro de las habilidades de la técnica. Por ejemplo, condiciones rigurosas pueden ser: hibridación a 5xSSC y formamida al 50 % a 42°C, y lavado a 0,1xSSC y dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 60°C. Ejemplos adicionales de condiciones de hibridación rigurosas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 25 grados C a aproximadamente 37 grados C; concentraciones de tampón de hibridación de aproximadamente 6xSSC a aproximadamente 10xSSC; concentraciones de formamida de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 25 %; y disoluciones de lavado de aproximadamente 6xSSC. Ejemplos de condiciones de hibridación moderadas incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 40 grados C a aproximadamente 50 grados C; concentraciones de tampón de aproximadamente 9xSSC a aproximadamente 2xSSC; concentraciones de formamida de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %; y disoluciones de lavado de aproximadamente 5xSSC a aproximadamente 2xSSC. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen: temperaturas de incubación de aproximadamente 55 grados C a aproximadamente 68 grados C; concentraciones de tampón de aproximadamente 1xSSC a aproximadamente 0,1xSSC; concentraciones de formamida de aproximadamente el 55 % a aproximadamente el 75 %; y disoluciones de lavado de aproximadamente 1xSSC, 0,1xSSC o agua desionizada. En general, los tiempos de incubación de hibridación son de desde 5 minutos hasta 24 horas, con 1, 2 o más etapas de lavado, y los tiempos de incubación de lavado son de aproximadamente 1, 2 o 15 minutos. SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM. Se entiende que pueden emplearse equivalentes de SSC usando otros sistemas de tampón. Puede verificarse la similitud mediante secuenciación, pero preferiblemente se verifica, además o alternativamente, mediante función (por ejemplo, capacidad para realizar el tráfico a un compartimento endosómico y similar), usando ensayos adecuados para el dominio particular en cuestión.

Los términos “porcentaje (%) de similitud de secuencia”, “porcentaje (%) de identidad de secuencia” y similares, se refieren de manera general al grado de identidad o correspondencia entre diferentes secuencias de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de polipéptidos que pueden o no compartir un origen de evolución común (véase Reeck *et al.*, citado anteriormente). La identidad de secuencia puede determinarse usando cualquiera de varios algoritmos de comparación de secuencias disponibles para el público, tales como BLAST, FASTA, DNA Strider, GCG (Genetics Computer Group, manual de programa para el paquete GCG, versión 7, Madison, Wisconsin), etc.

Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o dos moléculas de ácido nucleico, se alinean las secuencias con fines de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen, o tienen aproximadamente, la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas a continuación, con o sin permitir huecos. Al calcular el porcentaje de identidad de secuencia, normalmente se cuentan las coincidencias exactas.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 2264, modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 1990; 215: 403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos de BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a secuencias de la invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas de BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a secuencias de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda con iteraciones que detecta una relación distante entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997), citado anteriormente. Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ en Internet.

Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Un algoritmo de este tipo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias de GCG. Cuando se usa el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco 12, y una penalización por hueco de 4.

En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el

algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 444-453), que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (Accelrys, Burlington, MA; disponible en accelrys.com en Internet), usando o bien una matriz Blossum 62 o bien una matriz PAM250, un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En aún otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP, un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto particularmente preferido de parámetros (y el que puede usarse si el profesional no está seguro sobre qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula es una limitación de identidad de secuencia u homología de la invención) es usar una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por apertura de hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4, y una penalización por hueco con desplazamiento de marco de 5.

Otro ejemplo no limitativo de cómo puede determinarse el porcentaje de identidad es usando programas de software tales como los descritos en Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987), suplemento 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1. Preferiblemente, se usan parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, usando parámetros por defecto. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; previsto = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificar por = ALTA PUNTUACIÓN; bases de datos = no redundantes, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS Translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Pueden encontrarse detalles de estos programas en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>.

El análisis estadístico de las propiedades descritas en el presente documento puede llevarse a cabo mediante pruebas convencionales, por ejemplo, pruebas de la t, ANOVA o pruebas de la Chi cuadrado. Normalmente, la significación estadística se medirá hasta un nivel de $p=0,05$ (5 %), más preferiblemente $p=0,01$, $p=0,001$, $p=0,0001$, $p=0,00001$.

También pueden proporcionarse "variantes modificadas de manera conservativa" de secuencias de dominio. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a los ácidos nucleicos que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica para una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Específicamente, pueden lograrse sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos ellos) está sustituida por residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer, *et al.*, 1991, Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka, *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; Rossolini *et al.*, 1994, Mol. Cell. Probes 8: 91-98).

El término "fragmento biológicamente activo", "forma biológicamente activa", "equivalente biológicamente activo" de y "derivado funcional" de una proteína de tipo natural, presenta una actividad biológica que es al menos sustancialmente igual (por ejemplo, no significativamente diferente de) la actividad biológica de la proteína de tipo natural tal como se mide usando un ensayo adecuado para detectar la actividad.

Tal como se usa en el presente documento, suministro de ácido nucleico "*in vivo*", transferencia de ácido nucleico, terapia con ácido nucleico y similares, se refieren a la introducción de un constructo de LAMP mejorado directamente en el cuerpo de un organismo, tal como un ser humano o mamífero no humano, mediante lo cual el constructo de LAMP mejorado se introduce en una célula de tal organismo *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*in situ*" se refiere a un tipo de suministro de ácido nucleico *in vivo* en el que el constructo de LAMP mejorado se pone en estrecha proximidad con una célula diana (por ejemplo, el ácido nucleico no se administra de manera sistémica). Por ejemplo, los métodos de suministro *in situ* incluyen, pero no se limitan a, inyectar un constructo de LAMP mejorado directamente en un sitio (por ejemplo, en un tejido, tal como un tumor o músculo cardíaco), poner en contacto el constructo de LAMP mejorado con célula(s) o tejido mediante un campo quirúrgico abierto, o suministrar los constructos de LAMP mejorados a un sitio usando un dispositivo de acceso médico tal como un catéter.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" o "purificado" significa separado (o sustancialmente libre) de constituyentes, celular y otros, con los que está normalmente asociado en la naturaleza el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, con respecto a un constructo de LAMP mejorado, un polinucleótido aislado es uno que está separado de las secuencias en 5' y 3' con las que está normalmente asociado en el cromosoma. Tal como resulta evidente para los expertos en la técnica, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos que no se produce de manera natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su homólogo que se produce de manera natural. Por sustancialmente libre o sustancialmente purificado, quiere decirse que al menos el 50 % de la población, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 % e incluso más preferiblemente al menos el 90 %, están libres de los componentes con los que están asociados en la naturaleza.

Tal como se usa en el presente documento, una "célula diana" o "célula receptora" se refiere a una célula individual o célula que se desea que sea, o que ha sido, receptora de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento. También se pretende que el término incluya la progenie de una célula individual, y la progenie puede no

ser necesariamente idéntica completamente (en cuanto a morfología o en cuanto a complemento de ADN genómico o total) a la célula original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula diana puede estar en contacto con otras células (por ejemplo, como en un tejido) o puede encontrarse circulando dentro del cuerpo de un organismo.

5 Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deportes, y mascotas. En otras realizaciones preferidas, el "sujeto" es un roedor (por ejemplo, una rata, un ratón, un conejo, una llama, camellos, una vaca, una cobaya, un hámster, un perro, un gato, un caballo, un primate no humano, un simio (por ejemplo, un mono o un macaco), un mono (por ejemplo, tití, babuino, macaco rhesus), o un macaco (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón). En otras realizaciones, pueden emplearse mamíferos no humanos, especialmente mamíferos que se usan convencionalmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, animales murinos, primates, porcinos, caninos o conejos).

15 Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor", se usan de manera intercambiable y en forma o bien singular o bien en plural, se refieren a células que han experimentado una transformación maligna que hace que sean patológicas para el organismo huésped. Una transformación de células cancerosas primarias hace que sean patológicas para el organismo huésped. Las células cancerosas primarias (es decir, células obtenidas de cerca del sitio de transformación maligna) pueden distinguirse fácilmente de células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, particularmente examen histológico. La definición de una célula cancerosa, tal como se usa en el presente documento, incluye no sólo una célula cancerosa primaria, sino cualquier célula derivada de un ancestro de célula cancerosa. Esto incluye células cancerosas metastatizadas, y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de células cancerosas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es uno que puede detectarse basándose en la masa tumoral, por ejemplo, mediante procedimientos tales como TAC, obtención de imágenes por RM, radiografía, ecografía o palpación, y/o que puede detectarse debido a la expresión de uno o más antígenos específicos de cáncer en una muestra que puede obtenerse de un paciente.

30 En realizaciones preferidas, el cáncer (incluyendo todos los estadios de progresión, incluyendo hiperplasia) es un adenocarcinoma, sarcoma, cáncer de piel, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo, pero sin limitarse a, NSCLC, SCLC, cáncer de células escamosas), cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer oral, cáncer de glándula salivar, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer de riñón, mieloma múltiple o cáncer cerebral.

40 Los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento también pueden usarse para tratar alergias, tales como, por ejemplo, alergias alimentarias (por ejemplo, alérgenos de cacahuete, tales como Ara H1, H2 y/o H3), o alérgenos ambientales, tales como, por ejemplo, polen (polen de árboles, tal como, por ejemplo, CRY J1 o CRY J2), caspa de perro, saliva de gato o ácaros del polvo. Otras enfermedades y/o trastornos incluyen, por ejemplo, enfermedad infecciosa y diabetes.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones que comprenden los constructos de LAMP mejorados también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes, véase Martin Remington's Pharm. Sci., 15^a ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

50 Una célula se ha "transformado", "transducido" o "transfectado" por los constructos de LAMP mejorados cuando tales ácidos nucleicos se han introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede estar integrado (unido covalentemente) o no con ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En procariotas, levadura y células de mamífero, por ejemplo, los constructos de LAMP mejorados pueden mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. En una célula eucariota, una célula transformada de manera estable es una en la que los constructos de LAMP mejorados se han integrado en un cromosoma de modo que se hereda por células hijas mediante replicación de cromosoma. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos por una población de células hijas que contienen los constructos de LAMP mejorados. Un "clon" es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común mediante mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que puede crecer de manera estable *in vitro* durante muchas generaciones (por ejemplo, al menos aproximadamente 10).

65 Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, tales como una cantidad eficaz de transferencia y/o expresión del constructo de LAMP mejorado, y/o lograr un criterio de valoración terapéutico deseado. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. En un aspecto, una cantidad eficaz de un constructo de LAMP mejorado es una cantidad suficiente para transformar/transducir/transfectar al menos una célula en una

población de células que comprende al menos dos células.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para querer decir una cantidad suficiente para prevenir, corregir y/o normalizar una respuesta fisiológica anómala. En un aspecto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para reducir en al menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferiblemente en al menos el 50 por ciento, lo más preferiblemente en al menos el 90 por ciento, una característica clínicamente significativa de patología, tal como, por ejemplo, respuesta alérgica, tamaño de una masa tumoral, producción de anticuerpos, producción de citocinas, fiebre o recuento de glóbulos blancos, etc.

Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un antígeno específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Un "sitio de combinación de anticuerpo" es la porción estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por regiones variable e hipervariable de cadena pesada y ligera que se une específicamente a antígeno. Moléculas de anticuerpo a modo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo las porciones Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), prefiriéndose estas porciones para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Por tanto, el término anticuerpo abarca no sólo moléculas de anticuerpo enteras, sino también fragmentos de anticuerpo así como variantes (incluyendo derivados tales como proteínas de fusión) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos de moléculas que se describen mediante el término "anticuerpo" en esta solicitud incluyen, pero no se limitan a: Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fv unidos por enlaces disulfuro (sdFv), Fv, y fragmentos que comprenden o consisten alternativamente en, un dominio o bien V_L o bien V_H. El término "Fv de cadena sencilla" o "scFv" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende un dominio V_L de un anticuerpo unido a un dominio V_H de un anticuerpo. Véase Carter (2006) Nature Rev. Immunol. 6: 243.

Adicionalmente, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos, biespecíficos, humanos, humanizados, de ratón o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de camélido, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id frente a anticuerpos de la invención), anticuerpos frente a dominio y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Lo más preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos. Tal como se usan en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas y ratones de tipo Xenomouse u otros organismos que se han modificado por ingeniería genética para producir anticuerpos humanos. Los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con técnicas conocidas para generar anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos tal como se describe en los protocolos mostrados a modo de ejemplo, véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; patente europea n.º 0 598 877; patentes estadounidenses n.ºs 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598; y Lonberg y Huszar, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Pueden producirse anticuerpos humanos o anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados" usando los constructos de LAMP mejorados en combinación con técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos convencionales para producir anticuerpos quiméricos. Véase, para revisión, las siguientes referencias: Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Taniguchi *et al.*, documento EP 171496; Morrison *et al.*, documento EP 173494; Neuberger *et al.*, documento WO 8601533; Robinson *et al.*, documento WO 8702671; Boulianne *et al.*, Nature 312: 643 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314: 268 (1985).

Los anticuerpos pueden ser monovalentes, bivalentes, trivalentes o multivalentes. Por ejemplo, pueden multimerizarse scFv monovalentes o bien químicamente o bien mediante asociación con otra proteína o sustancia. Un scFv que está fusionado a una etiqueta de hexahistidina o una etiqueta Flag puede multimerizarse usando Ni-NTA agarosa (Qiagen) o usando anticuerpos anti-Flag (Stratagene, Inc.). Adicionalmente, los constructos de LAMP mejorados pueden usarse para generar compuestos monoespecíficos, biespecíficos, trispecíficos o de especificidad múltiple mayor para el/los antígeno(s) codificado(s) contenido(s) en el constructo de LAMP mejorado. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, J. Immunol. 147: 60-69 (1991); patentes estadounidenses n.ºs 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

Un "epítipo" es una estructura, habitualmente compuesta por una secuencia peptídica corta u oligosacárido, que se reconoce específicamente o se une específicamente a un componente del sistema inmunitario. Generalmente se ha mostrado que los epítipos de células T son oligopéptidos lineales. Dos epítipos corresponden uno a otro si pueden

unirse específicamente al mismo anticuerpo. Dos epítomos corresponden uno a otro si ambos pueden unirse al mismo receptor de células B o al mismo receptor de células T, y la unión de un anticuerpo a su epítopo previene sustancialmente la unión al otro epítopo (por ejemplo, se une menos de aproximadamente el 30 %, preferiblemente menos de aproximadamente el 20 %, y más preferiblemente menos de aproximadamente el 10 %, el 5 %, el 1 % o aproximadamente el 0,1 % del otro epítopo). En la presente invención, múltiples epítomos pueden constituir un antígeno.

El término “antígeno” o “antígeno de interés” tal como se usa en el presente documento cubre cualquier secuencia de polipéptido codificada por una secuencia de polinucleótido clonada en el constructo de LAMP mejorado que se usa para provocar una respuesta inmunitaria innata o adaptativa. Un “antígeno” abarca tanto un antígeno individual así como múltiples secuencias antigénicas (derivadas de la misma proteína o de proteínas diferentes) clonadas en el constructo de LAMP mejorado.

El término “célula presentadora de antígenos” tal como se usa en el presente documento incluye cualquier célula que presenta en su superficie un antígeno en asociación con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad, o porción de la misma, o, alternativamente, una o más moléculas de MHC no clásicas, o una porción de las mismas. A continuación se comentan en detalle ejemplos de APC adecuadas e incluyen, pero no se limitan a, células enteras tales como macrófagos, células dendríticas, células B, APC híbridas y células presentadoras de antígenos de acogida.

Tal como se usa en el presente documento una “célula presentadora de antígenos modificada por ingeniería” se refiere a una célula presentadora de antígenos que tiene un resto molecular no natural en su superficie. Por ejemplo, una célula de este tipo puede no tener de manera natural un coestimulante en su superficie o puede tener un coestimulante artificial adicional además de un coestimulante natural en su superficie, o puede expresar una molécula de la clase II no natural en su superficie. En realizaciones preferidas, la célula presentadora de antígenos modificada por ingeniería tiene el antígeno expresado a partir del constructo de LAMP mejorado en su superficie.

Tal como se usa en el presente documento, “células efectoras inmunitarias” se refiere a células que pueden unirse a antígeno y que median en una respuesta inmunitaria. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células T, células B, monocitos, macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos (CTL), por ejemplo líneas de CTL, clones de CTL y CTL de tumor, inflamatorios u otros infiltrados.

Tal como se usa en el presente documento, “parcialmente humano” se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias tanto de un ser humano como de un vertebrado no humano. En el contexto de secuencias parcialmente humanas, los ácidos nucleicos parcialmente humanos tienen secuencias de regiones que codifican para inmunoglobulina humana y secuencias basadas en las secuencias no codificantes de la región de inmunoglobulina endógena del vertebrado no humano. El término “basado en” cuando se usa con referencia a secuencias no codificantes endógenas de un vertebrado no humano se refiere a secuencias que corresponden a la secuencia no codificante y comparten un grado relativamente alto de homología con las secuencias no codificantes de los loci endógenos del vertebrado huésped, por ejemplo, el vertebrado no humano del que se deriva la célula ES. Preferiblemente, las secuencias no codificantes comparten al menos el 80 %, más preferiblemente el 90 % de homología con las secuencias no codificantes correspondientes encontradas en los loci endógenos de la célula huésped de vertebrado no humano en la que se ha introducido una molécula parcialmente humana que comprende las secuencias no codificantes.

El término “región variable de inmunoglobulina” tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica para la totalidad o una porción de una región variable de una molécula de anticuerpo o la totalidad o una porción de una secuencia de nucleótidos reguladora que controla la expresión de una molécula de anticuerpo. Las regiones de inmunoglobulina para cadenas pesadas pueden incluir, pero no se limitan a, la totalidad o una porción de las regiones V, D, J y de cambio, incluyendo intrones. La región de inmunoglobulina para cadenas ligeras puede incluir, pero no se limita a, las regiones V y J, sus secuencias flanqueantes en sentido de 5', intrones, asociadas con el, o adyacentes al, gen de región constante de cadena ligera.

Por “animal transgénico” quiere decirse un animal no humano, habitualmente un mamífero, que tiene una secuencia de ácido nucleico exógena presente como elemento extracromosómico en una porción de sus células o integrarse de manera estable en su ADN de línea germinal (es decir, en la secuencia genómica de la mayor parte o la totalidad de sus células). Al generar un animal transgénico que comprende secuencias humanas, se introduce un ácido nucleico parcialmente humano en la línea germinal de tales animales transgénicos mediante manipulación genética, por ejemplo, de embriones o células madre embrionarias del animal huésped según métodos bien conocidos en la técnica.

Un “vector” incluye plásmidos y virus y cualquier molécula de ADN o ARN, ya sea autorreplicante o no, que puede usarse para transformar o transfectar una célula.

Tal como se usa en el presente documento, una “modificación genética” se refiere a cualquier adición, delección o alteración de los nucleótidos normales de una célula. Los métodos reconocidos en la técnica incluyen transferencia génica mediada por virus, transferencia mediada por liposoma, transformación, transfección y transducción, por ejemplo, transferencia génica mediada por virus tal como el uso de los constructos de LAMP mejorados basándose en virus de ADN tales como adenovirus, virus adenoasociado y virus del herpes, así como vectores basados en

retrovirus.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas de biología molecular convencional, microbiología y ADN recombinante dentro de las habilidades de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D. N. Glover, ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Constructos de LAMP

LAMP-1, tal como se deduce a partir de un clon de ADNc (Chen, *et al.*, J. Biol. Chem. 263: 8754, 1988), consiste en un núcleo de polipéptido de aproximadamente 382 aminoácidos con un dominio amino-terminal luminal grande (346 residuos) seguido por una región transmembrana hidrófoba de 24 residuos y una cola citoplasmática carboxilo-terminal corta (12 residuos). Véanse las figuras 2A y 2B. El dominio luminal está altamente glicosilado, estando sustituido con aproximadamente 20 oligosacáridos de tipo complejo unidos con asparagina y consiste en dos "dominios de homología" de aproximadamente 160 residuos que están separados por una región bisagra rica en prolina/serina. Cada uno de estos "dominios de homología" contiene 4 residuos de cisteína separados de manera uniforme, unidos por enlaces disulfuro para formar cuatro bucles de 36-38 residuos colocados de manera simétrica dentro de las dos mitades del dominio luminal (Arterburn, *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 7419, 1990; véase también Chen, *et al.*, J. Biol. Chem. 25: 263(18): 8754-8, 1988). La figura 2A muestra esquemáticamente los dominios conservados entre LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3, endolina, LIMBIC, LAMP5 o macrosailina.

Constructos de LAMP anteriormente notificados comprenden los siguientes elementos en esta disposición específica:

(a) un dominio luminal completo de proteína LAMP-1, el antígeno y después la cola transmembrana/citoplasmática completa de proteína LAMP-1; o

(b) el antígeno y la cola transmembrana/citoplasmática completa de una proteína LAMP-1. En el ejemplo (a), la secuencia antigénica se inserta entre el dominio luminal completo de una proteína LAMP-1 y el dominio transmembrana/cola citoplasmática completo de LAMP-1. Se ha mostrado que ambos constructos dirigen satisfactoriamente una secuencia antigénica al lisosoma/endosoma y se denominarán "constructos de LAMP completos" tal como se muestra en la figura 1 en comparación con los constructos de LAMP mejorados ILC4 descritos en el presente documento (sirviendo ILC1 a ILC3, ILC5 e ILC6 como ejemplos de referencia). Los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento no incluyen los constructos de LAMP completos descritos en la técnica anterior.

Aunque se ha notificado ampliamente en la bibliografía que fragmentos menores que el dominio luminal completo de LAMP-1 no eran eficaces para generar una respuesta inmunitaria robusta (véase, por ejemplo, Godinho *et al.*), los inventores descubrieron inesperadamente que fragmentos específicos, en determinadas disposiciones, presentaban eficazmente de hecho antígenos al sistema inmunitario, generando una respuesta inmunitaria robusta, incluyendo la generación de un repertorio diferente de anticuerpos. Por ejemplo, los inventores han identificado que el fragmento de dominio luminal de LAMP mínimo que es eficaz para generar una respuesta inmunitaria robusta no es el dominio luminal completo (tal como se notifica ampliamente en la bibliografía) sino más bien un único dominio de homología del dominio luminal de una proteína LAMP.

Por ejemplo, los constructos pueden comprender, no el dominio luminal completo, sino en su lugar un único dominio de homología del dominio luminal de una proteína LAMP. Tal como se usa en el presente documento, el "dominio de homología" comprende al menos los 4 residuos de cisteína separados de manera uniforme mostrados en las figuras 3-10. Estos residuos de cisteína están marcados 1, 2, 3 y 4 (y en LAMP-2 y macrosailina se identifican cinco cisteínas, en LIMBIC se identifican seis cisteínas, y en endolina se identifican ocho cisteínas) en cada dominio de homología tal como se muestra en las figuras 3-10 y se definen en el presente documento como "fragmento conservado de cisteínas". Pueden incluirse aminoácidos adicionales en cualquiera del extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal del fragmento conservado de cisteínas para generar hasta e incluyendo un dominio de homología completo de una proteína LAMP. Estos aminoácidos añadidos adicionales pueden derivarse del dominio de homología del que se deriva el fragmento conservado de cisteínas o de otros dominios de homología de proteína LAMP. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, un dominio de homología de LAMP comprende y/o consiste en un fragmento conservado de cisteínas. Al menos dos dominios de homología de LAMP constituyen el dominio luminal de LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3 o endolina.

Específicamente, el constructo de LAMP mejorado comprende al menos un antígeno de interés fusionado entre un primer dominio de homología de una proteína LAMP y un segundo dominio de homología de una proteína LAMP (o al

menos entre dos fragmentos conservados de cisteínas). Véase, por ejemplo, ILC-4 de la figura 1. Estos constructos también comprenden un dominio transmembrana de una proteína LAMP, y la cola citosólica de una proteína LAMP. En realizaciones preferidas, los dos dominios de homología se derivan de LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3 o una proteína endolina. En estos constructos, el antígeno puede estar colocado en la región bisagra de LAMP. Alternativamente, pueden usarse dos dominios de homología de dos proteínas LAMP diferentes. Esta disposición de al menos un antígeno de interés fusionado entre dos dominios de homología de LAMP (incluyendo fragmentos conservados de cisteínas) es inesperada a la vista de la técnica anterior tal como se describió anteriormente.

Cada uno de los constructos de LAMP mejorados definidos anteriormente puede generarse usando los dominios definidos en las figuras. Por ejemplo, se contempla específicamente que los dominios incluidos en el constructo de LAMP mejorado ilustrado en la figura 1, por ejemplo, pueden originarse a partir de secuencias derivadas de secuencias ortólogas. Véanse las figuras 3-10, por ejemplo. Se contempla expresamente que los dominios equivalentes definidos en las figuras 2A y 2B se usen para generar los constructos de LAMP mejorados ilustrados en la figura 1 para secuencias ortólogas. Además, las secuencias ortólogas mostradas en las figuras 3-10 son representativas de las secuencias que pueden usarse para generar los dominios. Se encuentra dentro de las habilidades de la técnica identificar otras secuencias ortólogas y/o isotipos y compararlas con las alineaciones mostradas en las figuras 3-10. Por tanto, identificando los límites equivalentes definidos en las figuras 2A y 2B para una proteína LAMP humana con las alineaciones mostradas en las figuras 3-10, pueden generarse los constructos de LAMP mejorados según la presente invención.

Tal como entenderá el experto en la técnica, los límites de cada dominio son una aproximación y pueden ajustarse al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos basándose en consideraciones de clonación y colocación de enzimas de restricción. Por tanto, cuando se incluye un dominio particular (por ejemplo, un dominio de homología de LAMP) en el constructo de LAMP mejorado, los aminoácidos que empiezan y terminan el dominio pueden ajustarse en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos como los límites definidos en la figura 2B.

Los constructos de LAMP mejorados descritos anteriormente pueden comprender adicionalmente una secuencia señal y/o aminoácidos adicionales entre cada dominio con fines de clonación tal como se conoce en la técnica. Adicionalmente, los dominios homólogos de LAMP, el dominio luminal de LAMP, el dominio transmembrana de LAMP y/o el dominio de cola citosólica de LAMP pueden originarse de la misma proteína LAMP (por ejemplo, LAMP-1 humana) o diferentes proteínas LAMP (por ejemplo, dominio luminal de LAMP-1 humana y dominio transmembrana de LAMP-2 humana, y/o mezcla de dominios ortólogos en la misma familia de genes (por ejemplo, LAMP-1) o diferentes familias de genes (LAMP-1 y LAMP-2).

Se contemplan variantes de polipéptidos de los constructos de LAMP descritos. Por ejemplo, polipéptidos con al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad con respecto a cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento así como polinucleótidos que codifican para estas variantes. Las variantes de los constructos de LAMP mejorados conservan la capacidad de funcionar dirigiendo la secuencia antigénica al lisosoma. Por ejemplo, una secuencia luminal modificada debe conservar la capacidad de tráfico de materiales antigénicos tanto de membrana como no de membrana a un compartimento endosómico con al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 100 % de eficacia en comparación con la secuencia de dominio original, es decir, una eficacia que da como resultado una presentación de antígenos suficiente por una célula que comprende la secuencia quimérica para montar una respuesta inmunitaria. En un aspecto, pueden identificarse secuencias que contienen una señal de tráfico adecuada construyendo un constructo de LAMP mejorado que contiene el dominio antigénico bien caracterizado de ovoalbúmina, un dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de una proteína que contiene una supuesta señal de direccionamiento lisosómica/endosómica. La eficiencia de direccionamiento puede medirse determinando la capacidad de células presentadoras de antígenos, que expresan el constructo de LAMP mejorado, para estimular células T específicas de epítipo de HA, restringidas a clase II de MHC (véase, por ejemplo, el ejemplo 5 de la patente estadounidense n.º 5.633.234).

Los polinucleótidos que codifican para cualquiera de los constructos de LAMP mejorados descritos son realizaciones preferidas de la invención, junto con polinucleótidos con al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de identidad con respecto a cualquiera de los polinucleótidos de constructo de LAMP mejorado descritos en el presente documento. Variantes de los constructos de LAMP mejorados conservan la capacidad para funcionar dirigiendo la secuencia antigénica al lisosoma. Por ejemplo, una secuencia luminal modificada debe conservar la capacidad de tráfico de materiales antigénicos tanto de membrana como no de membrana a un compartimento endosómico con al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 100 % de eficacia en comparación con la secuencia de dominio original, es decir, una eficacia que da como resultado una presentación de antígenos suficiente por una célula que comprende la secuencia quimérica para montar una respuesta inmunitaria. En un aspecto, pueden identificarse secuencias que contienen una señal de tráfico adecuada

construyendo un constructo de LAMP mejorado que contiene el dominio antigénico bien caracterizado de ovoalbúmina, un dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de una proteína que contiene una supuesta señal de direccionamiento lisosómica/endosómica. La eficiencia de direccionamiento puede medirse determinando la capacidad de células presentadoras de antígenos, que expresan el constructo de LAMP mejorado, para estimular células T específicas de epítipo de HA, restringidas a clase II de MHC (véase, por ejemplo, el ejemplo 5 de la patente estadounidense n.º 5.633.234).

Ensamblaje de secuencias que codifican para constructos de LAMP mejorados

En la técnica se conocen procedimientos para construir constructos de LAMP mejorados que comprenden el antígeno de interés (véase, por ejemplo, Williams, *et al.*, J. Cell Biol. 111: 955, 1990). Pueden obtenerse secuencias de ADN que codifican para los segmentos deseados a partir de materiales de ADN recombinante fácilmente disponibles tales como los disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852, EE. UU., o a partir de bibliotecas de ADN que contienen el ADN deseado.

Por ejemplo, los segmentos de ADN correspondientes a las secuencias de dominio deseado pueden ensamblarse con secuencias de control y señal apropiadas usando procedimientos de rutina y metodología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.593.002, y Langford, *et al.*, Molec. Cell. Biol. 6: 3191, 1986.

Una secuencia de ADN que codifica para una proteína o polipéptido puede sintetizarse químicamente o aislarse mediante uno de varios enfoques. La secuencia de ADN que va a sintetizarse puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos deseada. En general, se seleccionarán codones preferidos para el huésped pretendido en el que se usará la secuencia para la expresión. La secuencia completa puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos convencionales y ensamblarse para dar una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature 292: 756, 1981; Nambair, *et al.* Science 223: 1299, 1984; Jay, *et al.*, J. Biol. Chem. 259: 6311, 1984.

En un aspecto, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican par el dominio secuencias del constructo de LAMP mejorado se aíslan individualmente usando la reacción en cadena de la polimerasa (M. A. Innis, *et al.*, en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990). Los dominios se aíslan preferiblemente a partir de clones disponibles para el público que se sabe que los contienen, pero también pueden aislarse a partir de bibliotecas de ADN genómico o ADNc. Preferiblemente, los fragmentos aislados están limitados por sitios de endonucleasa de restricción compatibles que permiten construir un constructo de LAMP mejorado que codifica para la secuencia de antígeno que va a construirse. Esta técnica la conocen bien los expertos en la técnica. Las secuencias de dominio pueden fusionarse directamente entre sí (por ejemplo, sin secuencias intermedias), o insertarse unas en otras (por ejemplo, cuando las secuencias de dominio son discontinuas), o pueden estar separadas por secuencias intermedias (por ejemplo, tales como secuencias de ligador).

Las estrategias básicas para preparar cebadores de oligonucleótido, sondas y bibliotecas de ADN, así como su examen mediante hibridación de ácido nucleico, las conocen bien los expertos habituales en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, citado anteriormente; Perbal, 1984, citado anteriormente. La construcción de una biblioteca de ADN genómico o ADNc apropiada está dentro de la habilidad de la técnica. Véase, por ejemplo, Perbal, 1984, citado anteriormente. Alternativamente, bibliotecas de ADN adecuadas o clones disponibles para el público están disponibles de proveedores de materiales de investigación biológica, tales como Clonetech y Stratagene, así como de depositarios públicos tales como la Colección americana de cultivos tipo.

La selección puede lograrse expresando secuencias a partir de una biblioteca de expresión de ADN y detectando los péptidos expresados de manera inmunológica. Se seleccionan los clones que expresan péptidos que se unen a moléculas de MHC II y a los anticuerpos/receptores de células T deseados. Estos procedimientos de selección los conocen bien los expertos habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, citado anteriormente).

Una vez que se ha preparado o aislado un clon que contiene la secuencia codificante para la secuencia de polipéptido deseada, puede clonarse la secuencia en cualquier vector adecuado, preferiblemente que comprende un origen de replicación para mantener la secuencia en una célula huésped.

Vehículos de suministro de ácido nucleico

En un aspecto, se introduce una composición de vacuna que comprende un constructo de LAMP mejorado en una célula. La célula puede ser una célula huésped para replicar el ácido nucleico o para expresar el constructo de LAMP mejorado. Preferiblemente, la célula huésped para expresar el constructo de LAMP mejorado es una célula presentadora de antígenos (descrita adicionalmente a continuación).

En realizaciones preferidas, el constructo de LAMP mejorado comprende además una secuencia de polinucleótido para su inserción en una célula diana y una secuencia de control de la expresión operativamente unida a la misma para controlar la expresión de la secuencia de polinucleótido (por ejemplo, transcripción y/o traducción) en la célula.

Los ejemplos incluyen plásmidos, fagos, secuencias de replicación autónoma (ARS), centrómeros y otras secuencias que pueden replicar o replicarse *in vitro* o en una célula huésped (por ejemplo, tal como una célula bacteriana, de levadura o de insecto) y/o célula diana (por ejemplo, tal como una célula de mamífero, preferiblemente una célula presentadora de antígenos) y/o transmitir las secuencias que codifican para el constructo de LAMP mejorado a una ubicación deseada dentro de la célula diana.

Los vectores de expresión recombinante pueden derivarse de microorganismos que infectan fácilmente a animales, incluyendo ser humano, caballos, vacas, cerdos, llamas, jirafas, perros, gatos o pollos. Los vectores preferidos incluyen los que ya se han usado como vacunas vivas, tales como vaccinia. Estos recombinantes pueden inocularse directamente en un huésped, confiriendo inmunidad no sólo al vector microbiano, sino también para expresar antígenos foráneos. Los vectores preferidos contemplados en el presente documento como vacunas recombinantes vivas incluyen virus de ARN, adenovirus, herpesvirus, poliovirus y vaccinia y otros virus de la viruela, tal como se enseña en Flexner, Adv. Pharmacol. 21: 51, 1990, por ejemplo.

Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, secuencias de promotor para unirse a ARN polimerasa, secuencias de potenciador o elementos reguladores negativos para unirse a activadores y represores de la transcripción, respectivamente, y/o secuencias de inicio de la traducción para unión al ribosoma. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano puede incluir un promotor tal como el promotor lac y, para inicio de la transcripción, la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de iniciación AUG (Sambrook, *et al.*, 1989, citado anteriormente). De manera similar, un vector de expresión eucariota incluye preferiblemente un promotor heterólogo, homólogo o quimérico para ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación en sentido de 3', el codón de iniciación AUG, y un codón de terminación para separación de un ribosoma.

Pueden obtenerse secuencias de control de la expresión a partir de genes que se producen de manera natural o pueden diseñarse. Las secuencias de control de la expresión diseñadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de control de la expresión mutadas y/o quiméricas o secuencias consenso sintéticas o clonadas. Los vectores que contienen tanto un promotor y como un sitio de clonación en el que puede unirse operativamente un polinucleótido se conocen bien en la técnica. Tales vectores pueden transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están comercialmente disponibles de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.).

Con el fin de optimizar la expresión y/o transcripción, puede ser necesario retirar, añadir o alterar porciones no traducidas en 5' y/o 3' de los vectores para eliminar codones de iniciación de la traducción adicionales, o alternativos, u otras secuencias que pueden interferir con, o reducir, la expresión, a nivel o bien de la transcripción o bien de la traducción. Alternativamente, pueden insertarse sitios de unión al ribosoma consenso inmediatamente en 5' con respecto al codón de iniciación para potenciar la expresión. Puede usarse una amplia variedad de secuencias de control de la expresión, secuencias que controlan la de una secuencia de ADN operativamente unida a las mismas, en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma, adenovirus, virus del herpes y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células de mamífero, y diversas combinaciones de las mismas.

En un aspecto, el constructo de LAMP mejorado comprende un origen de replicación para replicar el vector. Preferiblemente, el origen funciona en al menos un tipo de célula huésped que puede usarse para generar suficientes números de copias de la secuencia para su uso en el suministro a una célula diana. Por tanto, los orígenes adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que funcionan en células bacterianas (por ejemplo, tales como *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. y *Pseudomonas* sp.), levadura (por ejemplo, tales como *Saccharomyces* sp. o *Pichia* sp.), células de insecto y células de mamífero. En un aspecto preferido, se proporciona un origen de replicación que funciona en la célula diana en la que se introduce el vehículo de suministro de ácido nucleico (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana). En otro aspecto, se proporcionan al menos dos orígenes de replicación, uno que funciona en una célula huésped y uno que funciona en una célula diana.

El constructo de LAMP mejorado puede comprender alternativa, o adicionalmente, secuencias para facilitar la integración de al menos una porción del vector de suministro de ácido nucleico en un cromosoma de célula diana. Por ejemplo, el constructo de LAMP mejorado puede comprender regiones de homología con respecto a ADN cromosómico de célula diana. En un aspecto, el vector de suministro comprende dos o más sitios de recombinación que flanquean una secuencia de ácido nucleico que codifica para el constructo de LAMP mejorado.

El vector puede comprender adicionalmente un marcador detectable y/o seleccionable para verificar que el vector se ha introducido satisfactoriamente en una célula diana y/o puede expresarse por la célula diana. Estos marcadores pueden codificar para una actividad, tal como, pero sin limitarse a, producción de ARN, péptido o proteína, o pueden proporcionar un sitio de unión para ARN, péptidos, proteínas, compuestos inorgánicos y orgánicos o composiciones y similares.

Los ejemplos de genes marcadores detectables/seleccionables incluyen, pero no se limitan a: segmentos de ADN que codifican para productos que proporcionan resistencia frente a compuestos de lo contrario tóxicos (por ejemplo,

antibióticos); segmentos de ADN que codifican para productos que están ausentes de lo contrario en la célula receptora (por ejemplo, genes de ARNt, marcadores auxotróficos); segmentos de ADN que codifican para productos que suprimen la actividad de un producto génico; segmentos de ADN que codifican para productos que pueden identificarse fácilmente (por ejemplo, marcadores fenotípicos tales como beta-galactosidasa, una proteína fluorescente (GFP, CFP, YFP, BFP, RFP, EGFP, EYFP, EBFP, dsRed, formas mutadas, modificadas o potenciadas de las mismas y similares), y proteínas de superficie celular); segmentos de ADN que se unen a productos que son de lo contrario perjudiciales para la supervivencia y/o función celular; segmentos de ADN que inhiben de lo contrario la actividad de otros segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido); segmentos de ADN que se unen a productos que modifican un sustrato (por ejemplo, endonucleasas de restricción); segmentos de ADN que pueden usarse para aislar o identificar una molécula deseada (por ejemplo, segmentos que codifican para sitios de unión a proteínas específicas); secuencias de cebador; segmentos de ADN, que, cuando están ausentes, confieren de manera directa o indirecta resistencia o sensibilidad frente a compuestos particulares; y/o segmentos de ADN que codifican para productos que son tóxicos en células receptoras.

El gen marcador puede usarse como marcador para la conformación de transferencia génica satisfactoria y/o para aislar células que expresan genes transferidos y/o para recuperar genes transferidos a partir de una célula. Por ejemplo, en un aspecto, el gen marcador se usa para aislar y purificar células presentadoras de antígenos que expresan los constructos de LAMP mejorados.

Pueden proporcionarse genes sustancialmente similares, por ejemplo, genes con más de aproximadamente el 50 %, más de aproximadamente el 70 %, más del 80 %, más de aproximadamente el 90 % y preferiblemente más de aproximadamente el 95 % de identidad con respecto a un gen conocido. Pueden identificarse inicialmente secuencias de dominio sustancialmente similares seleccionando una secuencia que se hibrida específicamente con una secuencia de dominio de interés en condiciones de hibridación rigurosas. Realizar ensayos para determinar la idoneidad de secuencias de dominio homólogas, variantes o modificadas es simplemente cuestión de examinar para detectar secuencias que expresan la actividad apropiada. Tal examen es rutinario en la técnica.

El constructo de LAMP mejorado puede proporcionarse como ácidos nucleicos desnudos o en un vehículo de suministro asociado con una o más moléculas para facilitar la entrada de un ácido nucleico en una célula. Los vehículos de suministro adecuados incluyen, pero no se limitan a: formulaciones de liposomas, polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, formulaciones virales (por ejemplo, incluyendo virus, partículas de virus, envueltas de virus artificiales y similares), vehículos de suministro de células y similares.

Formulaciones basadas en lípidos

Los vehículos de suministro diseñados para facilitar el suministro intracelular de los constructos de LAMP mejorados deben interaccionar con entornos tanto no polares como polares (en o sobre, por ejemplo, la membrana plasmática, líquidos tisulares, compartimentos dentro de la célula y similares). Por tanto, preferiblemente, los vehículos de suministro se diseñan para contener dominios tanto polares como no polares o una secuencia de translocación para translocar un constructo de LAMP mejorado al interior de una célula.

Los compuestos que tienen dominios polares y no polares se denominan anfífilos. Los anfífilos catiónicos tienen grupos polares que pueden cargarse positivamente a, o alrededor de, pH fisiológico para interaccionar con polinucleótidos negativamente cargados tales como ADN.

Los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento pueden proporcionarse en formulaciones que comprenden monocapas o bicapas lipídicas para facilitar la transferencia de los vectores a través de una membrana celular. Pueden usarse liposomas o cualquier forma de membrana lipídica, tal como membranas lipídicas planas o la membrana celular de una célula intacta, por ejemplo, un glóbulo rojo. Las formulaciones de liposomas pueden administrarse mediante cualquier medio, incluyendo administración por vía intravenosa u oral.

Pueden prepararse liposomas y formulaciones de liposomas según métodos convencionales y se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's; Akimaru, 1995, Cytokines Mol. Ther. 1: 197-210; Alving, 1995, Immunol. Rev. 145: 5-31; Szoka, 1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; patente estadounidense n.º 4.235.871; patente estadounidense n.º 4.501.728; y patente estadounidense n.º 4.837.028. En un aspecto, el liposoma comprende una molécula de direccionamiento para dirigir un complejo de liposoma:constructo de LAMP mejorado a un tipo de célula particular. En un aspecto particularmente preferido, una molécula de direccionamiento comprende una pareja de unión (por ejemplo, un ligando o receptor) para una biomolécula (por ejemplo, un receptor o ligando) en la superficie de un vaso sanguíneo o una célula encontrada en un tejido diana.

La carga de liposoma es un determinante importante en el aclaramiento del liposoma a partir de la sangre, captándose liposomas negativamente cargados más rápidamente por el sistema reticuloendotelial (Juliano, 1975, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63: 651) y teniendo por tanto semividas más cortas en el torrente sanguíneo. Incorporar derivados de fosfatidiletanolamina potencia el tiempo de circulación al prevenir la agregación de liposomas. Por ejemplo, la incorporación de N-(omega-carboxi)acilamidofosfatidiletanolaminas en vesículas unilamelares grandes de L-alfa-diestearoilfosfatidilcolina aumenta drásticamente el tiempo de vida en circulación *in vivo* del liposoma (véase,

por ejemplo, Ahl, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1329: 370-382). Normalmente se desean liposomas con semividas en circulación prolongadas para usos terapéuticos y de diagnóstico. Para una discusión general de la farmacocinética, véase, por ejemplo, Remington's, capítulos 37-39, Lee, *et al.*, en Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (Technomic Publishing AG, Basilea, Suiza 1996).

Normalmente, se preparan liposomas con aproximadamente del 5 al 15 por ciento en moles de fosfolípidos negativamente cargados, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina o fosfatidil-inositol. Añadir fosfolípidos negativamente cargados, tales como fosfatidilglicerol, también sirve para prevenir la agregación de liposomas espontánea y, por tanto, minimizar el riesgo de formación de agregados de liposomas de tamaño insuficiente. Agentes de rigidización de la membrana, tales como esfingomiélin o un fosfolípido neutro saturado, a una concentración de al menos aproximadamente el 50 por ciento en moles, y del 5 al 15 por ciento en moles de monosialilgangliósido, también puede conferir propiedades de liposoma deseables, tales como rigidez (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.837.028).

Adicionalmente, la suspensión de liposoma puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen lípidos frente a daños por radicales libres o de peroxidación de lípidos en almacenamiento. Se prefieren agentes de extinción de radicales libres lipófilos, tales como alfa-tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxianina.

Los constructos de LAMP mejorados de la invención pueden incluir vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. Por ejemplo, pueden disolverse lípidos de formación de vesículas en un disolvente orgánico o sistema de disolventes adecuado y secarse a vacío o con un gas inerte para formar una película de lípido delgada. Si se desea, puede volver a disolverse la película en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario, y después liofilizarse para formar una mezcla de lípidos más homogénea que está en una forma de tipo polvo más fácilmente hidratable. Esta película se cubre con una disolución acuosa del complejo de péptido o polipéptido y se deja hidratar, normalmente a lo largo de un periodo de 15 a 60 minutos con agitación. La distribución de tamaño de las vesículas multilamelares resultantes puede desplazarse hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizantes tales como desoxicolato. El medio de hidratación comprende preferiblemente el ácido nucleico a una concentración que se desea en el volumen interior de los liposomas en la suspensión de liposoma final.

Tras la preparación de liposoma, pueden dimensionarse los liposomas para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de tamaños de liposoma. Un intervalo de tamaño preferido es de aproximadamente 0,2 a 0,4 micrómetros, lo cual permite esterilizar la suspensión de liposoma mediante filtración a través de un filtro convencional, normalmente un filtro de 0,22 micrómetros. La esterilización por filtración puede llevarse a cabo con un alto rendimiento si los liposomas se han reducido de tamaño hasta aproximadamente de 0,2 a 0,4 micrómetros. Hay varias técnicas disponibles para dimensionar liposomas a un tamaño deseado (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.737.323).

Los lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, DOTMA (Felgner, *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417), DOGS o Transfectain™ (Behr, *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986), DNERIE o DORIE (Felgner, *et al.*, Methods 5: 67-75), DC-CHOL (Gao y Huang, 1991, BBRC 179: 280-285), DOTAP™ (McLachlan, *et al.*, 1995, Gene Therapy 2: 674-622), Lipofectamine™, y compuestos de glicerolípidos (véanse, por ejemplo, los documentos EP901463 y WO98/37916).

Otras moléculas adecuadas para complejarse con los constructos de LAMP mejorados incluyen moléculas catiónicas, tales como poliamidoamina (Haensler y Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), polilisina dendrítica (documento WO 95/24221), polietilen-irina o polipropileno-h-nina (documento WO 96/02655), polilisina (patente estadounidense n.º 5.595.897; documento FR 2 719 316), quitosano (patente estadounidense n.º 5.744.166), coacervados de ADN-gelatina (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.207.195; la patente estadounidense n.º 6.025.337; la patente estadounidense n.º 5.972.707) o DEAE-dextrano (Lopata, *et al.*, 1984, Nucleic Acid Res. 12: 5707-5717).

Vehículos de suministro génico basados en virus

En un aspecto, el vehículo de suministro de constructo de LAMP mejorado comprende un virus o partícula viral. En este aspecto, preferiblemente, el constructo de LAMP mejorado comprende un vector viral. Los vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes, están con frecuencia compuestos por dos componentes, un genoma viral modificado y una estructura de recubrimiento que lo rodea (véase, por ejemplo, Smith *et al.*, 1995, Ann. Rev. Microbiol. 49: 807-838), aunque algunas veces se introducen vectores virales en forma desnuda o recubiertos con proteínas distintas de proteínas virales. La mayoría de los vectores actuales tienen estructuras de recubrimiento similares a virus de tipo natural. Esta estructura empaqueta y protege el ácido nucleico viral y proporciona los medios para unirse a, y entrar en, células diana.

Preferiblemente, los vectores virales que comprenden los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento se modifican a partir de genomas virales de tipo natural para deshabilitar el crecimiento del virus en una

célula diana al tiempo que se permite que el virus crezca en una célula huésped (por ejemplo, tal como una célula de empaquetamiento o cooperadora) usada para preparar partículas infecciosas. Los ácidos nucleicos de vector generalmente secuencias virales de acción en cis esenciales para replicación y empaquetamiento en una línea cooperadora y secuencias de control de la expresión para regular la expresión de un polinucleótido que está suministrándose a una célula diana. Otras funciones virales se expresan en trans en líneas celulares cooperadoras o de empaquetamiento específicas tal como se conocen en la técnica.

Los constructos de LAMP mejorados preferidos son vectores virales derivados de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus del herpes, citomegalovirus, virus espumosos, lentivirus, virus del bosque de Semliki, AAV (virus adenoasociados), poxvirus, adenoviruses y retrovirus. Tales vectores virales se conocen bien en la técnica.

En un aspecto preferido, un vector viral usado es un vector adenoviral. El genoma adenoviral consiste en una molécula de ADN bicatenaria lineal de aproximadamente 36 kb que porta más de aproximadamente treinta genes necesarios para completar el ciclo de replicación viral. Los genes tempranos se dividen en 4 regiones (E1 a E4) que son esenciales para la replicación viral con la excepción de la región E3, que se cree que modula la respuesta inmunitaria antiviral del huésped. La región E1 (E1A y E1B) codifica para proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral. La expresión de los genes de la región E2 (E2A y E2B) conduce a la síntesis de los polipéptidos necesarios para la replicación viral. Las proteínas codificadas por la región E3 previenen la citólisis mediante células T citotóxicas y factor de necrosis tumoral (Wold y Gooding, 1991, *Virology* 184: 1-8). Las proteínas codificadas por la región E4 están implicadas en la replicación de ADN, expresión y corte y empalme de genes tardíos y desactivación de célula huésped (Halbert, *et al.*, 1985, *J. Virol.* 56: 250-257). Los genes tardíos codifican generalmente para proteínas estructurales que contribuyen a la cápside viral. Además, el genoma adenoviral porta ITR (repetición terminal invertida) en 5' y 3' de acción en cis y secuencias de empaquetamiento esenciales para la replicación de ADN. Las ITR albergan orígenes de replicación de ADN mientras que la región de encapsidación se requiere para el empaquetamiento de ADN adenoviral en partículas infecciosas.

Pueden modificarse vectores adenoviral por ingeniería para replicativos de manera condicional (vectores CRAAd) con el fin de replicarse de manera selectiva en células específicas (por ejemplo, tales como células proliferativas) tal como se describe en Heise y Kim (2000, *J. Clin. Invest.* 105: 847-85 1). En otro aspecto, un vector adenoviral es defectuoso para la replicación para la función E1 (por ejemplo, mediante delección o mutagénesis total o parcial de E1). La estructura principal adenoviral del vector puede comprender modificaciones adicionales (delecciones, inserciones o mutaciones en uno o más genes virales). Un ejemplo de una modificación de E2 se ilustra mediante la mutación termosensible localizada en el gen que codifica para DBP (proteína de unión a ADN) (Ensinger *et al.*, 1972, *J. Virol.* 10: 328-339). La secuencia adenoviral también puede tener delecionada la totalidad o parte de la región E4 (véase, por ejemplo, el documento EP 974 668; Christ, *et al.*, 2000, *Human Gene Ther.* 11: 415-427; Lusky, *et al.*, 1999, *J. Virol.* 73: 8308-8319). Delecciones adicionales dentro de la región E3 no esencial pueden permitir aumentar el tamaño del polinucleótido que está suministrándose (Yeh, *et al.*, 1997, *FASEB Journal* 11: 615 623). Sin embargo, puede resultar ventajoso conservar la totalidad o parte de las secuencias de E3 que codifican para polipéptidos (por ejemplo, tales como gp19k) que permiten que el virus escape del sistema inmunitario (Gooding, *et al.*, 1990, *Critical Review of Immunology* 10: 53-71) o reacciones inflamatorias (documento EP 00440267.3).

También pueden usarse vectores de segunda generación que conservan las ITR y secuencias de empaquetamiento y que comprenden modificaciones genéticas sustanciales para eliminar la síntesis residual de los antígenos virales con el fin de mejorar la expresión a largo plazo del gen expresado en las células transducidas (véase, por ejemplo, documento WO 94/28152; Lusky, *et al.*, 1998, *J. Virol* 72: 2022-2032).

Los constructos de LAMP mejorados que están introduciéndose en la célula pueden insertarse en cualquier ubicación del genoma viral, con la excepción de las secuencias de acción en cis. Preferiblemente, se inserta en sustitución de una región delecionada (E1, E3 y/o E4), preferiblemente, dentro de una región E1 delecionada.

Pueden derivarse adenovirus a partir de cualquier fuente humana o animal, en particular fuentes canina (por ejemplo, CAV-1 o CAV-2, ref. de Genbank CAVIGENOM y CAV77082, respectivamente), aviar (ref. de Genbank AAVEDSDNA), bovina (tal como BAV3; Reddy, *et al.*, 1998, *J. Virol.* 72: 1394 1402), murina (ref. de Genbank ADRMUSMAVI), ovina, felina, porcina o de simio o, alternativamente, puede ser un virus híbrido. Puede emplearse cualquier serotipo. Sin embargo, se prefieren los adenovirus humanos del subgrupo C, especialmente adenovirus 2 (Ad2) y 5 (Ad5). Tales virus están disponibles, por ejemplo, de la ATCC.

También pueden usarse partículas adenoviral o cápsides adenovirales vacías para transferir constructos de LAMP mejorados mediante un procedimiento de co-internalización mediado por virus tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.928.944. Este procedimiento puede lograrse en presencia de agente(s) catiónico(s) tal(es) como policarbonos o vesículas lipídicas que comprenden una o más capas de lípidos.

Pueden prepararse partículas adenovirales y propagarse según cualquier técnica convencional en el campo de la técnica (por ejemplo, documento WO 96/17070) usando una línea celular de complementación o un virus cooperador, que suministra en trans los genes virales que faltan necesarios para la replicación viral. Las líneas celulares 293 (Graham *et al.*, 1977, *J. Gen. Virol.* 36: 59-72) y PERC6 (Fallaux *et al.*, 1998, *Human Gene Therapy* 9: 1909-1917) se

usan habitualmente para complementar delecciones de E1. Se han modificado por ingeniería otras líneas celulares para complementar vectores defectuosos (Yeh, *et al.*, 1996, J. Virol. 70: 559-565; Kroughak y Graham, 1995, Human Gene Ther. 6: 1575-1586; Wang, *et al.*, 1995, Gene Ther. 2: 775-783; Lusky, *et al.*, 1998, J. Virol. 72: 2022-203; documentos EP 919627 y WO 97/04119). Las partículas adenovirales pueden recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo pero también a partir de las células tras la lisis y opcionalmente purificarse adicionalmente según técnicas convencionales (por ejemplo, cromatografía, ultracentrifugación, tal como se describe en los documentos WO 96/27677, WO 98/00524 WO 98/26048 y WO 00/50573).

Puede lograrse un direccionamiento específico de tipo de célula con vectores derivados de adenovirus que tienen una amplia gama de huéspedes mediante la modificación de proteínas de la superficie viral. Por ejemplo, la especificidad de infección de adenovirus está determinada por la unión a receptores celulares presentes en la superficie de células permisivas. Con respecto a esto, la fibra y la pentona presentes en la superficie de la cápside adenoviral desempeñan un papel crítico en la unión celular (Defer, *et al.*, 1990, J. Virol. 64: 3661-3673). Por tanto, el direccionamiento a células de adenovirus puede llevarse a cabo mediante modificación genética del gen viral que codifica para fibra y/o pentona, para generar una fibra y/o pentona modificadas que pueden producir una interacción específica con receptores de superficie celular únicos. Se describen ejemplos de tales modificaciones en Wickarn, *et al.*, 1997, J. Virol. 71: 8221-8229; Arriberg, *et al.*, 1997, Virol. Chem 268: 6866-6869; Roux, *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9079-9083; Miller y Vile, 1995, FASEB J. 9: 190-199; documento WO 93/09221, y en el documento WO 95/28494.

En un aspecto particularmente preferido, se usan secuencias de virus adenoasociados como vectores. Los vectores derivados del parvovirus humano AAV-2 (virus adenoasociado de tipo 2) se encuentran entre los vehículos de suministro génico más prometedores que están desarrollándose actualmente. Varias de las características de este sistema para empaquetar un ADN monocatenario lo sugieren como alternativa posible frente a ADN desnudo para el suministro. Una característica atractiva primaria, a diferencia de otros vectores virales tales como vaccinia o adenovirus, es que los vectores de AAV no expresan ningún gen viral. Las únicas secuencias de ADN viral incluidas en el constructo de vacuna son las repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pb. Por tanto, como en la inmunización con ADN desnudo, el único gen expresado es el del antígeno, o quimera antigénica. Adicionalmente, se sabe que los vectores de AAV se transducen en células tanto en división como no en división, tales como células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humanas, con expresión transgénica persistente, y con la posibilidad de administración oral e intranasal para la generación de inmunidad mucosa. Además, la cantidad de ADN requerida parece ser mucho menor en varios órdenes de magnitud, con respuestas máximas a dosis de 10^{10} a 10^{11} partículas o copias de ADN a diferencia de dosis de ADN desnudo de 50 ug o aproximadamente 10^{15} copias.

En un aspecto, los vectores de AAV se empaquetan mediante co-transfección de una línea celular adecuada (por ejemplo, células 293 humanas) con el ADN contenido en los constructos que codifican para proteína quimérica de ITR de AAV y un plásmido cooperador de AAV ACG2 que contiene la región codificante de AAV (genes de rep y cap de AAV) sin las ITR. Posteriormente se infectan las células con el adenovirus Ad5. Pueden purificarse vectores a partir de lisados celulares usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, tales como ultracentrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio) y se validan para garantizar que están libres de adenovirus o AAV competente para la replicación detectable (por ejemplo, mediante un bioensayo de efecto citopático). El título de AAV puede determinarse mediante PCR cuantitativa con muestras de ADN de virus preparadas tras la digestión con proteinasa K. Preferiblemente, los títulos de vector producidos mediante un método de este tipo son de aproximadamente 5×10^{12} a 1×10^{13} partículas resistentes a ADNasa por ml.

En otros aspectos, se usan vectores retrovirales. Los retrovirus son una clase de virus integrativos que se replican usando una transcriptasa inversa codificada por virus, para replicar el genoma de ARN viral para dar ADN bicatenario que se integra en ADN cromosómico de las células infectadas (por ejemplo, células diana). Tales vectores incluyen los derivados de virus de leucemia murina, especialmente cepas de Moloney (Gilboa, *et al.*, 1988, Adv. Exp. Med. Biol. 241: 29) o FB29 de Friend (documento WO 95/01447). Generalmente, un vector retroviral tiene delecionada la totalidad o parte de los genes virales gag, pol y env y conserva LTR en 5' y 3' y una secuencia de encapsidación. Estos elementos pueden modificarse para aumentar el nivel de expresión o la estabilidad del vector retroviral. Tales modificaciones incluyen la colocación de la secuencia de encapsidación retroviral mediante uno de un retrotransposón tal como VL30 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.747.323). Preferiblemente, el constructo de LAMP mejorado se inserta en sentido de 3' de la secuencia de encapsidación, preferiblemente en sentido opuesto con respecto al genoma retroviral. Puede lograrse direccionamiento específico de célula mediante la conjugación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a la proteína de la envuelta retroviral tal como se conoce en la técnica.

Se preparan partículas retrovirales en presencia de un virus cooperador o en una línea celular de complementación (empaquetamiento) apropiada que contiene integrado en su genoma los genes retrovirales para los que es defectuoso el vector retroviral (por ejemplo, gag/pol y env). Tales líneas celulares se describen en la técnica anterior (Miller y Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980; Danos y Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460; Markowitz, *et al.*, 1988, Virol. 167: 400). El producto del gen de env es responsable de la unión de la partícula viral a los receptores virales presentes en la superficie de la célula diana y, por tanto, determina la gama de huéspedes de la partícula retroviral. En el contexto de la invención, resulta ventajoso usar una línea celular de empaquetamiento, tal como las células PA317 (ATCC CRL 9078) o 293E16 (documento WO97/35996) que contenga una proteína de la envuelta anfotrópica, para permitir la infección de células diana humanas y de otra especie. Las partículas retrovirales se

recuperan preferiblemente a partir del sobrenadante de cultivo y pueden purificarse opcionalmente de manera adicional según técnicas convencionales (por ejemplo, cromatografía, ultracentrifugación).

Otros virus adecuados incluyen poxvirus. El genoma de varios miembros de *poxviridae* se ha mapeado y secuenciado. Un vector de poxvirus puede obtenerse a partir de cualquier miembro de *poxviridae*, en particular virus de la viruela del canario, viruela aviar y vaccinia. Los virus vaccinia adecuados incluyen, pero no se limitan a, la cepa de Copenhagen (Goebel, *et al.*, 1990, Virol. 179: 247-266; Johnson, *et al.*, 1993, Virol. 196: 381-401), la cepa de Wyet y la cepa de Ankara modificada (MVA) (Antoine, *et al.*, 1998, Virol. 244: 365-396). Las condiciones generales para construir un vector de virus vaccinia se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 83 286 y EP 206 920; Mayr *et al.*, 1975, Infection 3: 6-14; Sutter y Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847-10851). Preferiblemente, el polinucleótido de interés se inserta dentro de un locus no esencial tal como las regiones intergénicas no codificantes o cualquier gen para el que la inactivación o delección no altera significativamente el crecimiento y la replicación viral.

Se preparan partículas de poxvirus tal como se describe en la técnica (Piccini, *et al.*, 1987, Methods of Enzymology 153: 545-563; patente estadounidense n.º 4.769.330; patente estadounidense n.º 4.772.848; patente estadounidense n.º 4.603.112; patente estadounidense n.º 5.100.587 y patente estadounidense n.º 5.179.993). Generalmente, se construye un plásmido donante, se amplifica mediante crecimiento en *E. coli* y se aísla mediante procedimientos convencionales. Después, se introduce en un cultivo celular adecuado (por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo) junto con un genoma de poxvirus, para producir, mediante recombinación homóloga, partículas de poxvirus. Estas pueden recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo o a partir de las células cultivadas tras una etapa de lisis (por ejemplo, lisis química, congelación/descongelación, choque osmótico, sonicación y similares). Pueden usarse rondas consecutivas de purificación en placa para retirar virus de tipo natural contaminante. Entonces pueden purificarse partículas virales usando las técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, métodos cromatográficos o ultracentrifugación sobre grandes de sacarosa o cloruro de cesio).

El uso de vaccinia como vacuna de virus vivo en la campaña global para erradicar la viruela hizo que vaccinia fuera una elección evidente para el desarrollo como vector de vacuna recombinante viva. Se han notificado virus vaccinia recombinantes vivos que expresan cerca de 100 proteínas foráneas diferentes, y varios de ellos son vacunas experimentales eficaces (revisado por Moss y Flexner, 1987). Vaccinia es particularmente versátil como vector de expresión debido a su gran tamaño genómico, capacidad para aceptar al menos 25.000 pares de bases de ADN foráneo, y su capacidad para infectar la mayoría de los tipos de células eucariotas, incluyendo células de insecto (en la misma referencia). A diferencia de otros virus de ADN, los poxvirus se replican exclusivamente en el citoplasma de células infectadas, reduciendo la posibilidad de intercambio genético de ADN viral recombinante con el cromosoma del huésped. Se ha mostrado que los vectores vaccinia recombinantes procesan y expresan de manera apropiada proteínas a partir de una variedad de fuentes incluyendo ser humano, otros mamíferos, parásitos, virus de ARN y ADN, bacterias y bacteriófagos.

La expresión de ADN que codifica para una proteína foránea se controla mediante elementos reguladores de virus huésped, incluyendo secuencias de promotor en sentido de 5' y, cuando sea necesario, señales de procesamiento de ARN. La inserción de ADN foráneo en regiones no esenciales del genoma de virus vaccinia se ha llevado a cabo mediante recombinación homóloga (Panicali, *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 79: 4927, 1982; Mackett, *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 79: 7415, 1982).

La expresión de antígenos por el constructo de LAMP mejorado puede producirse debido a elementos reguladores de la transcripción en o cerca del sitio de inserción o mediante modificación por ingeniería genética más precisa. Se han construido vectores de plásmido que facilitan en gran medida la inserción y expresión de genes foráneos (Mackett, *et al.*, J. Virol, 49: 857, 1982). Estos vectores contienen un sitio de expresión, compuesto por un promotor transcripcional de vaccinia y uno o más sitios de endonucleasa de restricción únicos para la inserción de la secuencia codificante foránea flanqueada por ADN de una región no esencial del genoma de vaccinia. La elección del promotor determina tanto el tiempo (por ejemplo, temprano o tardío) como el nivel de expresión, mientras que la secuencia de ADN flanqueante determina el sitio de recombinación homóloga.

Tan sólo aproximadamente una de cada mil partículas de virus producidas mediante este procedimiento es recombinante. Aunque pueden identificarse placas de virus recombinantes mediante hibridación de ADN, se han desarrollado procedimientos de selección eficientes. Usando segmentos de gen de timidina cinasa (TK) de virus vaccinia no esencial como secuencias flanqueantes, el gen foráneo se recombina en el locus de TK y, mediante inserción, inactiva el gen de TK. La selección de virus TK se logra llevando a cabo el ensayo de placa de virus en células TK en presencia de 5-bromodesoxiuridina. La fosforilación del análogo de nucleósido y consiguiente incorporación letal en ADN viral sólo se produce en células infectadas con virus parenteral TK+. Dependiendo de la eficiencia de la transfección y recombinación, hasta 80 de las placas son recombinantes deseados y el resto son mutantes de TK espontáneos.

Los vectores de plásmido que contienen el gen de beta-galactosidasa de *E. coli*, así como un sitio de expresión para un segundo gen, permiten un método alternativo de distinguir virus recombinante de parenteral (Chakrabarti, *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5: 3403, 1985). Las placas formadas mediante tales recombinantes pueden identificarse positivamente

mediante el color azul que se forma tras la adición de un indicador apropiado. Combinando tanto la selección de TK como la expresión de beta-galactosidasa, se aísla virus recombinante de manera sencilla y rápida. Entonces se amplifican los recombinantes mediante propagación en líneas celulares adecuadas y se comprueba la expresión del gen insertado mediante procedimientos enzimológicos, inmunológicos o físicos apropiados.

Aún no se conoce un límite superior para la cantidad de información genética que puede añadirse al genoma de virus vaccinia. Sin embargo, la adición de casi 25.000 pares de bases de ADN foráneo no tuvo ningún efecto perjudicial aparente sobre el rendimiento de virus (Smith, *et al.*, Gene, 25: 21, 1983). Si fuera necesario, podrían deletionarse grandes segmentos del genoma del virus vaccinia para proporcionar capacidad adicional (Moss, *et al.*, J. Virol. 40: 387, 1981).

Las moléculas de la cápside viral pueden incluir restos de direccionamiento para facilitar el direccionamiento y/o la entrada en células. Las moléculas de direccionamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a: conjugados químicos, lípidos, glicolípidos, hormonas, azúcares, polímeros (por ejemplo, PEG, polilisina, PEI y similares), péptidos, polipéptidos (véase, por ejemplo, el documento WO 94/40958), vitaminas, antígenos, lectinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos. Preferiblemente, tales moléculas de direccionamiento reconocen y se unen a marcadores específicos de célula, marcadores específicos de tejido, receptores celulares, antígenos virales, epítopos antigénicos o marcadores asociados a tumor.

Pueden formularse composiciones que comprenden un constructo de LAMP mejorado basado en partículas virales en forma de dosis de entre 10 y 10^{14} u.i. (unidades infecciosas), y preferiblemente entre 10 y 10^{11} u.i. El título puede determinarse mediante técnicas convencionales. Las dosis de constructos de LAMP están preferiblemente comprendidas entre 0,01 y 10 mg/kg, más especialmente entre 0,1 y 2 mg/kg.

ARN autorreplicante

También pueden construirse vectores de virus de ARN autorreplicante usando los constructos de LAMP mejorados tal como se describen en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse alfavirus, flavivirus, virus del sarampión y rhabdovirus para generar vacunas de virus de ARN autorreplicante. Las cepas preferidas de virus de ARN autorreplicante incluyen, pero no se limitan a, virus de la rabia (RABV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus del Nilo occidental, virus de Kunjin, virus del bosque de Semliki (SFV), virus Sindbis (SIN) y/o virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE).

Los virus de ARN autorreplicante expresan el antígeno nativo tras el suministro a tejido, imitando por tanto vacunas atenuadas vivas sin tener el riesgo de reversión a patogenicidad. También estimulan el sistema inmunitario innato, potenciando por tanto las respuestas. Véase, por ejemplo, Ljungberg, K. "Self-replicating alphavirus RNA vaccines", Expert Rev Vaccines (2): 177-94 (2015); Lundstrom, K., "Oncolytic Alphaviruses in Cancer Immunotherapy", Vaccines 5: 9 (2017); Lundstrom, K. "Replicon RNA Viral Vectors as Vaccines", Vaccines 4: 39 (2016) (incorporados en el presente documento como referencia en su totalidad). También puede usarse en protocolos de sensibilización-refuerzo el uso de vacunas autorreplicantes que comprenden los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento.

Además, también pueden encapsularse virus de ARN autorreplicante mediante liposomas, tal como se describe en el presente documento, para mejorar el suministro y direccionamiento. La inmunización con virus de ARN autorreplicante que comprenden los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento puede proporcionar niveles de expresión transitoria superiores de antígenos dando como resultado la generación de respuestas de anticuerpos neutralizantes y protección frente a exposiciones letales en condiciones seguras.

Vehículos de suministro basados en células

Los constructos de LAMP mejorados según la invención pueden suministrarse a células diana por medio de otras células ("células de suministro") que comprenden los constructos. En la técnica se conocen métodos para introducir constructos en células e incluyen microinyección de ADN en el núcleo de una célula (Capechi, *et al.*, 1980, Cell 22: 479-488); transfección con CaPO_4 (Chen y Okayama, 1987, Mol. Cell Biol. 7: 2745-2752), electroporación (Chu, *et al.*, 1987, Nucleic Acid Res. 15: 1311-1326); fusión de lipofección/liposoma (Feigner, *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417) y bombardeo de partículas (Yang, *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9568-9572). Las células adecuadas incluyen células autólogas y no autólogas, y pueden incluir células xenogénicas. Pueden inducirse células de suministro para que suministren su contenido a las células diana induciendo su muerte (por ejemplo, proporcionando genes suicidas inducibles a esas células).

Moléculas auxiliares

Las composiciones que comprenden los constructos de LAMP mejorados según la invención pueden comprender una o más moléculas auxiliares para facilitar la introducción de un constructo de LAMP mejorado en una célula y/o para potenciar un efecto terapéutico particular y/o potenciar la producción de anticuerpos.

Además, la composición que comprende el constructo de LAMP mejorado según la presente invención puede incluir una o más sustancias estabilizantes, tales como lípidos, inhibidores de nucleasa, hidrogeles, hialuronidasa (documento WO 98/53853), colagenasa, polímeros, agentes quelantes (documento EP 890362), con el fin de inhibir la degradación dentro del cuerpo del animal/ser humano y/o mejorar la transfección/infección del vector en una célula diana. Tales sustancias pueden usarse solas o en combinación (por ejemplo, lípidos catiónicos y neutros).

También se ha mostrado que las proteínas de adenovirus pueden desestabilizar los endosomas y potenciar la captación de ADN al interior de células. La mezcla de adenovirus en disoluciones que contienen un vector de ADN complejoado con lípido o la unión de ADN a polilisina unida de manera covalente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteínas pueden mejorar sustancialmente la captación y expresión de un constructo de LAMP mejorado (véase, por ejemplo, Curiel, *et al.*, 1992, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 6: 247-252).

Células huésped

Pueden expresarse constructos de LAMP mejorados según la invención en una variedad de células huésped, incluyendo, pero sin limitarse a: células procariotas (por ejemplo, *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp.); células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* sp.); células de insecto; células de nematodos; células vegetales; células de anfibio (por ejemplo, *Xenopus*); células de aves; y células de mamífero (por ejemplo, células humanas, células de ratón, líneas celulares de mamífero, células de mamífero cultivadas primarias, tales como de tejidos disecados).

Las moléculas pueden expresarse en células huésped aisladas a partir de un organismo, células huésped que forman parte de un organismo, o células huésped que se introducen en un organismo. En un aspecto, se expresan constructos de LAMP mejorados en células huésped *in vitro*, por ejemplo, en cultivo. En otro aspecto, se expresan constructos de LAMP mejorados en un organismo transgénico (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cerdo, primate, etc., transgénico) que comprende células somáticas y/o de línea germinal que comprenden ácidos nucleicos que codifican para los constructos de LAMP mejorados. En la técnica se conocen bien métodos para construir animales transgénicos y son rutinarios.

También pueden introducirse constructos de LAMP mejorados en células *in vitro*, y pueden introducirse las células (por ejemplo, tales como células madre, células hematopoyéticas, linfocitos y similares) en el organismo huésped. Las células pueden ser heterólogas o autólogas con respecto al organismo huésped. Por ejemplo, pueden obtenerse células a partir del organismo huésped, introducirse constructos de LAMP mejorados en las células *in vitro*, y después volver a introducirse en el organismo huésped.

Células presentadoras de antígenos

En un aspecto preferido de la invención, se introduce un constructo de LAMP mejorado tal como se describe en el presente documento en una célula presentadora de antígenos natural o modificada por ingeniería.

El término "célula presentadora de antígenos" (APC) tal como se usa en el presente documento quiere decir cualquier célula que presenta en su superficie un antígeno en asociación con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad, preferiblemente una molécula de la clase II, o porción de la misma. A continuación se comentan en detalle ejemplos de APC adecuadas e incluyen, pero no se limitan a, células completas tales como macrófagos, células dendríticas, células B, APC híbridas y células presentadoras de antígenos de acogida. Métodos de producción de APC híbridas se describen y se conocen en la técnica.

Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígenos. Se ha mostrado que las DC proporcionan todas las señales requeridas para la activación y proliferación de células T. Estas señales pueden clasificarse en dos tipos. El primer tipo, que proporciona especificidad para la respuesta inmunitaria, están mediadas mediante interacción entre el complejo de receptor de células T/CD3 ("TCR/CD3") y un péptido antigénico presentado por una proteína de la clase I o II del complejo mayor de histocompatibilidad ("MHC", definido anteriormente) en la superficie de las APC. Esta interacción es necesario, pero no suficiente, para que se produzca la activación de células T. De hecho, sin el segundo tipo de señales, el primer tipo de señales puede dar como resultado anergia de células T. El segundo tipo de señales, denominadas señales coestimulantes, ni son específicas de antígeno ni están restringidas al MHC, y pueden conducir a una respuesta de proliferación completa de células T e inducción de funciones efectoras de células T en presencia del primer tipo de señales.

Se ha mostrado que varias moléculas potencian la actividad coestimulante. Estas incluyen, pero no se limitan a, antígeno estable al calor (HSA), cadena invariable de MHC modificada con sulfato de condroitina (li-CS), molécula de adhesión intracelular I (ICAM-1) y molécula coestimulante B7 en la superficie de APC y su contrarreceptor CD28 o CTLA-4 en células T.

Otras moléculas coestimulantes importantes son CD40, CD54, CD80, CD86. Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula coestimulante" abarca cualquier molécula individual o combinación de moléculas que, cuando actúan junto con un complejo de péptido/MHC unido mediante un TCR en la superficie de una célula T, proporcionan un efecto coestimulante que logra la activación de la célula T que se une al péptido. Por tanto, el término

abarca B7, u otra(s) molécula(s) coestimulante(s) en una APC, fragmentos de las mismas (solos, complejados con otra(s) molécula(s) o como parte de una proteína de fusión) que, junto con complejo de péptido/MHC, se unen a un ligando relacionado y dan como resultado la activación de la célula T cuando el TCR en la superficie de la célula T se une específicamente al péptido. Las moléculas coestimulantes están comercialmente disponibles de una variedad de fuentes, incluyendo, por ejemplo, Beckman Coulter.

En un aspecto de la invención, el método descrito en Romani *et al.*, J. Immunol. Methods 196: 135-151, 1996, y Bender *et al.*, J. Immunol. Methods 196: 121-135, 1996, se usan para generar células dendríticas tanto inmaduras como maduras a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un mamífero, tal como uno murino, simio o humano. En resumen, se tratan previamente PBMC aisladas para agotar las células T y B por medio de una técnica inmunomagnética. Después se cultivan PBMC sometidas a agotamiento de linfocitos en medio RPMI 9 (por ejemplo, aproximadamente 7 días), complementado con plasma humano (preferiblemente plasma autólogo) y GM-CSF/IL-4, para generar células dendríticas. Las células dendríticas son no adherentes en comparación con sus progenitores de monocitos. Por tanto, aproximadamente en el día 7, se recogen células no adherentes para su procesamiento adicional.

Las células dendríticas derivadas de PBMC en presencia de GM-CSF e IL-4 son inmaduras, ya que pueden perder la propiedad de no adherencia y revertir de vuelta a destino celular de macrófagos si se retiran los estímulos de citocinas del cultivo. Las células dendríticas en un estado inmaduro son muy eficaces para procesar antígenos de proteínas nativas para la ruta restringida de clase II del MHC (Romani, *et al.*, J. Exp. Med. 169: 1169, 1989). Se logra una maduración adicional de células dendríticas cultivadas cultivando durante 3 días en un medio condicionado por macrófagos (CM), que contiene los factores de maduración necesarios. Las células dendríticas maduras tienen menos capacidad de capturar nuevas proteínas para su presentación, pero son mucho mejores en estimular células T en reposo (tanto CD4 como CD8) para el crecimiento y la diferenciación.

Pueden identificarse células dendríticas maduras mediante su cambio de morfología, tal como la formación de más procesos citoplasmáticos de motilidad; mediante su no adherencia; mediante la presencia de al menos uno de los siguientes marcadores: CD83, CD68, HLA-DR o CD86; o mediante la pérdida de receptores de Fc tales como CD115 (revisado en Steinman, Annu. Rev. Immunol. 9: 271, 1991). Pueden recogerse células dendríticas maduras y analizarse usando técnicas y dispositivos típicos de citofluorografía y clasificación celular, tales como FACScan y FACStar. Los anticuerpos primarios usados para citometría de flujo son los específicos para antígenos de superficie celular de células dendríticas maduras y están comercialmente disponibles. Los anticuerpos secundarios pueden ser Ig biotiniladas seguido por estreptavidina conjugada con FITC o PE.

Alternativamente, otros han notificado que un método para regular por incremento (activar) células dendríticas y convertir monocitos en un fenotipo de células dendríticas activadas. Este método implica la adición de ionóforo de calcio a los medios de cultivo para convertir monocitos en células dendríticas activadas. Añadir el ionóforo de calcio 21, A23187, por ejemplo, al comienzo de un periodo de cultivo de 24-48 horas, dio como resultado una activación uniforme y conversión fenotípica de células dendríticas de las fracciones combinadas de "monocitos más DC": de manera característica, la población activada se vuelve de manera uniforme negativa para CD14 (Leu M3), y regula por incremento HLA-DR, HLA-DQ, ICAM-1, 137.1 y 137.2. Además, esta población en masa activada también funciona basándose en pequeños números como purificada adicionalmente. Se ha(n) usado combinación/combinaciones específica(s) de citocinas de manera satisfactoria para amplificar (o sustituir parcialmente) la activación/conversión lograda con ionóforo de calcio: estas citocinas incluyen, pero no se limitan a, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-4. Cada citocina, cuando se administra por sí sola, es inadecuada para una regulación por incremento óptima.

El segundo enfoque para aislar APC es recoger los números relativamente grandes de APC previamente comprometidas que ya están en circulación en la sangre. Técnicas anteriores para aislar APC comprometidas aisladas a partir de sangre periférica humana han implicado combinaciones de procedimientos físicos tales como gradientes de metrizamida y etapas de adherencia/no adherencia (Freudenthal *et al.* PNAS 87: 7698-7702, 1990); separaciones en gradiente de Percoll (Mehta-Damani, *et al.*, J. Immunol. 153: 996-1003, 1994); y técnicas de clasificación celular activada por fluorescencia (Thomas *et al.*, J. Immunol. 151: 6840-52, 1993).

Hay muchos otros métodos rutinarios en la técnica para aislar células presentadoras de antígenos profesionales (o sus precursores) y tales métodos y otros que pueden desarrollarse no están limitados y quedan abarcados dentro del alcance de la invención.

En una realización, las APC y, por tanto, las células que presentan uno o más antígenos, son autólogas. En otra realización, las APC que presentan el antígeno son alogénicas, es decir, se derivan de un sujeto diferente.

Tal como se comenta en el presente documento, pueden introducirse constructos de LAMP mejorados en APC usando los métodos descritos anteriormente u otros conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, fusión, microinyección, suministro basado en virus o suministro basado en células. Arthur *et al.*, Cancer Gene Therapy 4(1): 17-25, 1997, notifica una comparación de métodos de transferencia génica en células dendríticas humanas.

Secuencias de aminoácidos y de nucleótidos conocidas, parciales y supuestas de antígeno leucocitario humano (HLA), la designación genética para el MHC humano, incluyendo la secuencia consenso, están publicadas (véase, por ejemplo, Zemmour y Parham, *Immunogenetics* 33: 310-320, 1991), y también se conocen líneas celulares que expresan variantes de HLA y están generalmente disponibles, muchas de la Colección americana de cultivos tipo ("ATCC"). Por tanto, usando PCR, secuencias de nucleótidos que codifican para clase II de MHC se unen fácilmente de manera operativa a un vector de expresión de esta invención que después se usa para transformar una célula apropiada para la expresión en la misma.

Pueden usarse APC profesionales, tales como macrófagos, células B, monocitos, células dendríticas y células de Langerhans. Estas se recogen a partir de la sangre o tejido de 1) un donante autólogo; 2) un donante heterólogo que tiene una especificidad de HLA diferente del huésped que va a tratarse; o 3) de un donante xenogénico de una especie diferente usando procedimientos convencionales (Coligan, *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, secciones 3 y 14, 1994). Las células pueden aislarse a partir de un huésped normal o de un paciente que tiene una enfermedad infecciosa, cáncer, enfermedad autoinmunitaria o alergia.

Pueden obtenerse APC profesionales a partir de la sangre periférica usando leucoféresis y centrifugación con gradiente de densidad de "FICOLL/HYPAQUE" (centrifugación por etapas a través de gradientes de densidad de Ficoll y Percoll discontinuo). Se usan procedimientos que evitan la exposición de las APC a antígenos que pueden internalizarse por las APC, conduciendo a la activación de células T no específicas para los antígenos de interés.

Pueden modificarse por ingeniería células que no son de manera natural presentadoras de antígenos para que presenten antígenos mediante introducción de secuencias que codifican para moléculas apropiadas. Por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que codifican para moléculas de la clase II del MHC, moléculas auxiliares, moléculas coestimulantes y moléculas de ayuda al procesamiento de antígenos pueden introducirse tras la síntesis directa, clonación, purificación de ADN a partir de células que contienen tales genes y similares. Unos medios convenientes para obtener genes para codificar para las moléculas usadas en los constructos de LAMP mejorados y métodos descritos en el presente documento es mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en moldes de ácido nucleico seleccionados con pares de cebadores de oligonucleótidos seleccionados. Por ejemplo, pueden usarse células epiteliales, células endoteliales, células tumorales, fibroblastos, células T activadas, eosinófilos, queratinocitos, astrocitos, células de la microglia, células epiteliales de la corteza del timo, células de Schwann, células epiteliales de pigmento retiniano, mioblastos, células de músculo liso vascular, condrocitos, enterocitos, tirocitos y células de túbulo renal. Pueden ser células primarias recientemente explantadas de un huésped y no sometidas a extensos pases en cultivo celular para formar una línea celular establecida, o líneas celulares establecidas que son relativamente homogéneas y que pueden proliferar durante muchas generaciones o de manera indefinida.

Se aíslan células que no son APC profesionales a partir de cualquier tejido de un donante autólogo; o un donante heterólogo o un donante xenogénico, donde residen usando una variedad de métodos de separación conocidos (Darling, *Animal Cells: Culture and Media*. J. Wiley, Nueva York, 1994; Freshney, *Culture of Animal Cells*. Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1987). Pueden modificarse por ingeniería *ex vivo* células no autólogas, por ejemplo, células heterólogas o xenogénicas, para expresar moléculas de la clase I y clase II de HLA que coinciden con especificidades de HLA humano conocidas. Entonces pueden introducirse estas células en un sujeto humano que coincide con la especificidad de HLA de las células modificadas por ingeniería. Las células se modifican adicionalmente por ingeniería *ex vivo* para expresar uno o más constructos de LAMP según la invención.

Las células modificadas por ingeniería se mantienen en cultivo celular mediante métodos de cultivo celular convencionales (Darling, "Animal Cells: Culture and Media". J. Wiley, Nueva York, 1994; Freshney, "Culture of Animal Cells". Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1987). Se obtienen líneas celulares para su uso en la presente invención a partir de una variedad de fuentes (por ejemplo, ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, American Type Culture Collection, 8ª edición, 1995), o se producen usando métodos convencionales (Freshney, *Culture of Immortalized Cells*, Wiley-Liss, Nueva York, 1996). Se prefieren líneas celulares no transformadas para su uso en sujetos humanos.

En un aspecto, se obtienen precursores CD34+ que se diferencian bajo la influencia de GM-CSF para dar células dendríticas a partir del cuerpo de un sujeto y se introducen ácidos nucleicos que codifican para constructos de LAMP según la invención en las células, que después se inyectan en el sujeto. Usar los constructos de LAMP mejorados tal como se describen en el presente documento potenciará la asociación de péptidos derivados a partir de un antígeno particular con moléculas de la clase II del MHC en las células presentadoras de antígenos transducidas, dando como resultado respuestas inmunitarias dependientes de células T sistémicas y/o producción de anticuerpos significativamente más potentes. Aunque las células presentadoras de antígenos transfectadas en esta estrategia son preferiblemente células autólogas, puede usarse cualquier célula de la clase II del MHC que presente antígeno eficazmente en el huésped tal como se describió anteriormente.

Vacunas de péptidos

También se encuentran dentro del alcance de esta invención vacunas de péptidos codificadas por el constructo de LAMP mejorado. Preferiblemente, el antígeno se procesa dentro del compartimento/orgánulo (o compartimento/orgánulo posterior al que va a suministrarse) para generar un epítipo unido a una molécula de la clase

II del MHC que puede modular una respuesta inmunitaria.

Las vacunas de péptidos codificadas por los constructos de LAMP mejorados también pueden unirse a una estructura membranosa para facilitar su administración al cuerpo de un organismo. Por ejemplo, la vacuna de péptido codificada por el constructo de LAMP mejorado puede incorporarse en liposomas, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.448.765.

Cuando va a usarse una proteína o polipéptido como inmunógeno, puede producirse mediante expresión de uno cualquiera o más de los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento en una célula recombinante o puede prepararse mediante síntesis química. Por ejemplo, puede usarse la técnica de Merrifield (Journal of American Chemical Society, vol. 85, págs. 2149-2154, 1968).

Métodos de producción de anticuerpos usando constructos de LAMP

Los constructos de LAMP mejorados como polinucleótidos, las proteínas codificadas de los constructos de LAMP mejorados y/o las células (tales como células presentadoras de antígenos que expresan los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento) pueden usarse para generar anticuerpos mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tales como, por ejemplo, métodos descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sutcliffe *et al.*, citado anteriormente; Wilson *et al.*, citado anteriormente; Chow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914 (1985); y Bittle *et al.*, J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985). Si se usa inmunización *in vivo*, pueden inmunizarse animales con una proteína codificada por el constructo de LAMP mejorado y/o un polinucleótido que comprende el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno tal como se describe en el presente documento. La sensibilización con constructos de LAMP mejorados como polinucleótidos, las proteínas codificadas de los constructos de LAMP mejorados y/o células (tales como células presentadoras de antígenos que expresan los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento) seguido por refuerzo con un antígeno es una realización preferida de la invención. En realizaciones adicionales preferidas, se contempla específicamente la sensibilización con un constructo de LAMP mejorado tal como se describe en el presente documento seguida por refuerzo con un antígeno y puede usarse para generar una respuesta inmunitaria incluso más robusta, especialmente con vistas a título y diversidad de repertorio de anticuerpos.

El constructo de LAMP mejorado que comprende el antígeno puede inyectarse en el vertebrado no humano para producir anticuerpos. La preparación e inyección de constructos de LAMP en vertebrados no humanos puede lograrse según principios de inmunización de animales que conocen bien los expertos en la técnica.

El uso de un constructo de LAMP mejorado para presentar de manera eficaz el antígeno implica, en un aspecto, procesar el antígeno mediante LAMP en células presentadoras de antígenos tras endocitosis y fusión del endosoma con un lisosoma. Entonces, el endosoma se fusiona con una vesícula exocítica del aparato de Golgi que contiene moléculas de la clase II del MHC, a la que se unen los péptidos resultantes. Entonces, el complejo de MHC-péptido experimenta tráfico a la membrana plasmática en la que el antígeno está disponible para su presentación a células T CD4+.

Puede inmunizarse animales tales como conejos, ratas, ratones, llamas, camellos y/o vacas con el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno y/o un polinucleótido que codifica para el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno. Animales adicionales adecuados para la inmunización incluyen mamíferos no humanos, tales como un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), un primate, simio (por ejemplo, un mono o un macaco), un mono (por ejemplo, tití, babuino, macaco rhesus), un macaco (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibbon).

Por ejemplo, puede usarse inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 microgramos de un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno o portador proteína y adyuvante de Freund o cualquier otro adyuvante conocido para estimular una respuesta inmunitaria. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo (tal como con la proteína de antígeno recombinante), por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar un título útil de un anticuerpo anti-antígeno que puede detectarse, por ejemplo, mediante ensayo ELISA usando antígeno libre adsorbido, directa o indirectamente (por ejemplo, mediante una etiqueta AviTag biotinilada), en una superficie sólida. El título de anticuerpos anti-antígeno en suero a partir de un animal inmunizado puede aumentarse mediante selección de anticuerpos anti-anticuerpos, por ejemplo, mediante adsorción del antígeno en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados según métodos bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica para el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno también puede introducirse directamente en animales. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5.676.954; 6.875.748; 5.661.133; Sahin *et al.*, Nat Rev Drug Discov, octubre de 2014; 13(10): 759-80; Kariko *et al.*, Mol Ther, noviembre de 2008; 16(11): 1833-40; Kariko *et al.*, Nucleic Acid Res, noviembre de 2011; 39(21): e142; patente estadounidense número 6.511.832. En un ejemplo, un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno se inyecta directamente en un vertebrado no humano. La inyección en los animales puede realizarse

mediante administraciones intramusculares, intradérmicas, intranasales, subcutáneas, intravenosas, intratraqueales e intratecales. También puede incluirse refuerzo de seguimiento con un antígeno recombinante para generar los anticuerpos.

Adicionalmente, los anticuerpos generados mediante los métodos dados a conocer pueden madurarse por afinidad usando tecnología de presentación, tal como, por ejemplo, presentación en fagos, presentación en levadura o presentación en ribosoma. En un ejemplo, se examinan moléculas de anticuerpo de cadena sencilla ("scFv") presentadas en la superficie de partículas de fago para identificar los scFv que se unen de manera inmuno-específica al antígeno y/o a la proteína de partida. La presente invención abarca tanto scFv como porciones de los mismos que se identifica que se unen de manera inmuno-específica al antígeno y/o la proteína de partida. Tales scFv pueden "convertirse" de manera rutinaria en moléculas de inmunoglobulina insertando, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican para los dominios de V_H y/o V_L del scFv en un vector de expresión que contiene las secuencias de dominio constante y modificarse por ingeniería para dirigir la expresión de la molécula de inmunoglobulina.

La expresión recombinante de los anticuerpos producidos (incluyendo scFv y otras moléculas que comprenden, o alternativamente consisten en, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o una porción del mismo o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención)) usando el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno y/o un polinucleótido que codifica para el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno de la invención, requiere la construcción de un(os) vector(es) de expresión que contiene(n) un polinucleótido que codifica para el anticuerpo o fragmento o variante del mismo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica para una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo completo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o variante o porción del mismo (preferiblemente, pero no necesariamente, que contiene el dominio variable de cadena pesada o ligera)), de la invención, el/los vector(es) para la producción del molécula de anticuerpo puede(n) producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar un anticuerpo expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para anticuerpo. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican para anticuerpo y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo* y se describen en el presente documento. Por tanto, la invención proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo anti-antígeno obtenido y aislado tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo completo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, un Fv de cadena sencilla, o fragmentos o variantes de los mismos), operativamente unida a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica para la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de PCT WO 86/05807; publicación de PCT WO 89/01036; y patente estadounidense n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector de este tipo para la expresión de la cadena pesada entera, la cadena ligera entera, o tanto la cadena pesada como la ligera enteras.

El/los vector(es) de expresión puede(n) transferirse a una célula huésped mediante técnicas convencionales y después se cultivan las células transfectadas mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo anti-antígeno. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen polinucleótido(s) que codifica(n) para el anticuerpo anti-antígeno (por ejemplo, anticuerpo completo, una cadena pesada o ligera del mismo, o porción del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla de la invención, o un fragmento o variante del mismo), operativamente unida(s) a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas, para la expresión de moléculas de anticuerpo enteras, pueden expresarse conjuntamente vectores que codifican para las cadenas tanto pesada como ligera en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, tal como se detalla a continuación.

Puede usarse una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar anticuerpo anti-antígeno. Tales sistemas de huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse las secuencias codificantes de interés y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan, con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar el anticuerpo anti-antígeno. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K de virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y, más preferiblemente, células eucariotas,

para la expresión del anticuerpo anti-antígeno. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de gen temprano intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz (Foecking *et al.*, Gene 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, Bio/Technology 8: 2 (1990)).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto. Por ejemplo, cuando tiene que producirse una gran cantidad de una proteína (o bien para producción de anticuerpos o bien para polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado), pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO 1. 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante puede ligarse de manera individual en el vector dentro del marco con la región codificante de lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores de pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores de pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células sometidas a lisis mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de matriz seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores de pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión con proteasa de factor Xa o trombina de modo que el producto génico diana clonado puede liberarse a partir del resto de GST.

En un sistema de insecto, puede usarse virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Pueden clonarse secuencias codificantes de manera individual en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la poliedrina).

En células huésped de mamífero, pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus para expresar un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, la secuencia líder tripartito o promotor tardío. Entonces puede insertarse este gen quimérico en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*.

La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y que puede expresar el anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359 (1984)).

También pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficiente de secuencias codificantes insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación de ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase, por ejemplo, Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153: 51-544 (1987)).

Además, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea expresada, para ello, pueden usarse células huésped eucariotas que presentan la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto. Tales células huésped de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, NSO, MDCK, 293, 3T3, W138 y, en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y línea celular de glándula mamaria normal tal como, por ejemplo, CRL703O y HsS78Bst.

Para la producción a largo plazo en alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería líneas celulares que expresan de manera estable la expresión de un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse células huésped con un polinucleótido controlado mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del polinucleótido foráneo, pueden dejarse crecer las células modificadas por ingeniería durante 1-2 días en unos medios enriquecidos, y después se cambian a unos medios selectivos. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse para dar líneas

celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar por ingeniería líneas celulares que expresan el anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, los genes de timidina cinasa de virus del herpes simple (Wigler *et al.*, Cell 11: 223 (1977)), hipoxantainaguanina fosforibosiltransferasa (Szybalski & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22: 8 17 (1980)) que pueden emplearse en células tk-, hgp^rt- o apt^r-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia antimetabolito como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy, 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIB TECH 11(5): 155-2 15 (mayo; 1993)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30: 147 (1984)). Pueden aplicarse de manera rutinaria métodos habitualmente conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión o bien de un anticuerpo anti-antígeno o bien de los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado pueden aumentarse mediante amplificación de vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The Use Of Vectors Based On Gene Amplification For The Expression Of Cloned Genes In Mammalian Cells In DNA Cloning, vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado puede amplificarse, un aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con la secuencia codificante, también aumentará la producción del anticuerpo anti-antígeno expresado o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983)).

Otros elementos que pueden incluirse en secuencias de vector incluyen péptidos señal heterólogos (señales de secreción), secuencias de anclaje a membrana, intrones, sitios de corte y empalme alternativo, señales de inicio y terminación de la traducción, inteínas, sitios de biotilación y otros sitios que fomentan modificaciones postraduccionales, etiquetas de purificación, secuencias que codifican para fusiones con otras proteínas o péptidos, regiones codificantes independientes separadas mediante sitios de reentrada al ribosoma internos, secuencias que codifican para proteínas de "marcador" que, por ejemplo, confieren capacidad de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos) o capacidad de clasificación (por ejemplo, fluorescencia), nucleótidos modificados y otras características de acción en cis de polinucleótidos conocidas no limitadas a estos ejemplos.

La célula huésped puede transfectarse conjuntamente con dos vectores de expresión de la invención, por ejemplo, codificando el primer vector para un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector para un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y puede expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera está preferiblemente colocada antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2 197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico o secuencias de ADN sintético.

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad (particularmente mediante afinidad de proteína A e inmunofinidad para el antígeno específico), y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, puede fusionarse un anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado a secuencias de polipéptido heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

En un ejemplo, el anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado puede fusionarse con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o porciones del mismo (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de los mismos y porciones de los mismos), o albúmina (incluyendo, pero sin limitarse a, albúmina humana recombinante o fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.876.969, expedida el 2 de marzo de 1999, la patente EP 0 413 622 y la patente estadounidense n.º 5.766.883, expedida el 16 de junio de 1998), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y pueden aumentar la semivida *in vivo*. Esto se ha mostrado para proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido de CD4 humano y diversos dominios de las

regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero. Véase, por ejemplo, el documento EP 394.827; Traunecker *et al.*, Nature, 331: 84-86 (1988). Se ha demostrado el suministro potenciado de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario para antígenos (por ejemplo, insulina) conjugados a una pareja de unión de FcRn tal como IgG o fragmentos Fe (véanse, por ejemplo, las publicaciones de PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). También se ha encontrado que las proteínas de fusión de IgG que tienen una estructura dimérica unida por enlaces disulfuro debido a los enlaces disulfuro de la porción de IgG son más eficientes en la unión a, y neutralización de, otras moléculas que polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos por sí solos. Véase, por ejemplo, Fountoulakis *et al.*, J. Biochem., 270: 3958-3964 (1995). También pueden recombinarse ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo anti-antígeno o los polipéptidos codificados del constructo de LAMP mejorado descrito en el presente documento con un gen de interés como una etiqueta de epítipo (por ejemplo, la etiqueta de hemaglutinina ("HA") o etiqueta Flag) para ayudar en la detección y purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht *et al.* permite la fácil purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-897). En este sistema, se subclona el gen de interés en un plásmido de recombinación de vaccinia de tal manera que el marco de lectura abierto del gen se fusiona de manera traduccional con una etiqueta amino-terminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como dominio de unión a matriz para la proteína de fusión. Se cargan extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante en una columna de ácido nitriloacético-agarosa Ni²⁺ y pueden eluirse de manera selectiva proteínas etiquetadas con histidina con tampones que contienen imidazol.

Administración

El material de vacuna según esta invención puede contener los constructos de LAMP mejorados inmunoestimulantes descritos en el presente documento o pueden ser microorganismos recombinantes, o células presentadoras de antígenos que expresan los constructos de LAMP mejorados inmunoestimulantes. La preparación de constructos de LAMP mejorados que contienen material de vacuna según esta invención y la administración de tales constructos de LAMP mejorados para la inmunización de individuos se logran según principios de inmunización que conocen bien los expertos en la técnica.

Pueden obtenerse grandes cantidades de estos materiales cultivando células recombinantes o transformadas que contienen replicones que expresan los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de cultivo y se enseñan en uno o más de los documentos citados anteriormente. Las vacunas de constructo de LAMP mejorado se producen generalmente mediante cultivo de células recombinantes o transformadas y se formulan en una disolución o suspensión farmacológicamente aceptable, que habitualmente es una disolución acuosa fisiológicamente compatible, o en comprimidos recubiertos, comprimidos, cápsulas, supositorios o ampollas, tal como se describe en la técnica, por ejemplo en la patente estadounidense n.º 4.446.128, incorporada en el presente documento como referencia. La administración puede ser cualquier vía adecuada, incluyendo oral, rectal, intranasal o mediante inyección en la que la inyección puede ser, por ejemplo, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Los constructos de LAMP mejorados se administran a un mamífero en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero. Una cantidad mínima preferida para la administración es la cantidad requerida para producir la formación de anticuerpos a una concentración al menos 4 veces la que existía antes de la administración. Una dosis inicial típica para la administración será de 10-5000 microgramos cuando se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, o de 10⁵ a 10¹¹ unidades formadoras de placas de un vector recombinante, aunque esta cantidad puede ajustarse por un médico que realiza la administración tal como sucede habitualmente en la administración de vacunas y otros agentes que inducen respuestas inmunitarias. Una única administración puede ser habitualmente suficiente para inducir inmunidad, pero pueden llevarse a cabo múltiples administraciones para garantizar o reforzar la respuesta.

Las vacunas de constructo de LAMP mejorado pueden someterse inicialmente a prueba en un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón o primate). Por ejemplo, pueden usarse ensayos de las respuestas inmunitarias de ratones inoculados para demostrar mayores respuestas de células T citotóxicas, de proliferación de células T y de anticuerpos frente a los constructos de LAMP mejorados que frente a antígeno de tipo natural. Pueden evaluarse constructos de LAMP mejorados en macacos rhesus para determinar si la formulación de vacuna que es altamente eficaz en ratones también producirá una respuesta inmunitaria apropiada en monos. En un aspecto, cada mono recibe un total de 5 mg de ADN por inmunización, administrados i.m. y divididos entre 2 sitios, con inmunizaciones en el día 0 y en las semanas 4, 8 y 20, con una dosis adicional opcional. Pueden medirse respuestas de anticuerpos, ADCC, producción de citocinas de células T CD4⁺ y CD8⁺, tinción de citocinas específicas de antígeno de células T CD4⁺ y CD8⁺ para monitorizar las respuestas inmunitarias frente a la vacuna.

Puede encontrarse una descripción adicional de métodos adecuados de formulación y administración según esta invención en la patente estadounidense n.º 4.454.116 (constructos), la patente estadounidense n.º 4.681.762 (bacterias recombinantes) y las patentes estadounidenses 4.592.002 y 4.920.209 (virus recombinantes).

Inmunoterapia contra el cáncer: candidatos para la prevención y el tratamiento

Los candidatos para la inmunoterapia contra el cáncer serán cualquier paciente con un cáncer tratado con un constructo de LAMP mejorado tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos incluyen pacientes con linfomas asociados con virus de Epstein-Barr documentado, pacientes con carcinomas de cuello uterino asociado con VPH, pacientes con VHC crónico, o pacientes con un reordenamiento o mutación definido en un oncogén o gen supresor de tumores.

En realizaciones preferidas, los cánceres que pueden tratarse usando las vacunas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, todos los estadios de progresión, incluyendo hiperplasia de un adenocarcinoma, sarcoma, cáncer de piel, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo, pero sin limitarse a, NSCLC, SCLC, cáncer de células escamosas), cáncer colorrectal, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer oral, cáncer de glándula salivar, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer de riñón, mieloma múltiple o cáncer cerebral.

Se prevé que la terapia con una composición de vacuna que comprende los constructos de LAMP mejorados puede usarse en cualquier periodo durante el transcurso del cáncer del individuo, una vez identificado. También es posible, en pacientes con alto riesgo, la vacunación con el fin de prevenir la aparición posterior de un cáncer.

Procedimiento para terapia

En una realización, los constructos de LAMP mejorados pueden inyectarse en el paciente en cualquier momento adecuado durante el transcurso de su tumor maligno. Por ejemplo, los constructos de LAMP mejorados se inyectarán en un estadio en el que la carga tumoral era baja. En una realización alternativa en la que el constructo de LAMP mejorado se introduce en las células presentadoras de antígenos del individuo, se extraen precursores de las células presentadoras de antígenos o células presentadoras de antígenos maduras a partir o bien de la médula ósea del individuo o bien de sangre periférica mediante punción venosa. Se establecen estas células en cultivo seguido por transducción con el constructo de LAMP mejorado. Una vez que se ha producido la transducción, se inyectan estas células presentadoras de antígenos de vuelta en el paciente.

En una realización particularmente preferida, la invención proporciona el uso de los constructos de LAMP mejorados según la invención en un método de tratamiento para un paciente con cáncer que tiene una baja carga tumoral, tal como al principio de la enfermedad, tras la resección de un tumor neoplásico o cuando la carga de células tumorales se reduce de otro modo. En este método, se obtiene del paciente una población celular que contiene células madre autólogas que pueden diferenciarse para dar células presentadoras de antígenos que expresarán moléculas de la clase II del MHC. Se cultivan estas células y se transforman mediante introducción de un constructo de LAMP mejorado para suministrar el antígeno que va a asociarse con una molécula de la clase II del MHC o bien dentro del compartimento/orgánulo o bien dentro de otro compartimento/orgánulo al que se suministra el antígeno.

Entonces vuelve a introducirse la población de células madre transfectadas en el paciente, en el que las células madre se diferencian para dar células presentadoras de antígenos que expresan moléculas de la clase II del MHC complejadas con epítomos de T_h a partir del antígeno. La respuesta inmunitaria frente al antígeno se potenciará mediante estimulación potenciada de la población de células T cooperadoras.

Más generalmente, en una realización, esta invención proporciona una composición de vacuna que comprende el constructo de LAMP mejorado para modular una respuesta inmunitaria en un mamífero frente a un antígeno (es decir, estimular, potenciar o reducir una respuesta de este tipo).

Kits

La divulgación comprende además kits para facilitar la realización de los métodos descritos en el presente documento. En un aspecto, un kit comprende un constructo de LAMP mejorado tal como se describe en el presente documento y una célula para recibir el constructo de LAMP mejorado. El kit puede comprender adicionalmente uno o más ácidos nucleicos para modificar por ingeniería la célula para dar una APC profesional. Sin embargo, en un aspecto, la célula es una APC profesional. La célula puede expresar o no moléculas coestimulantes. En un aspecto preferido, cuando la célula no expresa moléculas coestimulantes, el antígeno codificado por el constructo de LAMP mejorado es un autoantígeno. En otro aspecto, se proporciona un panel de células que expresan diferentes moléculas del MHC (por ejemplo, que se sabe que se expresan en seres humanos). En un aspecto adicional, el kit comprende reactivos para facilitar la entrada de los constructos de LAMP mejorados en una célula (por ejemplo, formulaciones basadas en lípidos, materiales de empaquetamiento viral, células y similares). En todavía un aspecto adicional, se proporcionan una o más líneas de células T específicas para el antígeno codificado por el constructo de LAMP mejorado, para verificar la capacidad del constructo de LAMP mejorado para producir, modular o potenciar una respuesta inmunitaria.

Ejemplos

Ahora se ilustrará adicionalmente la invención con referencia a los siguientes ejemplos. Se apreciará que lo siguiente es únicamente a modo de ejemplo y que pueden realizarse modificaciones en cuanto a detalles encontrándose todavía

dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Construcción de constructos de LAMP

Los constructos de LAMP mejorados ilustrados en la figura 1 pueden construirse usando técnicas de biología molecular convencionales bien conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, pueden diseñarse plásmidos que comprenden los polinucleótidos para generar las diferentes estructuras ILC-1 a ILC-6 mostradas en la figura 1. Los dominios de LAMP ilustrados en la figura 1 pueden derivarse de las secuencias de aminoácidos mostradas en las figuras 3-10. Preferiblemente, los dominios de LAMP se derivan de las proteínas LAMP humanas mostradas en las figuras 3-10. Se prevé que los dominios correspondientes también pueden clonarse a partir de las secuencias ortólogas identificando los dominios equivalentes en comparación con la secuencia humana. Un antígeno de interés (incluyendo uno o más antígenos de interés) puede clonarse en los constructos de LAMP descritos o bien de manera individual o bien en combinación.

Ejemplo 2 - Evaluación de la respuesta inmunitaria de ratones frente a constructos de LAMP

La capacidad de los constructos de LAMP mejorados tal como se describen en el ejemplo 1 puede someterse a prueba para determinar su capacidad para modular una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones BALB/c hembra i.d. con 50 ug de los constructos de LAMP mejorados y 5 ug de GMCSF en 100 ul de PBS usando Nanopass en el día 0, 14 y 28. Entonces se terminará el experimento 4 semanas tras la última dosis.

Se estimulan esplenocitos (3×10^5 /pocillo) con proteína antigénica (10 ug/ml) en medios de células T (RPMI con FBS inactivado por calor al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y 2-ME 1X), se recogen los sobrenadantes 72 h después. Se diluyen los sobrenadantes (400 ul de sobrenadante + 200 ul de medios de células T) y se evalúan las citocinas mediante ELISA. La producción de IL-10 o IL-4 puede medirse mediante ensayo de ELISPOT.

Ejemplo 3 - Presentación mejorada de antígenos usando constructos de LAMP

Survivina es el miembro más pequeño de la familia de proteínas de inhibidores de la apoptosis (IAP), implicados en la inhibición de la apoptosis y regulación del ciclo celular. Estos atributos funcionales hacen que la survivina sea una proteína única que muestra funciones divergentes, es decir regulación de la proliferación celular y la muerte celular. La expresión de survivina en tumores se correlaciona no sólo con la inhibición de la apoptosis y una tasa reducida de muerte celular, sino también con resistencia a quimioterapia y agresividad de tumores [1-6]. Por tanto, la survivina es una diana importante para vacunas y productos terapéuticos contra el cáncer [7-9]. También se ha encontrado que la survivina se expresa de manera prominente en células madre tanto humanas como embrionarias y muchos tipos de células madre somáticas, lo que indica una función aún no explorada en la generación y el mantenimiento de células madre.

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades en el que un crecimiento celular anómalo, con potencial para invadir otras partes del cuerpo, toma el control de la homeostasis normal y se resulta mortal si no se trata a tiempo y de manera correcta. La inmunoterapia selecciona específicamente como diana células tumorales evitando de ese modo el daño colateral a células no tumorales e induciendo respuesta antitumoral. Esta respuesta antitumoral también tiene potencial para erradicar tumor en sitios distantes en el cuerpo, lo cual puede no ser posible mediante resección quirúrgica. La inducción o potenciación de respuesta inmunitaria antitumoral es un desafío formidable en el cáncer porque las células tumorales usan múltiples estrategias de evasión y evitan su detección o eliminación por células inmunitarias.

El objetivo de este proyecto es evaluar la respuesta inmunitaria *in vivo* de una generación completamente nueva de constructos de LAMP inyectados i.d. en ratones BALB/c. Específicamente, se inmunizaron ratones con 50 µg de los constructos sometidos a prueba definidos en la leyenda de la figura 1 mediante inyección intradérmica. No se añadió ningún adyuvante en este experimento. A seis ratones por grupo se les administraron vacunas cada 7 días con tres dosis totales en un mes. Se monitorizó la respuesta inmunitaria 14 días tras la inmunización.

Se generaron los constructos de LAMP sometidos a prueba tal como se describe en el presente documento y la secuencia de cada constructo sometido a prueba se muestra en la figura 19. Se adquirieron proteína de survivina de MyBiosource (San Diego, CA). Los péptidos de survivina fueron de GenScript (Piscataway, NJ). Se adquirieron anticuerpo anti-survivina y m-IgGk-BP-HRP de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX), y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-LAMP-1/CD107a fue de OriGene Technologies (Rockville, MD). Los pares de anticuerpos de ELISPOT para IFN γ fueron de Biolegend. Se adquirieron anticuerpos monoclonales acoplados con fluorescencia frente a CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L, IFN γ , TNF α , granzima B, CD69 y kit de viabilidad que puede fijarse Zombie aqua de BioLegend (San Diego, CA). Se adquirieron IgG2a-HRP de cabra anti-ratón e IgG-HRP de cabra anti-ratón de Southern Biotechnologies (Birmingham, AL). Se adquirió estreptavidina-HRP de Thermo Fisher (Waltham, MA). Se adquirieron sustrato de peroxidasa de micropocillos SureBlue TMB y disolución de parada de TMB de KPL (Gaithersburg, MD).

Se usaron 50 µg de cada constructo en un volumen total de 100 ul por ratón por dosis para Pharmajet. Se inmunizaron los ratones con la vacuna mediante administración i.d. en los días 0, 7 y 14. Se extrajo sangre de los ratones en los

días 28 para la recogida de suero. Se recogió suero y se almacenó a -30°C. Se extrajeron los bazos en el día 28 a la finalización del experimento y se procesaron para ELISPOT y FACS para evaluar respuestas de células T específicas de survivina.

Medición de IgG total específica de survivina en plasma mediante ELISA. Se evaluó la respuesta de anticuerpos murinos frente a survivina mediante ELISA indirecta. Se recubrieron placas de ELISA (MaxiSorp) con proteína de survivina 2 µg/ml (1-142) en tampón de carbonato-bicarbonato durante la noche y después se bloquearon con BSA al 2 % en PBS. Se diluyeron muestras de plasma 1:100 en tampón de bloqueo. Se detectaron muestras con IgG-HRP de cabra anti-ratón (Southern Biotech, Birmingham, AL). Se reveló la reacción con sustrato SureBlue TMB y se detuvo con disolución de parada de TMB de KPL (Gaithersburg, MD). Se leyeron las placas (DO450) usando un lector de ELISA Epoch (BioTek, Winooski, VT).

Evaluación de respuesta de células T específica de antígeno. Para evaluar la respuesta de células T específica de antígeno en los ratones vacunados, se evaluaron los esplenocitos de ratones vacunados para determinar la producción de IFN γ específica de antígeno mediante inmunodetección por puntos ligada a enzimas (ELISPOT). Para ensayos de ELISPOT, se recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos (Millipore) durante la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal de captura en PBS. Se lavaron las placas tres veces con 200 µl/pocillo de PBS y se bloquearon con 200 µl/pocillo de medios de células T durante al menos 2 h a temperatura ambiente. Se sembraron esplenocitos en placas a 3x10⁵ células/pocillo y se cultivaron conjuntamente con péptidos de survivina combinados 2 µg/ml (tabla 1) o concavalina A (0,125 µg/ml) o medio solo en un volumen total de 200 µl/pocillo de medios de células T (RPMI-1640 con L-glutamina y HEPES (ATCC), penicilina al 1 %, estreptomycin al 1 %, y β -ME 5 x 10⁻⁵ M) a 3x10⁵ células/pocillo durante 48 h a 37°C en CO₂ al 5 %. Se lavaron las placas dos veces con 200 µl/pocillo de PBS y dos veces con 200 µl/pocillo de PBS-T (Tween al 0,05 % / PBS). Se añadieron anticuerpos de detección diluidos (50 µl/pocillo en PBST/BSA al 0,5 %) y se incubaron las placas durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Se lavaron las placas cuatro veces con PBS. Se añadieron estreptavidina-fosfatasa alcalina diluidas en PBS (50 µl/pocillo) y se incubaron durante 2 h. Se lavaron las placas con PBS cuatro veces y se revelaron con 50 µl/pocillo de sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, BD Bioscience) durante 10 min. Se detuvo el desarrollo de color lavando con agua corriente. Tras secar durante 72 h a temperatura ambiente en la oscuridad, se contaron puntos de color usando un sistema de lector de alta resolución AID ELISPOT y software AID ELISPOT versión 3.5 (Autoimmun Diagnostika GmbH).

Tabla 1. Péptidos combinados de Genscript

P1 combinado	Sur1-15, Sum11-25, Sur 21-35, Sur31-45, sur 41-55
P2 combinado	Sur51-65, sur61-75, sur71-85, sur81-95
P3 combinado	Sur91-105, sur 101-115, sur111-125, sur121-135, sur131-142
P4 combinado	Sur31-45, sur41-55 y sur51-65

Inmunotransferencias de tipo Western. Se transfectaron células 293T con los constructos sometidos a prueba usando reactivos de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se lavaron las células transfectadas con PBS y se suspendieron en 200 µl de tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteinasa Halt (Thermo Scientific, Waltham, MA). Se centrifugaron los lisados (700 g durante 15 minutos a 4°C), seguido por medición de la concentración de proteína en los sobrenadantes aclarados usando kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Se sometieron 10 µg de proteína a electroforesis en geles de SDS-PAGE previamente colados (4-20 %) (BioRad, Hercules, California) y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (BioRad) y se sometieron a inmunotransferencia con AcM frente a hLAMP. Se bloquearon las membranas con tampón de bloqueo Detection™ (KPL) y se analizaron con sonda con anticuerpo de conejo anti-LAMP humana (Sino Biological Inc., Pekín, China) o anticuerpo anti-survivina y anticuerpo de cabra anti-conejo-HRP, y después se revelaron con TMB (KPL).

Citometría de flujo. En primer lugar se marcaron células con colorante de viabilidad que puede fijarse Zombie aqua en PBS (dilución 1:500), seguido por anticuerpos de superficie (dilución 1:100) en tampón de tinción (FBS al 4 %, suero de rata al 2 %, suero de ratón al 2 % en PBS). Para tinción intracelular, se tiñeron células con Zombie aqua, seguido por tinción de superficie, fijación con paraformaldehído al 4 % y se tiñeron con anticuerpo intracelular en tampón de permeabilización (PBS con FCS al 1 %, saponina al 0,1 %). Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo CytoFlex (Beckman Coulter) y se analizaron usando el software Kaluza (Beckman Coulter).

Datos estadísticos. Se realizó una prueba de ANOVA de dos factores usando el software GraphPad Prism 6.0 o R file para evaluar la significación estadística. Se restó el resultado de RPMI de cada ratón a partir de los resultados de activación de antígenos.

Diseño del estudio

T/W	Validación de Pharmajet de survivina 18-ONC-019 en ratones Balb/c (suero)	IN	PJ = sí	ADN = sí	
-----	---	----	---------	----------	--

Grupo	Tratamiento	Concentración	Dosis	Ruta	n.º de ratones	Vol.	ID de ratones	Crotal	D-0	D-7	D-14	D-28
								16/2/2018	26/2/2018	5/3/2018	12/3/2018	26/3/2018
A	Vector de control	2,52 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	7896 - 7901	Crotal / previo, pocos por combinación de grupo	1ª inmunización	2ª inmunización	3ª inmunización	Recogida de bazo y suero
B	Survivina +LAMP	3,4 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	7902 - 7907					
C	Survivina - LAMP pre-luminal	5,88 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	7908 - 7913					
D	D1 luminal de LAMP - survivina	2 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	7914 - 7919					
E	Survivina - dominio 1 luminal de LAMP	2 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	7997 - 8002					
F	Bisagra de LAMP - survivina	2 mg/ml	50 ug	Pharmajet	6	100 ul	8003 - 8008					

Figura 14: validación de los plásmidos: se transfectaron células 293T con los plásmidos durante 3 días. Se sometieron las células transfectadas a lisis y después se sometieron a electroforesis en gel de SDS-PAGE previamente colado. Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia con AcM frente a LAMP humana (OriGene, n.º TA337108) o survivina (Santa Cruz, n.º 17779). Peso molecular de LAMP = 100 KD, survivina = 16 KD. La figura 13 muestra que todos los constructos de LAMP sometidos a prueba produjeron proteína de tamaño apropiado.

Figuras 15 y 16: los constructos de LAMP sometidos a prueba inducen células T efectoras de Th1 que producen IFN γ . Se inmunizaron ratones BALB/c hembra i.d. con 50 μ g de los constructos indicados en 100 μ l de PBS mediante dispositivo Pharmajet en el día 0, 7 y 14. Se terminó el experimento 14 días tras la última dosis. Se estimularon esplenocitos (3x10⁵/pocillo) con péptidos combinados de survivina (4 μ g/ml) en medios de células T (RPMI con FBS inactivado por calor al 10 %, penicilina/estreptomycin al 1 %, y β -ME 1X) durante 48 h. A. Producción de IFN γ en puntos. B. Producción de IFN γ inducida por todos los péptidos combinados (figura de barras de A). n= 6 por grupo. Se usó ANOVA de dos factores (R file) para el análisis estadístico. La figura 14 muestra que todos los constructos de LAMP sometidos a prueba indujeron una respuesta de células T robusta tal como se muestra mediante producción de IFN γ .

Se encontró de manera inesperada que, después de 3 dosis de los constructos de LAMP mejorados (con una semana de separación), se produjo una respuesta de tipo Th1 robusta por los constructos de LAMP sometidos a prueba, especialmente ILC-4 en el que la secuencia bisagra estaba sustituida por gen de survivina. De manera más interesante, el constructo de LAMP mejorado ILC-4 parece reconocer los epítomos de survivina desde N-terminal hasta C-terminal, e inducir respuesta de células T frente a secuencia peptídica de survivina humana que es idéntica al 100 % al ratón. También se encontró una estimulación más prolongada (72 h) de esplenocitos congelados-descongelados con péptidos de survivina, ILC-4 mostró una producción de IFN γ significativa superior a la primera generación de LAMP-survivina (véase la figura 19). Específicamente, la figura 16 muestra que todos los constructos de LAMP mejorados sometidos a prueba mostraron una respuesta de células T superior teniendo ILC-4 la mejor actividad ya que este constructo produjo una respuesta de células T significativamente superior frente a todas las combinaciones de péptidos de survivina. Además, a diferencia de lo que se conocía en la técnica, la eliminación del segundo dominio de homología del dominio luminal creó un constructo de LAMP mejorado que produjo una respuesta inmunitaria más robusta en comparación con el constructo de LAMP completo (véanse los resultados para ILC-2 e ILC-3). Se estimularon esplenocitos congelados (4x10⁵/pocillo) con péptidos combinados 4 (4 μ g/ml) en medios de células T

(RPMI con FBS inactivado por calor al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y β -ME 1X) durante 48 h. n=6 por grupo. Se usó ANOVA de dos factores para el análisis estadístico. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,0001.

Figura 17. Las células T CD4 son la principal fuente de células productoras de IFN γ . Se inmunizaron ratones BALB/c hembra i.d. con 50 μ g de las vacunas indicadas en 100 μ l de PBS mediante dispositivo Pharmajet en el día 0, 7 y 14. Se terminó el experimento 14 días tras la última dosis. Se estimularon esplenocitos (1×10^6 /pocillo) con péptidos combinados 1 (4 μ g/ml) en medios de células T (RPMI con FBS inactivado por calor al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 % y β -ME 1X) durante la noche, seguido por adición de monesina y brefeldina A y cultivando durante 5 h adicionales. Se recogieron las células y se tiñeron mediante Zombie, marcador de superficie y tinción intracelular según el protocolo de tinción de ITI. Se clasificaron las células en células T CD4 de memoria (CD4+CD44+CD62L-) o células T CD8 (CD8+CD44+CD62L-). Los datos son representativos de un ratón en cada grupo. Aunque hay un aumento de células de memoria efectoras CD8 en los ratones vacunados con los diversos constructos, la producción de IFN γ es más pronunciada en la población de células T CD4.

Figura 18: los constructos de LAMP mejorados produjeron una respuesta de IgG total específica de survivina más intensa en ratones BALB/c. Se inmunizaron ratones BALB/c hembra i.d. con 50 μ g de las vacunas indicadas en 100 μ l de PBS mediante dispositivo Pharmajet en el día 0, 7 y 14. Se terminó el experimento 14 días tras la última dosis. Se extrajo sangre de los ratones en el día 28. Se separó el suero y se almacenó a -30°C. Se determinaron IgG total e IgG2a en suero mediante ELISA. En resumen, se recubrieron placas de ELISA con survivina 2 μ g/ml (1-142aa), se bloquearon con PBS/BSA al 2 %, se evaluó el suero (dilución 1:100 en tampón de bloqueo) mediante IgG de cabra anti-ratón conjugada con HRP (1:6000) e IgG2a (1:11000). n=6 ratones per grupo. **p<0,01, ***p<0,005, ****p<0,0001. De manera importante, y a diferencia de lo que se conocía en la técnica, la figura 18 muestra que fragmentos del dominio luminal funcionaron mejor que el uso del dominio luminal completo (es decir, comparando el constructo de LAMP completo con los constructos ILC-2 e ILC-3). Además, y de manera inesperada, la inserción del antígeno entre los dos dominios de homología del dominio luminal generó la respuesta de anticuerpos más intensa (véase, ILC-4).

Referencias en las que se basa esta sección.

1. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, *et al.* Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery*. 2004; 136(2): 443-8. doi: 10.1016/j.surg.2004.05.023. PubMed PMID: 15300213.
2. Zhang SQ, Qiang SY, Yang WB, Jiang JT, Ji ZZ. [Expression of survivin in different stages of carcinogenesis and progression of breast cancer]. *Ai Zheng*. 2004; 23(6): 697-700. PubMed PMID: 15191674.
3. Zhang X, Zhong L, Hu K, Li Q. [Expression of survivin and its correlation with apoptosis in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2004; 7(2): 138-41. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.02.14. PubMed PMID: 21215009.
4. Kishi H, Igawa M, Kikuno N, Yoshino T, Urakami S, Shiina H. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol*. 2004; 171(5): 1855-60. doi: 10.1097/01.ju.0000120317.88372.03. PubMed PMID: 15076293.
5. Asanuma K, Tsuji N, Endoh T, Yagihashi A, Watanabe N. Survivin enhances Fas ligand expression via upregulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells. *J Immunol*. 2004; 172(6): 3922-9. PubMed PMID: 15004200.
6. Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, *et al.* Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2003; 6(4): 217-24. doi: 10.1007/S10120-003-0255-2. PubMed PMID: 14716515.
7. Badana AK, Chintala M, Gavara MM, Naik S, Kumari S, Kappala VR, *et al.* Lipid rafts disruption induces apoptosis by attenuating expression of LRP6 and survivin in triple negative breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017; 97: 359-68. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.045. PubMed PMID: 29091885.
8. Cai JP, Wang YD, Zhang X, Xue HZ. [Expression of P16 and survivin in liver cancer and their clinical significance]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2017; 25(10): 778-80. doi: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.10.013. PubMed PMID: 29108210.
9. Cho HJ, Kim HR, Park YS, Kim YH, Kim DK, Park SI. Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based therapy. *Surg Oncol*. 2015; 24(4): 329-34. doi: 10.1016/j.suronc.2015.09.001. PubMed PMID: 26690822.
10. Godinho RM, Matassoli FL, Lucas CG, Rigato PO, Goncalves JL, Sato MN, *et al.* Regulation of HIV-Gag expression and targeting to the endolysosomal/secretory pathway by the luminal domain of lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) enhance Gag-specific immune response. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99887. doi: 10.1371/journal.pone.0099887. PubMed PMID: 24932692; PubMed Central PMCID: PMC4059647.

Ejemplo 4 - Tratamiento terapéutico de constructos de LAMP

Pueden inocularse ratones BALB/c hembra s.c. con 7000 células de carcinoma de mama 4T1 singénicas en el día 0. Se administran i.d. 50 ug de vacuna y 5 ug de GMCSF en 100 ul de PBS usando Nanopass una vez que los tumores son palpables. Se miden los tumores primarios con un calibre y se calcula el volumen tumoral usando la fórmula $p/6$ (longitud x anchura)^{3/2}. Puede medirse el volumen tumoral promedio en función de los días tras la inoculación de tumor. Puede usarse un gráfico de Kaplan-Meier para mostrar la supervivencia global en el punto de terminación.

Ejemplo 5 - Protocolo de sensibilización/refuerzo

El mediador de entrada de herpesvirus (HVEM), también conocido como miembro 14 de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFRSF14) o CD270, es un receptor de superficie celular humano de la superfamilia de receptores de TNF. En los últimos años, se ha encontrado que HVEM se expresa altamente en células hematopoyéticas y una variedad de células parenquimatosas, tales como células de cáncer de mama, melanoma, colorrectal y de ovarios, así como epitelio intestinal. HVEM es una proteína bidireccional, que o bien inhibe o bien estimula células T, mediante unión a BTLA o LIGHT (TNFSF14).

Se generó una vacuna de ADN que codificaba para HVEM-LAMP para generar un anticuerpo que puede bloquear la función inhibidora de HVEM para aplicaciones terapéuticas contra tumor. Se planteó la hipótesis de que LAMP fomentará la respuesta de anticuerpos potenciando la afinidad de anticuerpos específicos de HVEM y/o expandiendo el repertorio de epítomos de células B en la proteína de HVEM. En este estudio, se comparó la inmunogenicidad de plásmido que codifica para HVEM con y sin LAMP. La secuencia de HVEM:

Aminoácidos 39-202 de HVEM (SEQ ID NO: 114)

LPSCKEDEYPVGSECCPKCSPGYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIAHLNGLSKCLQCQ
MCDPAMGLRASRNCSTRNENAVCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGG
TESQDTLCQNCPPGTFSPNGTLEECQHQTCKSWLVTKAGAGTSSSHWV

Se diseñaron plásmidos que codifican para HVEM-LAMP y HVEM y proteína de HVEM recombinante por ITI y se produjeron por NTC (Lincoln, NE). Se clonaron polinucleótidos que codifican para la siguiente secuencia de HVEM en los constructos de LAMP mejorados descritos en el presente documento:

Se adquirió IgG-HRP de cabra anti-ratón de Southern Biotechnologies (Birmingham, AL). Se adquirieron sustrato de peroxidasa de micropocillos SureBlue TMB y disolución de parada de TMB de KPL (Gaithersburg, MD). Se pidieron placas de ELISPOT de EMD Millipore (Billerica, MA, n.º de cat. MAIPS4510). El par de anticuerpos para IFN- γ usado en ELISPOT se adquirió de BioLegend (San Diego, CA) y se usaron los clones AN18 y R46A2 como recubrimiento y detección, respectivamente. Se adquirieron estreptavidina-HRP y sustrato de AEC de BD Biosciences (San Jose, CA).

Se adquirieron ratones Balb/C hembra de seis a ocho semanas de edad de Harlan Laboratories (Frederick, MA) y se mantuvieron en una instalación para animales en Immunomic Therapeutics, Inc. (Rockville, MA). Se trataron los ratones (n=6) con 10 μ g/dosis de HVEM-LAMP, HVEM o control de vector de LAMP mediante administración i.m. por electroporación de Ichor en los días 0, 7 y 14. En el día 35, se administró un refuerzo a los ratones con 5 μ g de proteína de HVEM en presencia de alumbre mediante inyección i.p. En el día 28 y 49, se extrajo sangre de los ratones y se aislaron sueros para la detección de anticuerpos. Se sacrificaron los ratones en el día 56 y se sometieron a prueba los esplenocitos para detectar la producción de IFN- γ mediante ELISPOT.

Se siguió el procedimiento de ELISA de Su *et al.*, J of Immunol Res; (10): 1-15 (2016). Se recubrieron placas con proteína de HVEM 5 μ g/ml. Se analizaron los datos usando el software Microsoft Excel y Prism 6.

El objetivo primario de este estudio era comparar los perfiles de anticuerpos entre HVEM-LAMP y HVEM. En el día 28, los ratones vacunados con HVEM-LAMP produjeron un nivel significativo superior de anticuerpo de IgG específico para HVEM con respecto al del grupo de HVEM (figura 11). Tras un refuerzo con proteína, el anticuerpo específico para HVEM se aumentó aproximadamente 1000 veces en los ratones inmunizados con HVEM y el título medio cambió desde 100 hasta 108000. Este resultado indica que se indujo memoria inmunitaria mediante el plásmido de ADN de HVEM. Aunque el ADN de HVEM por sí solo indujo una respuesta de anticuerpos mínima, el refuerzo con proteína recuperó rápidamente la memoria inmunitaria. Por otro lado, el grupo de HVEM-LAMP mostró de nuevo un título significativo superior a los grupos de HVEM y LAMP, el título medio es 5 veces el del grupo de HVEM, lo que indica la potencia de LAMP para potenciar la respuesta de anticuerpos (figura 12).

Adicionalmente, se combinaron muestras de suero (día 49) de ratones inmunizados con HVEM+LAMP o HVEM solo/reforzados con proteína de HVEM y se sometieron a prueba para determinar el mapeo de péptidos. Se encontró

que doce péptidos se unían al suero combinado (reacción de IgG de ratón) y siete de los doce mostraron una fuerte afinidad de unión. HVEM+LAMP altera la afinidad de unión de los péptidos 17, 24, 25 y 28 en comparación con HVEM solo tal como se muestra en la figura 13. Estos cambios pueden tener efectos fisiológicos en la protección del crecimiento tumoral.

En conclusión, los datos de este estudio sugieren que se expresaron dos constructos *in vivo* y LAMP mejoró significativamente la respuesta inmunitaria humoral.

Ejemplo 6 - Producción de un anticuerpo a partir de un polipéptido

Pueden prepararse anticuerpos anti-antígeno mediante una variedad de métodos convencionales de producción de anticuerpos usando inyección en animales (véase, Current Protocols, capítulo 2). Por ejemplo, se administran células que expresan un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno descrito en el presente documento a un vertebrado no humano para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. En un método preferido, se prepara una preparación de la proteína de LAMP/antígeno y se purifica para hacer que esté sustancialmente libre de contaminantes naturales. Entonces se introduce una preparación de este tipo en el vertebrado no humano para producir antisueros policlonales de mayor actividad específica.

En el método más preferido, los anticuerpos anti-antígeno de la presente invención son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión a proteína de los mismos). Tales anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 511 (1976); Kohler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6: 292 (1976); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., págs. 563-681 (1981)). En general, tales procedimientos implican inmunizar un animal vertebrado no humano (preferiblemente un conejo, ratón, vaca, camello, llama) con un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno, el polipéptido codificado de un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno o, más preferiblemente, con una célula que expresa constructo de LAMP mejorado. Tales células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo tisular adecuado; sin embargo, es preferible cultivar células en medio de Eagle modificado por Earle complementado con suero bovino fetal al 10 % (inactivado a aproximadamente 56 grados C), y complementado con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1.000 U/ml de penicilina y aproximadamente 100 ug/ml de estreptomycin.

Se extraen los esplenocitos de tal huésped vertebrado no humano (por ejemplo, ratones) y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Puede emplearse cualquier línea celular de mieloma adecuada según la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular de mieloma original (SP20), disponible de ATCC™. Tras la fusión, se mantienen selectivamente las células de hibridoma resultantes en medio HAT y después se clonan mediante dilución limitante tal como se describe por Wands *et al.* (Gastroenterology 80: 225-232 (1981)). Después se someten a ensayo las células de hibridoma obtenidas mediante una selección de este tipo para identificar clones que secretan anticuerpos que pueden unirse al antígeno.

Se apreciará que pueden usarse Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos anti-antígeno según los métodos dados a conocer en el presente documento. Tales fragmentos se producen normalmente mediante escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Alternativamente, pueden producirse fragmentos de unión a proteína secretados mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante o mediante química de síntesis.

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Tales anticuerpos pueden producirse usando constructos genéticos derivados de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos (véase, para revisión, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4: 214 (1986); Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Taniguchi *et al.*, documento EP 171496; Morrison *et al.*, documento EP 173494; Neuberger *et al.*, documento WO 8601533; Robinson *et al.*, documento WO 8702671; Boulianne *et al.*, Nature 312: 643 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314: 268 (1985)).

Ejemplo 7 - Uso de polinucleótidos para generar anticuerpos monoclonales y policlonales

En la técnica se describen bien métodos de inyectar directamente polinucleótidos en animales. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5.676.954; 6.875.748; 5.661.133. Por ejemplo, puede inyectarse un polinucleótido que codifica para un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno en los músculos del cuádriceps de ratones despiertos sujetos (BALB/c o desnudos, nu/nu, hembra de 6-12 semanas de edad de Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, Ind.). En una realización, pueden usarse 50 µg de un polinucleótido en 50 µl de disolución usando una jeringa para insulina de plástico estéril, desechable, y una aguja 28G ½ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J., n.º de cat. 329430) equipada con un collar de plástico recortado de una punta de micropipeta para inyectar a los ratones, tal como se describe en Hartikka, J., *et al.*, Hum. Gene Ther. 7: 1205-1217 (1996).

Alternativamente, puede administrarse a ratones hembra Sprague Dawley de 6 semanas de edad (peso corporal de 20-25 gramos) 5000 ppm de ZnOSO₄ en su agua para beber comenzando 24 horas antes de la inyección. Se ha

mostrado que esta cantidad de cinc puede activar el promotor de metalotioneina. Después se inyectan a cada ratón por vía intravenosa, mediante punción en la vena de la cola, con una aguja de calibre 25, 30 µg de un polinucleótido que codifica para un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno complejo 150 µg de liposoma (Lipofection TM) en un volumen total de 30 µl. Debe mantenerse el cuidado de los animales a lo largo de todo el estudio y debe realizarse cumpliendo con la guía "Guide for the Use and Care of Laboratory Animals", Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press.

Tras suministrarse el polinucleótido inyectado que codifica para el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno en las células en el animal, se suministra el antígeno al endosoma/lisosoma, se procesa y se presenta al sistema inmunitario. Entonces, el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno puede estimular la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno. Estos anticuerpos pueden aislarse y usarse como mezcla policlonal o aislarse adicionalmente para dar especies individuales o compuestos monoclonales. El proceso de la respuesta inmunitaria y producción de anticuerpos frente a antígenos foráneos *in vivo* se conocen bien en la técnica.

En un tercer modelo de animales, se transfectan células 3T3 A31 de Balb/c mediante electroporación con un polinucleótido que codifica para un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno. Se identifican clones resistentes a G418 que expresan constructo de LAMP que comprende un antígeno mediante su capacidad para unirse a RBC humanos. Para generar anticuerpos policlonales, se inmunizan ratones Balb/c dos veces por vía intraperitoneal, a un intervalo de 14 días, con 10^7 células que comprenden el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno. Tras un refuerzo final, se recoge el suero inmunitario, se purifica IgG mediante proteína G-Sepharose y se hace pasar sobre una columna de antígeno preparada acoplando 1,0 mg de antígeno purificado a Sepharose CL-4B activado con bromuro de cianógeno. Puede eluirse IgG unida con tampón de glicina 0,1 M, pH 2,5, y neutralizarse con 0,1 volúmenes de Tris 0,1 M, pH 8,0. Para generar un anticuerpo monoclonal (AcM), se inmunizan ratones Balb/c con constructo de LAMP que comprende un antígeno y se generan hibridomas mediante fusión de células de bazo inmunitarias con el mieloma SP2 siguiendo métodos convencionales (28). Puede identificarse un pocillo positivo que reacciona específicamente con un antígeno mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas tal como se describe en la técnica. Se clona el hibridoma tres veces mediante dilución limitante para producir un anticuerpo.

Ejemplo 8 - Inmunización de un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno

En la técnica se conocen bien métodos de producción de anticuerpos en mamíferos. En un ejemplo, se produce antisuero policlonal frente a constructo de LAMP que comprende un antígeno mediante inmunización de conejos libres de patógenos con un total de 500 µg de un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno a lo largo de un periodo de dos meses. Por ejemplo, el constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno puede disolverse en PBS y emulsionarse con un volumen igual de adyuvante de Freund. Tras el refuerzo final, puede separarse el suero de los conejos para determinar el título del antisuero policlonal.

En un modelo de animales adicional, pueden inmunizarse grupos de 5 ratones (C57BL/6J; Jackson Labs) por vía subcutánea con 5 µg de constructo de LAMP libre de endotoxina que comprende un antígeno emulsionado en alumbre. Tres semanas después, se extrae sangre de los ratones y puede determinarse la presencia de anticuerpos específicos anti-antígeno determinando el título de los sueros mediante ELISA (unión directa de anticuerpos en sueros a BPTI de tipo natural o APP-KI recubierto, directa o indirectamente (mediante una etiqueta biotinilada y estreptavidina), sobre los pocillos).

Para obtener anticuerpos monoclonales, pueden inmunizarse ratones Balb/c de 4-6 semanas de edad con un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno (por ejemplo, 4 veces con intervalos de 2 semanas con 10-100 µg/inyección disueltos en adyuvante completo de Freund para la primera inyección, y adyuvante incompleto de Freund para las inmunizaciones posteriores). Se aíslan esplenocitos y se fusionan con una línea celular de fusión tal como células de mieloma Sp2/0, seguido por dilución limitante. Se examinan clones en crecimiento usando, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se recubren placas de 96 células con un constructo de LAMP mejorado que comprende un antígeno o con una proteína de control. Se añade el sobrenadante de cultivo, seguido por lavado y adición de un anticuerpo anti-ratón marcado para su detección. Tras clonación por dilución limitante del anticuerpo anti-antígeno se obtienen hibridomas estables productores. A partir de cada célula, se recoge el sobrenadante y, mediante cromatografía por afinidad usando columnas de proteína A-Sepharose, pueden purificarse anticuerpos monoclonales.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de LAMP que comprende dos dominios de homología de un dominio luminal de una proteína LAMP, y un dominio antigénico, en el que el dominio de antígeno está colocado entre los dos dominios de homología, y en el que el constructo de LAMP comprende además un dominio transmembrana y una cola citosólica de una proteína LAMP.
2. El constructo de LAMP según la reivindicación 1, en el que el constructo de LAMP comprende además una secuencia señal, preferiblemente en el que la secuencia señal se deriva de una proteína LAMP.
3. El constructo de LAMP según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína LAMP se selecciona de LAMP-1, LAMP2, LAMP-3, LIMP 2, macrosailina, endolina, LAMP5 o LIMBIC.
4. El constructo de LAMP según la reivindicación 3, en el que la proteína LAMP se selecciona de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-113.
5. El constructo de LAMP según la reivindicación 4, en el que la proteína LAMP es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a SEQ ID NO: 1-113.
6. El constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el constructo de LAMP comprende dominio de homología 1 de LAMP-1 y dominio de homología 2 de LAMP-1.
7. El constructo de LAMP según la reivindicación 6, en el que el dominio de homología 1 de LAMP-1 comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 29 a 194 de SEQ ID NO: 1.
8. El constructo de LAMP según la reivindicación 6 o 7, en el que el dominio de homología 2 de LAMP-1 comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 228 a 381 o a 382 de SEQ ID NO: 1.
9. El constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el dominio antigénico es survivina.
10. El constructo de LAMP según la reivindicación 9, en el que el constructo de LAMP comprende SEQ ID NO: 119.
11. El constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el dominio antigénico es HVEM.
12. Un polinucleótido que codifica para el constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
13. El polinucleótido según la reivindicación 12, en el que el polinucleótido es ADN.
14. El polinucleótido según la reivindicación 12, en el que el polinucleótido es ARNm.
15. Una célula huésped que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14.
16. Una composición que comprende el constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, o la célula huésped según la reivindicación 15.
17. El constructo de LAMP según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, la célula huésped según la reivindicación 15, o la composición según la reivindicación 16, para su uso en vacunación.
18. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según la reivindicación 17, en los que la vacunación comprende una etapa de sensibilización y al menos una etapa de refuerzo.
19. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según la reivindicación 18, en los que el constructo de LAMP se usa en la etapa de sensibilización.
20. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según cualquiera de la reivindicación 18 o 19, en los que la etapa de refuerzo comprende la administración de un antígeno, el constructo de LAMP, un polipéptido codificado por el constructo de LAMP, o una célula que comprende el constructo de LAMP.

21. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en los que el antígeno usado para la sensibilización es el mismo que se usa para el refuerzo.
- 5 22. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en los que el antígeno usado para la sensibilización se deriva de la misma proteína que un segundo antígeno usado para el refuerzo.
- 10 23. El constructo de LAMP, polinucleótido o célula huésped para su uso en vacunación según una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en los que se usa más de un antígeno para la sensibilización y/o el refuerzo.

Figura 1

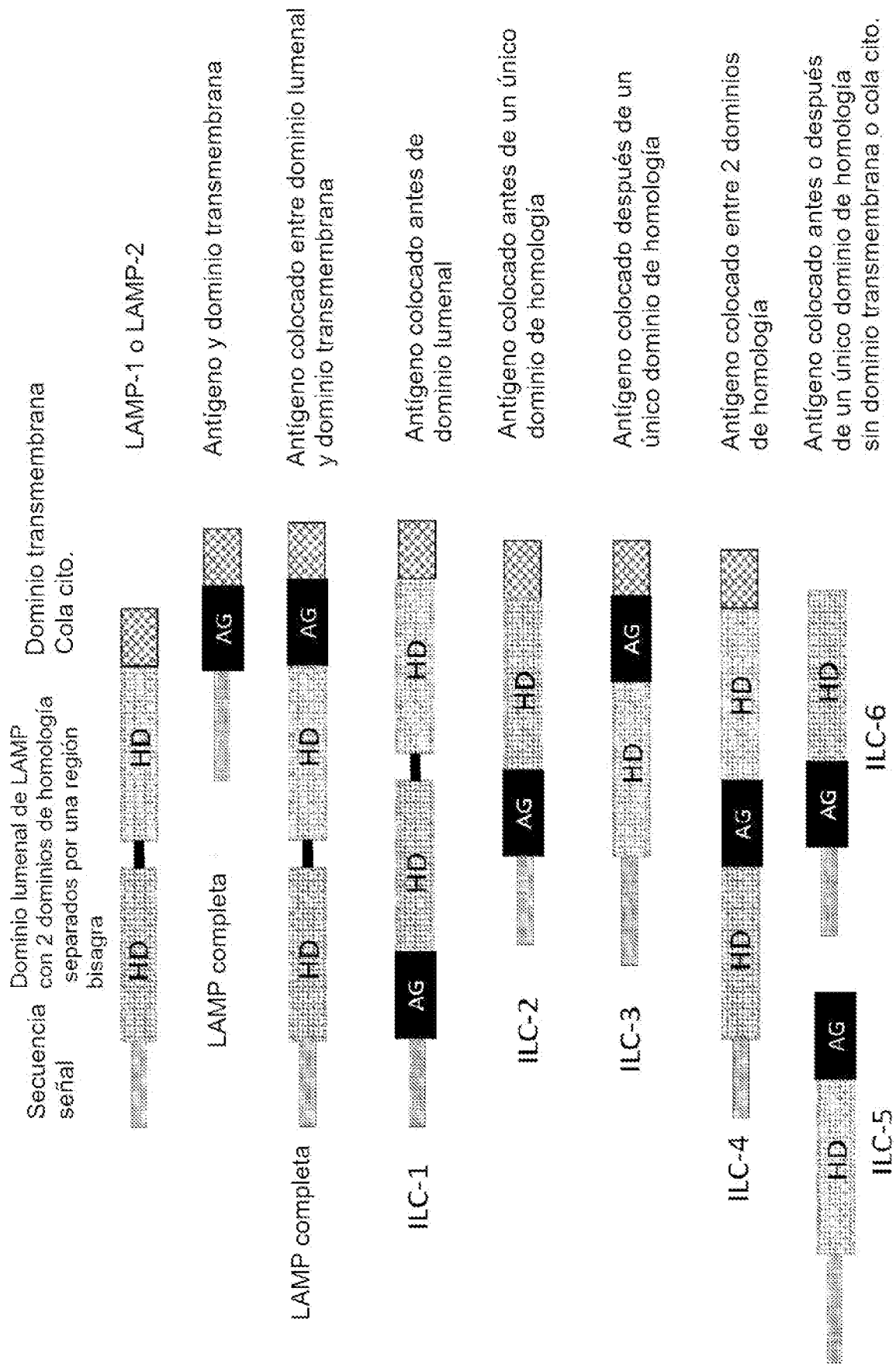


Figura 2A

Nombre de gen n.º de registro	Nombres alternativos	SEQ ID NO.	Ortólogos	Secuencia señal	Dominio luminal				Cola citoplasmática
					Primer dominio homólogo	Región bisagra	Segundo dominio homólogo	Dominio transmembrana	
LAMP-1 h. NP_005552.3	CD107a; LAMPA; LGP120	1	SEQ ID NO: 6-24	1-28	29-194	195-227	228 a 381 o 382	382 o 383 a 405	406-417
LAMP-2 h. NP_002285.1	CD107b; LAMPB; LGP110	2	SEQ ID NO:25-43	1-28	29-192	193-228	229-375	376-399	400-410
LAMP-3 h. NP_055213.2	CD208; DC LAMP; DC- LAMP; DCLAMP; TSC403	3	SEQ ID NO:44-55	1-27	28-219	220-234	235-381	382-402	403-416
LIMP-2 Q14108	AMRF; EPM4; LGP85; CD38L2; HLGP85; LIMPII; SR-BII; SCARB2	4	SEQ ID NO:56-66	*5-27 Transm em. *No escindible		28-433		434-459	460-478
Endolina h. NP_006007.2	Sialomucina CD184 MUC-24	5	SEQ ID NO:73-79	1-23		24-182		183-183	184-197
Macrosiallina NP_001242.2	CD68	60	SEQ ID NO: 81-92	1-21		22-319		320-344	345-354

Figura 2A continuación

LAMP5 NP_036393	ED-LAMP	93	SEQ ID NO: 94-101	1-28	30-235	236-255	257-280
LIMBIC h. NP_002329.2	LSAMP IGLON3	67	SEQ ID NO: 68-72 y 102-113	1-28	29-315	316-338	Sin cola

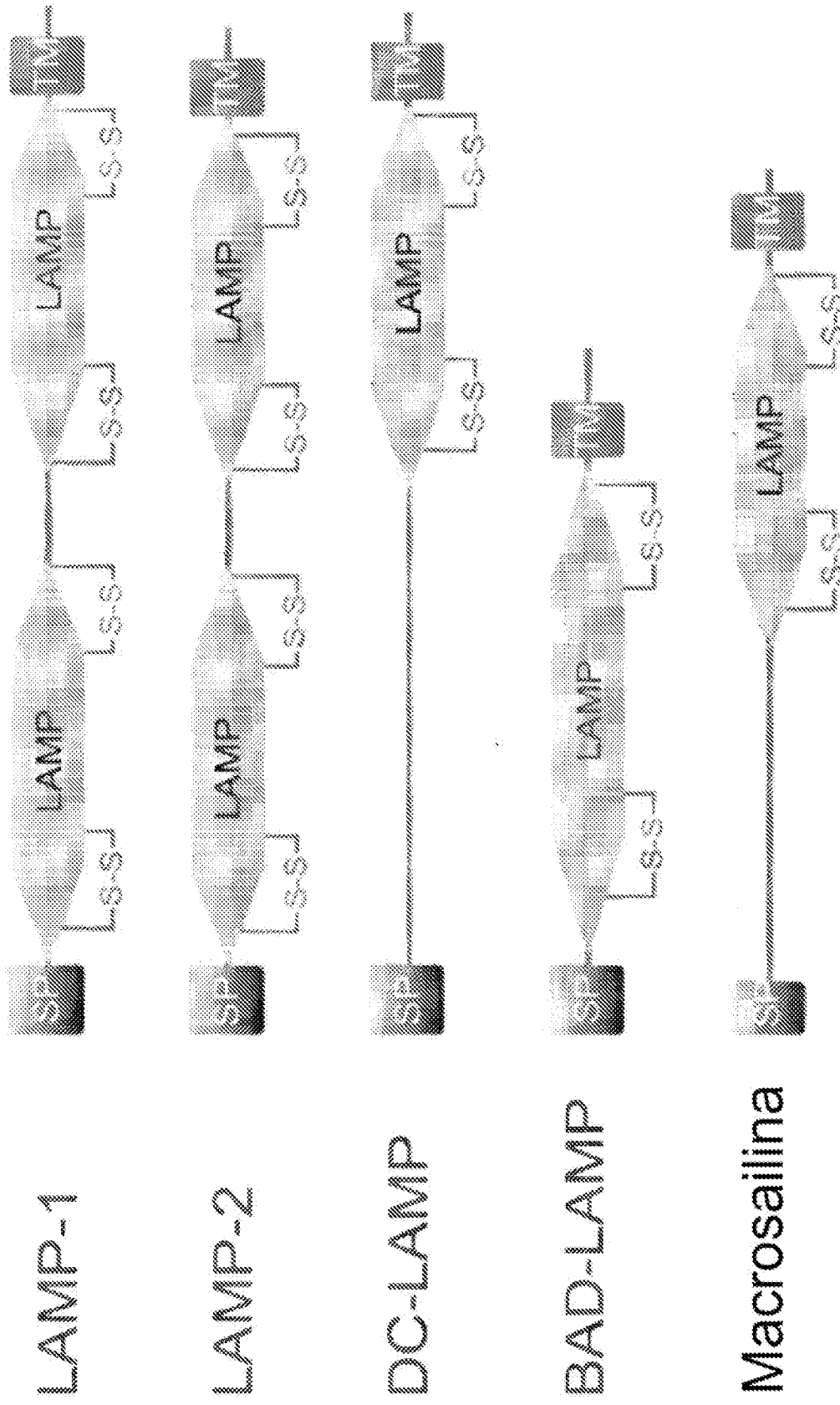


FIGURA 2B

FIGURA 3: ALINEACIÓN DE LAMP-1 HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

SECUCENIA SEÑAL	DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP
SEQIDNO: 1	MAAPGSAARRPRLLL-LLLLGLGIVH--CASA-NTAVVNGI-GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 6	MAAPGAP-PPIL-----LLLLAGLGH--GASALFEVR--NN-GTTCIMASFSASFLITYETAN
SEQIDNO: 7	-----MARAAG-VCWTLIMGCVFA-AHAVTTFEVTGDN--STCIKGLNASFSISYNTTN
SEQIDNO: 8	--MSWPQVQMPVYWMMAVMLLIGVQ-VATAVQFEVRDGNITTCILADLSINFEVSINV33
SEQIDNO: 9	MAAPGSAARRPRLLL-LLLLGLGIVH--CASAAMFMVKGHN--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 10	MAAPGSAARRPRLLL-LLLLGLGIVH--CASAAMFMVKGHN--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 11	MAAPGSAARRPRL--LLLLAGLGH--GAAAVFVVRDAN--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 12	MAAPGSAARRPRLLL--LLGLGIVH--GASAVFVVRN3N--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 13	MAAPGSAARRPRLLL--LLGLGIVH--GASAVFVVRN3N--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 14	MAAPGAR-RPIL--LLLLAGLGH--SAPALFEVKNH--GTACIMASFSASFLITYDASH
SEQIDNO: 15	-----MGGA--RAVLLGFL--QASSFEVRDST-GKVCILANLTVAFSVEYK3SG
SEQIDNO: 16	MAAPGSAARRPRLLL-LLLLGLAR--GASAVFVVRDGN--GTACIMADFAAASFLITYDST
SEQIDNO: 17	MAEPGCAPTPQRL--LLLLGLIN--VASSIFVVENGT--GTACIMANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 18	-----MAKALL--AAVLLGFL--QASSFEVRDST-GKVCILANLTVAFSVEYK3SG
SEQIDNO: 19	-----MARGLLA--AAALLGFL--QASSFEVRDST-GKVCILADLTVAFSVEYK3TNV
SEQIDNO: 20	MVSSSSCPRLLL--AAVLLGFL--QASSFEVRDST-GKVCILANFSAASFLITYETAN
SEQIDNO: 21	MKEFFSFVALPI-VCSAVLADT-----QAVVTLVKEGN--STCIKAEP3AVFSITYNTTN
SEQIDNO: 22	MKEFSAIIVL-I-TANFSLGCG--IQAVSLEVKEGN--STCIKANLSAYFSITYNTTN
SEQIDNO: 23	NRTFCFFVVC-I-AC-PAILOCVTVVQSVTLVTEGN--STCIKAEL3ASFSITYNTTN
SEQIDNO: 24	-----

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

SEQIDNO:1	GGQIVNISLEPAAEVLKNGSSCGKENVSDPSLITTFQPGGY---LITLNFPTNATRYSVQHM	110
SEQIDNO:6	GGQIVNISLEPAAEVLKNGSSCGKENVSDPSLITTFQPGGY---LITLNFPTNATRYSVQHM	110
SEQIDNO:7	GTSVGVTFALPASASYSE--RSSCGG-AAVPEPELALVFGDTHHTFLSILLFQRDQRLYEVSMI	109
SEQIDNO:8	KMLATTFVLFPSEAVTNINKSSCGVENTTAPVLAIQFGSNH---SLSIHFARNNTRYEVAREL	116
SEQIDNO:9	GPKNMTFDLPSDAITVNLNPSGCGKENTSDDSLVIAFGRGH---TITLFTPNATRYSVQLM	116
SEQIDNO:10	GPKNMTFDLPSDAKVVLNLSGCGKENTSDDSLVIAFGRGH---TITLFTPNATRYSVQLM	116
SEQIDNO:11	GPKNVTFDLPSDA--VVLNBSGCGKENTSDDSLVIAFGRGH---GLTINFTPNATRYSVQLM	112
SEQIDNO:12	GYNNASFELPATA--EVQNTSSCGRENTSNPSLQIAFGRGH---VLALNFTPNATLYSVPLI	111
SEQIDNO:13	GPQNKSFELPAGA--EVSNSGCGKENASDSSLVITFGRGH---TITLFTPNATRYEVQLM	112
SEQIDNO:14	VSKVSNMTLEPAAEVLKNSGCGKENASEPTLAITFGEGY---ALKLFTYNTTRYSVQHM	111
SEQIDNO:15	QKQFAHFFLPQNATSQ--SHSSCGEGNTSHPIALSPGAGH---LISLNFSETLDRKYQVEEL	103
SEQIDNO:16	GKANTTFLEASA-QVIMSSCGKENTSDDSLVIAFGRGH---TITLFTPNATRYSVQLM	113
SEQIDNO:17	GLESTTFPLPQNA--EVSNSGCGKENTSHPILSLFGEGGH---TITMFAETTRYQVQVELL	112
SEQIDNO:18	QKQFAHFFLPQNATSQ--SHSSCGEGNTSHPIALSPGAGH---LISLNFSETLDRKYQVEEL	104
SEQIDNO:19	QKEFYHFFLPQNASVD--SQSSCGKENASHPIVLDFEGGH---SLSLNFSESLDRKYQVEEL	105
SEQIDNO:20	KVEKTFPLPSSAHINKSSGCGKENETSQVLVVEFPTGN---SLVTFTEKANDFYHVSNI	112
SEQIDNO:21	DTRTVSVLEPNSTTFVDGANSSCGS--NGSTPGLMAKTGPGH---YFGMNFSTNGSLYSVDTL	110
SEQIDNO:22	STRTAQFILDPSATVDFLSSTCGG--NGSFPWLVAVFGAGH---ALGLGFSTNGSFYEVANL	109
SEQIDNO:23	GTRTQVVELPGSAVGV--ASSCGG-DGRSPWLVAVFGDGH---ALGLGFASNDLSYEVAKL	111
SEQIDNO:24	GGQIVNISLEPAAEVLKNGSSCGKENVSDPSLITTFQPGGY---LITLNFPTNATRYSVQHM	110

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

	3	
SEQIDNO:1	YVYNLSDTHLFFNASSK-EIKT-VESITDIKADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLGDA	173
SEQIDNO:6	YFTYNLSDTHLFFNASSK-EINT-KGSTTDIKADINKAYRCVSDIEVYHKN-VTVTLGDA	167
SEQIDNO:7	SLQYNLSDGDIFFQSSAGVQSVMAFVSELMASRLNSTYRCVSSSSISLSAAVNLTLGCV	168
SEQIDNO:8	VMSYNLSDKIIFDNASENGTKTV-STNKTAVIAENDTVYECMDHLIEMDN-ANATFHDI	174
SEQIDNO:9	SEVYNLSDTHLFFNASSK-EIKT-VESITDIKADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLGDA	173
SEQIDNO:10	SEVYNLSDTHLFFNASSK-EIKT-VESITDIKADIDKKYRCVSGTQVHMNN-VTVTLGDA	172
SEQIDNO:11	SFIYNLSDTQIFFNASSK-ETKT-VESATDIPADINKKYRCVSNQIHMNN-VTVTFHNV	169
SEQIDNO:12	SEVYNLSDSLFFNASSK-DINT-VGSTTDIKADIDKKYRCVSDSKVPMGN-VTVTLGDA	168
SEQIDNO:13	RFAYNLSDTDTFENSSTT-GVKT-VESATDIKADINKTYRCVSETQVHMNN-VTVTLGDA	169
SEQIDNO:14	YFTYNLSDTQFFNASSK-GFLT-VDSTTDIKADINKTYRCVSDIEVYHKN-VTVTLGDA	168
SEQIDNO:15	TFHYNLSDETLFFNATEG-KVMV-ATQKSVIQARIGTEYRCINSKXVPMKN-VNITFENV	160
SEQIDNO:16	TLVYNLSDAEFFPSASSK-GTNT-VAASTDIKADLNTHYRCVSNQVHLLN-VTVTLGNA	170
SEQIDNO:17	SFIYNLSDATLFFNASKGSESS-VKSTTDIQADINKKYRCVSNRIEMSN-VTVLSDV	170
SEQIDNO:18	TFHYNLSDETLFFNASEG-KVME-VTQKSVIQARIGTEYRCINSKYIYLER-VNITFENV	161
SEQIDNO:19	VHYNLSDATLFFNASTG-EMKT-VSHKSLIQASNGTQYRCINSKRIHNN-VNITFENV	162
SEQIDNO:20	TFHYNLSDSSEFFNSSG--GQPE-VSRAGDIQANINTTYRCRSNHRVMMN-VTVLFSNV	168
SEQIDNO:21	FLRYNLSDASLFFPEANSSGFVDFELASVGIWAPTNTTYRCLSPTTITITR-PSVTFSEM	169
SEQIDNO:22	TLQYNLSDASVFFLANSSGVTV-VSSVGIWAAVNTTYRCLSSVLPQYGG-ATVTFSDM	167
SEQIDNO:23	TLQYNLSDVSNFFPEANSTGVTV-FTSVGNVAVNTTYPCISASVIVGG-ATVTFENV	169
SEQIDNO:24	-----	0

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

REGIÓN BISAGRA

	4	
SEQIDNO:1	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTGP-----PSP-SP----SPVPKSPS	218
SEQIDNO:6	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTGP-----PSP-SP----PLVPTNPT	209
SEQIDNO:7	QMEAYMSSANLSADESVCSADQPSSTTVAPSPPTT-----TSPPPIPFVPE	213
SEQIDNO:8	RLEAYLQSNFVSQKVSCTC3EDITPTSAPA-EV--T-----T-----TAPVPAP-VEDEE	219
SEQIDNO:9	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SPVPKSPS	218
SEQIDNO:10	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SPVPKSPS	217
SEQIDNO:11	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SEAPESPS	214
SEQIDNO:12	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SEAPESPS	219
SEQIDNO:13	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SEAPESPS	210
SEQIDNO:14	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----PLVPTNPT	210
SEQIDNO:15	TLEAYETNGTFSANKTECREDMVSTTVAPTTPKH-----ITSQVPAFSPAPTAAPSPA	215
SEQIDNO:16	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SEAPESPS	214
SEQIDNO:17	TIQAYLSSGNFSKEETRCQDQPSPTTAPPAP-----PSP-SP----SEAPESPS	224
SEQIDNO:18	TLEAYETNGTFSANKTECREDMVSTTVAPTTPKH-----ITSQVPAFSPAPTAAPSPA	216
SEQIDNO:19	TLEAYETNGTFSANKTECREDMVSTTVAPTTPKH-----ITSQVPAFSPAPTAAPSPA	216
SEQIDNO:20	TLEAYLNNAPSKNDVCAEDNTSEVA--PFIITH-----IPTTTSLAPPT-PPPTDTPK	220
SEQIDNO:21	KLEAXMPGNDFSPASRVCAADQTTTGAFTTT-----SAATP-TT-PSPTTAGEPE	218
SEQIDNO:22	RLEAXMPGNDFSPASRVCAADQTTTGAFTTT-----SAATP-TT-PSPTTAGEPE	221
SEQIDNO:23	TMEAFMTGEDLSPNESVCTADQSFITAPPPPPS-----TTTAA-PA-EVPTTGGTSP	219
SEQIDNO:24	-----MVQICRVQSWFVGVTPLLIYATVVLHQGFATVAF-PTTAPPKRGRPE	46

BISAGRA

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

	1	2	
SEQIDNO:1	VDKYNVSGT	CLLASMGLOQLNITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAILV	276
SEQIDNO:6	VSKYNVTGNNGT	CLLASMGLOQLNITYE-RKDNTTVTRAFNISPNET-SSGSCGINLVTL	266
SEQIDNO:7	RGHYSVTDGNSTVCVLALMGLOQLNITYE-TTQNGSVSELANLQPNQTTVS	SSGSCGVTESSL	272
SEQIDNO:8	WQYSVNRSSSEP	CLLAKVQLQNNITYE-TADGNGSYVFNIKSKMTVDGMCNTTAYL	277
SEQIDNO:9	VDKYNVSGTNGT	CLLASMGLOQLNITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAILVTL	276
SEQIDNO:10	VDKYNVSGTNGT	CLLASMGLOQLNITYE-RKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAILVTL	276
SEQIDNO:11	VHKYNVSGANGT	CLLASMGLOQLNITYE-RKDNTTVVKVVSINPNKTIAGGSCGAILVTL	272
SEQIDNO:12	VSRYNVSDGNAT	CLLASMGLOQLNITYE-HKDNTTVTRFVNINPNKTFPSGRCGAGQVTL	277
SEQIDNO:13	VFRYNVSGSNGT	CLLASMGLOQLNITYE-RVDNKTPTREFVNPNKTTFGGNCATLATL	268
SEQIDNO:14	VSKYNVTGDNGT	CLLASMGLOQLNITYE-KKDNTTVTRAFNINPSDK-YSGTCSAQLVTL	267
SEQIDNO:15	VGKYNVTGANCT	CVLASMGLOQLNITYE-KKDEMGLOLLNFIPIHTSASGMCSTSAFL	273
SEQIDNO:16	VSRYNVSGANGT	CLLASMGLOQLNITYE-TADNTTVTRGLNINPNKTTFGGSCGAILVTL	272
SEQIDNO:17	IFKYNVSDANGT	CLLASMGLOQLNITYE-KKDNSSARLIWNINPNKTVAGGSCSPQVATL	282
SEQIDNO:18	VGKYNVTGANCT	CVLASMGLOQLNITYE-KKDQKTGLDLINFPHTNASGTCENTSAFL	274
SEQIDNO:19	VGKYNVTGPNCT	CVLAYMGLOQLNITYE-QKDEMGLOLLNFPHTTSAGRCINTSALL	274
SEQIDNO:20	IGRYNVTFGLHGI	CLLATMGLOQNVNITYE-TKNKTSKSELLNLPP-TAEVSGTCENESITL	277
SEQIDNO:21	QGSYSVKNASGTVCLMAKMGVQLNVSYFSSQSNKTVQELLNLTPNLTFSSSGLOGGTNATL		278
SEQIDNO:22	RGTYSVVNGNDTCLLAQMGLOQLNVSYFSSQSNKTVQSLVNLTPNLNSTGSCCKGSATL		281
SEQIDNO:23	QGSYSVSNNGSTVCLLAPMALQNLNISHFSASQNKTIQEVNALLPNQTTSSGSCSPFSATL		279
SEQIDNO:24	RGYYNVTNHNGTICLMAVMGLOQLNISYNSTSSQKVVVQVMNLQPNLTRHSGLCDEBIASL		166
	.	*:* :(:*::)	: . *

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

SEQIDNO:1	ELHS-EGSTVLLPQFGMNASSSRFFLQGIQLNNTLP-DARDEPAFKAANGSLRALQATVGN	334
SEQIDNO:6	KVEN-K-NPAHELQFGMNASSSRFFLQGVQLNMTLP-DALVPTFSISNHLRALQATVGN	323
SEQIDNO:7	ELSD--ETPNLTFSTTNSTTKYYLSAVSVSALWP-DMK-VVFEAGNTSLALQCEVGR	328
SEQIDNO:8	ELST-GS-IDLEPNFTLNSSLEVFYLDGVSLSTGLPADANTHFEAANGSLNVMQENVHK	325
SEQIDNO:9	ELHS-EGSTVLLPQFGMNASSSRFFLQGIQLNNTLP-DARDEPAFKAANGSLRALQATVGN	334
SEQIDNO:10	ELHS-EGSTVLLPQFGMNASSSRFFLQGIQLNNTLP-DARDEPAFKAANGSLRALQATVGN	333
SEQIDNO:11	ELRS-ESVTLIAQFGMNASTSRFFLQGIQLNMTLP-DARDETFKAGNHLRALQATIGN	330
SEQIDNO:12	ELQS-ERSTVLNPFQFGMNASSGQYFLQGVILNNTLP-DAREPAFKAANGSLRALQATIGN	335
SEQIDNO:13	ELHS-ENLLILLALQFGMNASSSRVFLQGVQLNMTLP-DAKEGFTATNSLRALQATAGN	326
SEQIDNO:14	EVGN-K-SRVLELQFGMNASTSRFFLQGVQLNMTLP-DATERTFTSTNYSILKALQAEVGN	324
SEQIDNO:15	NLAF-EK-TRITTFVNLASSEKFFLQGVNVSTTLPSAKAPTFEASNDMSSESRATVGN	331
SEQIDNO:16	ELQS-ESLRILLALQFALNTSSSRVFLQGVQLNMTLP-DARDFSFSAANGSLRALQATAGN	336
SEQIDNO:17	ELQT-EN-STLAFSPGQWATTSKFFLREIRPHKFFP-DAKEPAFGAVNSSLKELQATVGN	339
SEQIDNO:18	NLAF-EK-TRITTFVNLASSEKFFLQGVNVSTTLPSAKAPTFEASNDMSSESRATVGN	332
SEQIDNO:19	NLTF-EK-TRVIFQFALNATAEKFFLQGVNVSTTLPSAKAPTFEATNMSSELRASVGN	332
SEQIDNO:20	NLTS-ES-TSLSPQFSQNTSTKRYFLQGIIVTANLPPEATEKNTSYENKTLNALKTSVCK	335
SEQIDNO:21	VLAQ-RETFVLSFLFTVNSTSNRYHLSGLITLQANWT-DMH-SFFSASNTSLBYLSSSLGH	335
SEQIDNO:22	ILTQ-Q-TTILITPFSINSTSSRYHLSGLSLQANWS-DMH-AAFSASNASLSYLRSTFGH	337
SEQIDNO:23	VLTQ-ANAFNLGLFTLNSTSNRYNLGLSVVAWS-LMT-APFNTSLSBYQPCSLGR	336
SEQIDNO:24	NLTVDAVKTNLTPVTMNSTSNRYHLSRVTVSAWAP-EMK-EPVGVNSELBYLRGTVCY	164
	: : * * :	: * : :

	DOMINIO DE HOMOLOGIA 2 DE LAMP	Dominio trans.
SEQIDNO:1	SYKCNAAEEHVPVTKAPSVNI FVWVQAFKVEGGQFGSVEECVLDDENNMILIPIAVGGALAG	394
SEQIDNO:6	SYKCNTEEHIFVSKMLSLNVFVSVQVQAFKVEGSDRFGSVEECVQDGNMMLIPIAVGGALAG	398
SEQIDNO:7	SYVCSAQQMLSVTFVFSINTFRLQLQDFNITANRFPSTAEECRVQDGNMMLIPIIVGAALAG	398
SEQIDNO:8	SFKNSKQTLQITDPTFTWVTVHLQVQAFNSD-NTFASAVECSLDENGMVFIIVGAALAG	394
SEQIDNO:9	SYKCNAAEEHVPVTKAPSVNI FVWVQAFKVEGGQFGSVEECVLDDENNMILIPIAVGGALAG	394
SEQIDNO:10	SYKCNAAEEHVETKAPFVNI FVWVQAFKVEGGQFGSVEECVLDDENNMILIPIAVGGALAG	393
SEQIDNO:11	RYKCNAGEHVQVTEAFSVNI FVWVQAFVQGGDKFGSVEECQLDENNMILIPIAVGGALAG	390
SEQIDNO:12	SYKCNSEEHVPVTFAPSLSI FVWVQAFQVKGDKFGSVEECQLDQDSMLIPIAVGGALAG	395
SEQIDNO:13	SYKCNAEQRLEVTSSFSLSLMFRVWLQAFVVDGDKTGFVEECQLDENSMILIPIAVGGALAG	386
SEQIDNO:14	SYKCNSEEHIFVSKALALNVFVSVQVQAFVBSDRFGSVEECVQDGNMMLIPIAVGGALAG	384
SEQIDNO:15	SYKCSAEEHFGVTDKALVNVFVSVQVQAFKVDGDKFGAMEECQLDENNMILIPIIVGAALAG	391
SEQIDNO:16	SYNCRSEQRLOVTEAFALNVFQVFPVQAFKVDGDKFGAAEECQLDENNMILIPIAVGGALAG	390
SEQIDNO:17	SYKCNAAENVHVTDFGFSVNI FVRVQAFKVEGDKFGSVEECVLDDENNMILIPIAVGGALAG	399
SEQIDNO:18	SYKCSAEEHLQVTDKALVNVFVSVQVQAFKVDGDKFGAVEECQLDENNMILIPIIVGAALAG	392
SEQIDNO:19	SYKCSSEENLQVTDQALVNVFVSVQVQFKTDGDKFGPVEECQLDENNMILIPIIVGAALAG	392
SEQIDNO:20	SYKCSAEEHIIWISGAAVNI FVITQLQAFKIPGDKFGAVEECQLDENNMILIPIIVGAALAG	395
SEQIDNO:21	SYMCAEQTLFVSTFSSIMFELQVQFFGVSTSTQFASAEVCQIDQDQMLIPIIVGAALAG	395
SEQIDNO:22	SYMCAEQTLAVTFVFSINTFSLQIQPFVTTNQFAAAEECQMDQDQMLIPIIVGASLAG	397
SEQIDNO:23	SYMCLSEQLNVLQNFSLNTFQLQVQFPGITRQGFQAAGECQLDQDQMLIPIIVGAALAG	396
SEQIDNO:24	SYPCRDEQTLNVAGNLSINTFQLQVQFPFAVKGDFGAAEECQLDEDDMLIPIIVGAALAG	224

Cola citoplasmática

```

SEQIDNO:1          LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 417
SEQIDNO:6          LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 406
SEQIDNO:7          LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 411
SEQIDNO:8          LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 411
SEQIDNO:9          LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 417
SEQIDNO:10         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 415
SEQIDNO:11         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 413
SEQIDNO:12         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 417
SEQIDNO:13         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 409
SEQIDNO:14         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 407
SEQIDNO:15         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 414
SEQIDNO:16         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 413
SEQIDNO:17         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 422
SEQIDNO:18         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 415
SEQIDNO:19         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 415
SEQIDNO:20         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 418
SEQIDNO:21         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 410
SEQIDNO:22         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 420
SEQIDNO:23         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 419
SEQIDNO:24         LVLIVLIAIYLVGRKRSHAGYQTI 347

```

LAMP-1					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_005552.3	<i>H. sapiens</i>	1	NP_990614.1	<i>G. gallus</i>	15
NP_034814.2	<i>M. musculus</i>	6	NP_001011507.1	<i>S. scrofa</i>	16
NP_955996.1	<i>D. rerio</i>	7	XP_001374132.1	<i>M. domestica</i>	17
NP_001087042.1	<i>X. laevis</i>	8	XP_003203252.1	<i>M. gallopavo</i>	18
NP_001233491.1	<i>P. troglodytes</i>	9	XP_002191607.2	<i>T. guttate</i>	19
XP_001087801.1	<i>M. mulatta</i>	10	XP_003218797.1	<i>A. carolinensis</i>	20
XP_534193.2	<i>C. lupus familiaris</i>	11	XP_004067118.1	<i>O. latipes</i>	21
XP_002723509.1	<i>O. cuniculus</i>	12	XP_003959941.1	<i>T. rubripes</i>	22
NP_001068592.1	<i>B. taurus</i>	13	NP_001158846.1	<i>S. salar</i>	23
NP_036989.1	<i>R. norvegicus</i>	14	XP_003452974.1	<i>O. niloticus</i>	24

FIGURA 4: ALINEACIÓN DE LAMP-2 HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

SEQIDNO: 2		0
SEQIDNO: 25		0
SEQIDNO: 26		0
SEQIDNO: 27		0
SEQIDNO: 28		0
SEQIDNO: 29		0
SEQIDNO: 30		0
SEQIDNO: 31		0
SEQIDNO: 32		0
SEQIDNO: 33		0
SEQIDNO: 34		0
SEQIDNO: 35		0
SEQIDNO: 36		0
SEQIDNO: 37	NAMKNFTLQGERDTSVALII RTTVRAFLKVYTKVPKFPQRCHNQW-----QSLNIEGIEGIEI	37
SEQIDNO: 38		0
SEQIDNO: 39	MECREGEVTRCHQKNNLFSGIN-GLISGAEE	30
SEQIDNO: 40		0
SEQIDNO: 41		0
SEQIDNO: 42		0
SEQIDNO: 43		0

SEQIDNO: 2		0
SEQIDNO: 25		0
SEQIDNO: 26		0
SEQIDNO: 27		0
SEQIDNO: 28		0
SEQIDNO: 29		0
SEQIDNO: 30		0
SEQIDNO: 31		0
SEQIDNO: 32		0
SEQIDNO: 33		0
SEQIDNO: 34		0
SEQIDNO: 35		0
SEQIDNO: 36		0
SEQIDNO: 37	VRGSKWR---SALETTITIQVRR-----SDVQKYHPPFELRSECQKTNGE	99
SEQIDNO: 38		0
SEQIDNO: 39	AKGRGCTFPQKYPPEATATLPLQRHPRGIEGPAPAAVAAVAADRITPSGSHQTRPPEAAR	90
SEQIDNO: 40		0
SEQIDNO: 41		0
SEQIDNO: 42		0
SEQIDNO: 43		0

SEQUIENO: 2	-----M-----	4
SEQUIENO: 25	-----M-----	1
SEQUIENO: 26	-----NGDT-----	4
SEQUIENO: 27	-----	0
SEQUIENO: 28	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 29	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 30	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 31	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 32	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 33	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 34	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 35	-----MVCF-----	4
SEQUIENO: 36	-----ME-----	2
SEQUIENO: 37	G---TGGVATVIADECLWPSYPFSTLAQKYNVLGSCFAFSLIGYSVFALFIYLPKPMMLDF	156
SEQUIENO: 38	-----	0
SEQUIENO: 39	DERPVRLPSPAPAAAPSSCHWPPAGGPQRRP-----GHR-----HRRHGFAFLPP	133
SEQUIENO: 40	-----	0
SEQUIENO: 41	-----	0
SEQUIENO: 42	-----	0
SEQUIENO: 43	-----	0

SECUENCIA SEÑAL

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

1

SEQUIENO: 2	-RL-----FVVGSGGLVLYVCLVLAVER-SY-----NLNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 25	-CL-----SPVSGAKLILILFLFLGAVQ--SNALIVNLTDS-KGTCLYAEWQMNFTIYET	53
SEQUIENO: 26	GAM--EPCACFAAVLLLSVL----MG--ATAFEVEIKDDRNATCIYAKLSVNITVQYETD	57
SEQUIENO: 27	-----MAVRGFLPLLEFILLSGIVHADMMTSPLES-----TAELE	35
SEQUIENO: 28	-RL-----FPVPGSGILVLCVLGAVQ--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 29	-RL-----FPVPGSGILVLCVLGAVQ--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 30	-RL-----FPVPGSGILVLCVLGAVR--SHALELNEALSAIN-----	39
SEQUIENO: 31	-RL-----SPAPGSGILVLLCLVLGAVS--SYALEVNVTDSKATCLYAKWQMNFTIYNT	57
SEQUIENO: 32	-RL-----SPVPGSGILVLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 33	-PL-----APVPGSGFLLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 34	-PL-----SPVPGSGILMLCLVLGAVS--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 35	-RL-----APVPGSGFLLLCLVLGAVS--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	57
SEQUIENO: 36	-LL-----SPVTGSHLVLLFLFLGAVR--SDALELNLTDS-KGTCLYAEWQMNFTIYET	54
SEQUIENO: 37	IELAEIMLSTETQLLEPTRVCCGICQ--SYALELNLTDSKATCLYAKWQMNFTIYET	214
SEQUIENO: 38	---MAPPRCPAGLAILLLLLGACGFFQ--SYAVEVDVKDASNFTCLYAKWQMNFTIYET	56
SEQUIENO: 39	LLLRPPP-PAA-----AAARFLGFFQ--SYAVEVDIKDASNFTCLYAKWQMNFTIYET	105
SEQUIENO: 40	---M---EPCACFAALLLLSVL----MG--AAAFDVEIKDDRNATCIYAKLSVNITVQYET	51
SEQUIENO: 41	-----MF--RCAPLILFLALGNELHLSGTEVSVNTENKLCYANIMQNFVYEVG	51
SEQUIENO: 42	-----MKVSRATAGLVVWFVVGCTDAVT-----L-EVKESNTTCIKADLSASFIIYNT	50
SEQUIENO: 43	-----	0

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

2

SEQIDNO:2	NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI	111
SEQIDNO:25	NQTNKTIITIAVF--DEATRDGSSCGDQNGPKIIMIQFGFAVS-WAVKFTKEA---SWYSL	107
SEQIDNO:26	TSSSKNITFFVP--SDVTTNGSSCGSDGKAPILVINFGNSQS-WSINFTKNN---STYSG	111
SEQIDNO:27	---T-----ANLF--LVLQTTSSSTTSTTTT-SPP--SSTSTHTLTTEPAA-----	73
SEQIDNO:28	NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI	111
SEQIDNO:29	NKTYKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFSKAA---STYSI	111
SEQIDNO:30	CSKCKTVTISDR--GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFS-WIANFTKAA---STYSI	93
SEQIDNO:31	SKNFKETATISDR--STATYNGSVCGNDQNNPKIIVVQFGSGFS-WIVNFTKKE---SAYLI	111
SEQIDNO:32	SKSYKTVTISNF--GTFYTYNGSICGDNQNGSRIAVQFGSGFS-WIVNFTKSV---SVYSI	111
SEQIDNO:33	DKINKTVPISDL--GAATYNGSFCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEASSTSTYLV	114
SEQIDNO:34	NNSHNTVSI SDF--GAATYNGSFCGDDQNDPQIVMQFGSGFS-WIVNFAKES---SSYLI	111
SEQIDNO:35	DKHNKTVTISDF--DAAAYNGSVCGDDQNGPKIAVQFGSGFS-WIVNFTKEASSTSTYLV	114
SEQIDNO:36	K-VNETVTITVFP--DKVTYNGSSCGDDKNGAKIMI QYGSTLS-WAVKFTKEA---SQYFI	107
SEQIDNO:37	GNETKNTVTVP--ENVTYDSSCGDQNGPKIAVQFGGLYS-WHLNFTKEN--NSYSF	269
SEQIDNO:38	SSDYKNASLDLF--STVTNGSICGSDTQAALLAVQFGDGHG-WSINFTKNN---ETYP	110
SEQIDNO:39	SEGYNTFTLNLG--SSVTNGSVCGNDTQAALVAVQFGEGHS-WSIKFTKNN---ETYQG	239
SEQIDNO:40	TSSKNTVTFSVP--SEVTTNGSSCGSGKAPILVINFGNGH6-WSINFTKND---SMYSG	105
SEQIDNO:41	VNKNETVTIFVLP--ENVTTGSGTCDNFTTSLKL---SPGHGHG-WTVEFTKKN---KTYQV	103
SEQIDNO:42	HAER-TVQVLLPNSTTVDTANSTPCGKDGSSPRLVAVFGSGY-TLGLKFTNG---FLYQV	105
SEQIDNO:43	-----	0

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

3

SEQIDNO:2	DSVSPSYNSGNTFFPDADKGL-SVVDLPLPLNDLFRCNLSLEKNDVQHYWD	170
SEQIDNO:25	BDIVLSYNTSDSTVFPAGAVANGV-HTVKNPENFKVELNVIKCNVLTITNLTFFVQHYWD	166
SEQIDNO:26	SALIFTYNTNDTILFPDALRGLIS-STAEFLGPIPLNSTYKCI SREVVVSENVQTII SD	170
SEQIDNO:27	-----KTTTARTTVTTSA---PTSTQSTSSSSTBATVTTLAP	107
SEQIDNO:28	DSISFSYNTGDKNTFFPDADKGL-ITVDELLAINI PLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	170
SEQIDNO:29	DSISFSYNTGDKNTFFPDADKGL-ITVDELLAINI PLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	170
SEQIDNO:30	DSISFSYNTGDKNTFFPDADKGL-ITVDELLAINI PLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	152
SEQIDNO:31	DSISFSYNTGDKNTFFPDADKGL-LTVHDINGTRI PLNNLFRCNLSLSTLEKNGVQHYWD	170
SEQIDNO:32	DSISFSYNTGDKNTFFPDADKGL-LTVNESVAFKI PLNDLFRCNLSLSTLEKNGVQHYWD	170
SEQIDNO:33	DTISFSYNTNDKNTFFPDADKGL-FTVNNKVALKI PLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	173
SEQIDNO:34	NSISFSYNTSDSTFFPDADKGL-LTVNDSVCFQVPLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	170
SEQIDNO:35	DSISFSYNTNDKNTFFPDADKGL-FTVNNKVALKI PLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	173
SEQIDNO:36	NNITLSYNTNDKNTFFPDADKGL-LTVIIPVGSQPLGLSVIFKCSSVLTITNLTFFVQHYWD	166
SEQIDNO:37	DEIVFTYNTSDSTVFPAGAVANGV-HTVKNPENFKVELNVIKCNVLTITNLTFFVQHYWD	329
SEQIDNO:38	EFITFTYNTNDTAVFPDARQGPVTVVKNAMHPIQLNNVFPCHHTTSLAEENVTTQIFWN	170
SEQIDNO:39	DEITLTNTNDTAVFPDARQGPVTVVKNAMHPIQLNNVFPCHHTTSLAEENVTTQIFWN	299
SEQIDNO:40	GALIFTYNTNDTILFPDALRGLIS-STAEFLGPIPLNSTYKCI SREVVVSENVQTII SD	164
SEQIDNO:41	DTIVFSYNTNDKNTFFPDADKGL-LTVNDSVCFQVPLNDLFRCNLSLSTLEKNDVQHYWD	163
SEQIDNO:42	SSLTQLYNTSDSTVFPAGAVANGV-HTVKNPENFKVELNVIKCNVLTITNLTFFVQHYWD	165
SEQIDNO:43	-----MTQICGVQPVFLA	13

REGION BISA GRA

4

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

SEQIDNO:2	LRLLNS-SQIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	324
SEQIDNO:25	LRLLNN-SQIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	329
SEQIDNO:26	LILTE--NPTLIEPTIFALKNR-----NRPYLEEVNITLI-----NGSAFSSQONLSTWEAS	329
SEQIDNO:27	SSLFLT3--KDITVHFVFTNDS-----OKFRLHALTITVD-LONG-NIFNDSNTNLSLWEAS	269
SEQIDNO:28	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	324
SEQIDNO:29	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	324
SEQIDNO:30	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	277
SEQIDNO:31	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	325
SEQIDNO:32	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	331
SEQIDNO:33	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	321
SEQIDNO:34	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	325
SEQIDNO:35	LRLLNS-STIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	321
SEQIDNO:36	LRLLNN-SQIKYLDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	329
SEQIDNO:37	LRLLNS-SNVKYIDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	484
SEQIDNO:38	LRLLNS-SNVKYIDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	338
SEQIDNO:39	LRLLNS-SNVKYIDFTFAVKNE-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	469
SEQIDNO:40	LILTD---NPTLIEPTIFALKNR-----NRPYLEEVNITLI-----NGSAFSSQONLSTWEAS	322
SEQIDNO:41	--GLILTS---DTITIMFTESNDG-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	318
SEQIDNO:42	LVLTDQ--TQSTILTFNFTLNSST-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	334
SEQIDNO:43	LTLTDAERTNLTFTVFAINTTS-----NRPYLKEVNVSMT-LVNGSV-FSIANNHLSYWDAP	163

* : . : . . : : : * : : : * . . .

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

Dominio trans.

SEQIDNO:2	LGSSYMCNKEQVLSVERAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	363
SEQIDNO:25	LGSSYMCNKEQVLSVERAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	366
SEQIDNO:26	VDSSYMCNKEQQIKVSEDLFINAEDVQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	367
SEQIDNO:27	VGSSYMCNKEQQIKVSEDLFINAEDVQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	368
SEQIDNO:28	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	384
SEQIDNO:29	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	383
SEQIDNO:30	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	337
SEQIDNO:31	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	384
SEQIDNO:32	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	390
SEQIDNO:33	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	360
SEQIDNO:34	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	364
SEQIDNO:35	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	361
SEQIDNO:36	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	384
SEQIDNO:37	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	543
SEQIDNO:38	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	398
SEQIDNO:39	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	529
SEQIDNO:40	VGSSYMCNKEQQIKVSEDLFINAEDVQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	361
SEQIDNO:41	VGSSYMCNKEQQIKVSEDLFINAEDVQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	377
SEQIDNO:42	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	363
SEQIDNO:43	LGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFNLKQVQFNVTEGQYSTAQECSLDD-D-TILIPITVGA	222

: . ****. . * : . : : (* : : : * * * : : * : * * : : : : * *

Cola citoplasmática

SEQIDNO: 2	<u>ALAGVLIIVLLAYFIQIKHHH-AGYQPF</u>	410
SEQIDNO: 25	GLSGLIIVTVIAYLIQPKTY-AGYQTL	415
SEQIDNO: 26	ALGVIVVLRGAYFTIGRKQSSAGYQSM	415
SEQIDNO: 27	ALAGLIIFIVVIAYVICRRTY-VGYQTL	355
SEQIDNO: 28	ALGFLIIVVFTISYMGRRERF-TGYQSV	411
SEQIDNO: 29	ALAGVLIIVLLAYFIQIKHHH-AGYQPF	410
SEQIDNO: 30	ALGFLIIVVFTISYMGRRERF-TGYQSV	264
SEQIDNO: 31	GLSGLIIVVIAYLIQPKSY-AGYQTL	411
SEQIDNO: 32	ALAGVLIIVLLAYFIQIKHHH-AGYQPF	417
SEQIDNO: 33	GLSGLIIVTVIAYLIQPKSY-AGYQTL	407
SEQIDNO: 34	ALAGVLIIVLLAYFIQIKHHH-AGYQPF	411
SEQIDNO: 35	ALGFLIIVVFTISYMGRRERF-TGYQSV	408
SEQIDNO: 36	ALGFLIIVVLLAYFIQIKHHH-TGYQPF	411
SEQIDNO: 37	ALGFLIIVVLLAYFIQIKHHH-TGYQPF	570
SEQIDNO: 38	ALGFLIIVVFTISYMGRRERF-TGYQSV	425
SEQIDNO: 39	ALGFLIIVVFTISYMGRRERF-TGYQSV	556
SEQIDNO: 40	ALAGLIIVTVIAYLIQPKSY-AGYQTL	408
SEQIDNO: 41	ALAGLIIVTVIAYVICRRTY-VGYQTL	404
SEQIDNO: 42	ALAGVLIITLIAYLIQPKRH-AGYQAT	410
SEQIDNO: 43	ALAGVLIIVLQAYLIQPKRH-AGYQAT	249

*, : : : , : *, : * : : ** : ,

LAMP-2					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_002285.1	<i>H. sapiens</i>	2	NP_001231184.1	<i>S. scrofa</i>	34
NP_034815.2	<i>M. musculus</i>	25	XP_004022401.1	<i>O. ories</i>	35
NP_001087881.1	<i>X. laevis</i>	26	NP_058764.2	<i>R. norvegicus</i>	36
NP_001013551.1	<i>D. rerio</i>	27	XP_001510101.2	<i>O. anatinus</i>	37
XP_003918270.1	<i>P. Anubis</i>	28	NP_001001749.1	<i>G. gallus</i>	38
XP_003918270.1	<i>M. mulatta</i>	29	XP_002191794.1	<i>T. guttata</i>	39
XP_003317709.1	<i>P. troglodytes</i>	30	NP_001116192.2	<i>X. tropicalis</i>	40
XP_005641822.1	<i>C. lupus familiaris</i>	31	NP_001133282.1	<i>S. solar</i>	41
XP_001493687.3	<i>E. caballus</i>	32	XP_003445630.1	<i>O. niloticus</i>	42
NP_001029743.1	<i>B. Taurus</i>	33	XP_003961835.1	<i>T. rubripes</i>	43

FIGURA 5: ALINEACIÓN DE LAMP-3 HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

SECUENCIA SEÑAL	DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP	
SEQIDNO:3	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	55
SEQIDNO:44	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	55
SEQIDNO:45	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	55
SEQIDNO:46	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	55
SEQIDNO:47	MSWQLSAAVALFVSLALILHY-----GSQIRAKMFPDETVDLQ--PTTAATVRATAKPEL--HL	54
SEQIDNO:48	MSWQLSAAVALFVSLALILHY-----GSQIRAKMFPDETVDLQ--PTTAATVRATAKPEL--HL	54
SEQIDNO:49	MSWQLSAAVALFVSLALILHY-----GSQIRAKMFPDETVDLQ--PTTAATVRATAKPEL--HL	0
SEQIDNO:50	MANQLSAVVVLFVSLAVILYY-----GSHVRANVFETITDYSQPTTAAATGQTRAGSLSQP	56
SEQIDNO:51	MSWQLSAAVALFVSLALILHY-----GSQIRAKMFPDETVDLQ--PTTAATVRATAKPEL--HL	57
SEQIDNO:52	MSWQLSAAVALFVSLALILHY-----GSQIRAKMFPDETVDLQ--PTTAATVRATAKPEL--HL	53
SEQIDNO:53	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	53
SEQIDNO:54	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	54
SEQIDNO:55	MPPQLSAAAVLFASLAVILHD-----GSCMPAKAFFETRDYSQPTAAATGQDIKKPV--QQF	0
DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP		
SEQIDNO:3	AKQAPHQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	102
SEQIDNO:44	AKQAPHQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	102
SEQIDNO:45	AKQAPHQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	102
SEQIDNO:46	AKQAPHQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	102
SEQIDNO:47	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	114
SEQIDNO:48	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	116
SEQIDNO:49	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	0
SEQIDNO:50	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	116
SEQIDNO:51	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	117
SEQIDNO:52	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	113
SEQIDNO:53	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	107
SEQIDNO:54	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	108
SEQIDNO:55	ENQVPSQTAAAFMDGHIITFQTAATVKIP-----TTTPATNTNTATTSPITV	14
DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP		
SEQIDNO:3	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDNO:44	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDNO:45	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDNO:46	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	152
SEQIDNO:47	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	164
SEQIDNO:48	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	166
SEQIDNO:49	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	0
SEQIDNO:50	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	168
SEQIDNO:51	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	167
SEQIDNO:52	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	163
SEQIDNO:53	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	146
SEQIDNO:54	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	147
SEQIDNO:55	TLVT-----TQATSNNSHTAPPELVTVGQPSLAPYSLPPTI--TPPAHTTGTSSTV	59

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 1 DE LAMP

SEQIDNO: 3	SHTTGNITQPSNQTTLPATLSIALHKSTTCQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTETAAPAS	209
SEQIDNO: 44	SHTTGNITQPSNQTTLPATLSIALHKSTTCQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTETAAPAS	209
SEQIDNO: 45	NHTTGNATQPSNQTTLPATLSIALHKSTTCQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTETAAPAS	209
SEQIDNO: 46	NHTTGNATQPSNQTTLPATLSIALHKSTTCQKPVQP---THAPGTTAAAHNTTETAAPAS	209
SEQIDNO: 47	SHTRKSTTHFGNQTTLPATLSTSTHKSTTSHKSAQS---THAPGPTTAAHNTTQTASEAT	221
SEQIDNO: 48	SPTAGKTTQPSNQTTLPATLSTSPHNSTASCPHTIP---NHTPSPTTCAHNTTQTASPAT	223
SEQIDNO: 49	-----MTQSSRSVLLMLSSLIHCLGSSLESNPKDPSVLAAPQGN-----KRDSDEL	48
SEQIDNO: 50	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNSTTSQNPANS---THTPGPTTGTCTNTTQTATPPT	225
SEQIDNO: 51	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNSTTSQKPTQP---THTPGPTTATYNTTQTASEAT	224
SEQIDNO: 52	SHTTGKTTQLSNQTTLPATLSTSPHNSTTSQKPTQP---THTPGPTTAAHNTTETAAPAT	220
SEQIDNO: 53	NHITGRSTQLGGQTTLPKALFTSSEHSTTTQRPPTLS---TI-VSELTETGSDRSTTSVE	202
SEQIDNO: 54	NYITGRATQLGGQTTLPKLTFTTASHESTTNQRPPTLS---TNVLSTSTPTHKDRSTTSFVP	204
SEQIDNO: 55	THVTSNTTTLA-----PNTTTTHITSNTTTLAPNET---TTLAPNTTTHSVTTTKTAST	111

BISAGRA

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

SEQIDNO: 3	TVPGSTLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	268
SEQIDNO: 44	TVPGSTLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	268
SEQIDNO: 45	TVPGSTLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	268
SEQIDNO: 46	TVPGSTLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	268
SEQIDNO: 47	PASGETLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	280
SEQIDNO: 48	TAPGETLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	282
SEQIDNO: 49	VPQMFVLQPNETAPPLVYTYTIENPQCKVCVRASFGVEFVYREN----KKKYFNLTNPSA	104
SEQIDNO: 50	TAPGETLAPQPSVVTGTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	284
SEQIDNO: 51	LAPRPTLAPQPLSPKTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	283
SEQIDNO: 52	LAPRPTLAPQPLSPKTYQVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	279
SEQIDNO: 53	LVPRTFTVWSSPAKICTYEVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	261
SEQIDNO: 54	LVPRTFTVWSSPAKICTYEVLN-GSRLCIKAEIMGILIVQDKESVFSPPRYFNIDPNAT	263
SEQIDNO: 55	TTFTPTLSPKPSPPETONYTVKI-KNEPCIEALMCLLELFTS---TETQGYFNIVPSQI	167

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

SEQIDNO: 3	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	319
SEQIDNO: 44	QLSGGCHAPNRESHPHPLFLFFKGFESVTOABDELSYYISEVGAYLTVS-----DPETIY	321
SEQIDNO: 45	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	319
SEQIDNO: 46	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	319
SEQIDNO: 47	QTSGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	331
SEQIDNO: 48	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	333
SEQIDNO: 49	RATGYCANQK---TVLSLEFSGGGLFTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	160
SEQIDNO: 50	QVSGICGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	335
SEQIDNO: 51	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	334
SEQIDNO: 52	QASGNCGRK---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	330
SEQIDNO: 53	NASGKCGSQN---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	312
SEQIDNO: 54	NASGKCGSQN---SNLLLNFGGGFVNLTFTKDENSYYISEVGAYLTVS---DPETIY	314
SEQIDNO: 55	NSNGTCEKSK---ANLNLTANSYINPVAQDDNSYYILNVTYVFNLT---RRESWY	218

DOMINIO DE HOMOLOGÍA 2 DE LAMP

	3	4	
SEQIDNO:3	QGIKHA VVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDNO:44	QGIKHA VVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	391	
SEQIDNO:45	QGMKHA VVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDNO:46	QGMKHA VVMFQTAVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	379	
SEQIDNO:47	QGMKSV VVMFETGVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	391	
SEQIDNO:48	QGMKNV VVMFETMI GHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	393	
SEQIDNO:49	VGLVLEKSLFNAKNGLSFNCKSETMLILADYFRLKINELQIQAFILVNGAFGKEVECHAD	220	
SEQIDNO:50	QGMKSP VVMFETVIGHHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	395	
SEQIDNO:51	QGLKHAMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNADECISD	394	
SEQIDNO:52	QGMRYAMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNADECISD	390	
SEQIDNO:53	QGKS-TMMMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	371	
SEQIDNO:54	QGMKNTLMFETVVGHSFKCVSEQSLQLSAHLQLKTTDVQLQAFDFEDDHFGNVDECSSD	374	
SEQIDNO:55	GNAT-NQKILKTENGCYVCKCNTPKIQGLDTMNIIVMTNVQLQVFNENKDNSEGETTCKYD	277	

Membrana trans.

Cola cito.

SEQIDNO:3	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLMGMGVYKIRLRCSGGYQRI	416
SEQIDNO:44	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLMGMGVYKIRLRCSGGYQRI	418
SEQIDNO:45	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	416
SEQIDNO:46	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	416
SEQIDNO:47	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	428
SEQIDNO:48	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	430
SEQIDNO:49	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	259
SEQIDNO:50	YTIIV-LPV-IGAI VVGLCLVGGMGVYKIRLRCSGGYQRI	432
SEQIDNO:51	RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTTRKRPSRGYERM	433
SEQIDNO:52	RNRREIPVAVGLSIAVLLAVLLTACLVTTRKRPSRGYERM	429
SEQIDNO:53	YTIIV-LPV-VGLIVVVLGVVGLGIYKIRLRCSGGYQRI	408
SEQIDNO:54	YTIIV-LPV-VGLIVVVLGVVGLGIYKIRLRCSGGYQRI	411
SEQIDNO:55	HNFC-LMI-ACIVTVVTVVGLVIVYFIWHERKSSGYQRI	314

LAMP-3					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_055213.2	<i>H. sapiens</i>	3	XP_001496333.1	<i>E. caballus</i>	50
XP_001155195.3	<i>P. troglodytes</i>	44	NP_001095605.1	<i>B. Taurus</i>	51
XP_003894825.1	<i>P. Anubis</i>	45	XP_004003158.1	<i>O. aries</i>	52
NP_001028044.1	<i>M. mulatta</i>	46	NP_001012015.1	<i>R. norvegicus</i>	53
XP_848889.2	<i>C. lupus familiaris</i>	47	NP_796330.2	<i>M. musculus</i>	54
XP_003358745.1	<i>S. scrofa</i>	48	XP_002936919.2	<i>X. tropicalis</i>	55
XP_001347688.2	<i>D. rerio</i>	49			

FIGURA 6: ALINEACIÓN DE LIMP-2 HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

```

                                SECUENCIA_SEÑAL
SEQIDNO:4                      -----MGRCCFFYAGTILS 13
SEQIDNO:56                     -----MGRCCFFYTAGTILS 13
SEQIDNO:57                     -----MGRCCFFYTAGTILS 13
SEQIDNO:58                     -----MGRCCFFYTVGTILS 13
SEQIDNO:59                     -----MGRCCFFYAVGTILS 13
SEQIDNO:60                     -----MGRCCFFYTAGTILS 13
SEQIDNO:61                     -----MTRKR3CTIYATGIVC 15
SEQIDNO:62                     -----MARCCFFYTAGTILS 13
SEQIDNO:63                     -----MRSLECLVTVGVLA 13
SEQIDNO:64                     -----MVKNWAVFGTAAVS 13
SEQIDNO:65                     MQLDDILHINNCKADCSSLSTTTPNPTDLVNMNGPEHEFCTELSTYLKRWITIV--VA 58
SEQIDNO:66                     -----MYGESNRILCAKLS9AFLPKWEEVIA--FA 27

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

SEQIDNO: 4      LLLLVTSVTLLVAVRVFQKAVDQSIERKIVLNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 56     LLLLVTSVTLLVAVRVFQKAVDQSIERKIVLNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 57     LLLLVTSVTLLVAVRVFQKAVDQSIERKIVLNGTEAFDSWEKPPLPVYTQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 58     LLLLVTSIALLVAVRVFQKAVDQTIENKIVLNGSETEDSWKKPPLPVYAQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 59     LLLLVTSITLLVAVRVFQKAVDQTIENKIVLNGSETFDSWKKPPLPVYTQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 60     LLLLVTSVTLLVAVRVFQKAVDQTIENKIVLNGGKTKVENSWEKPPLPVYTQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 61     AHLILGLIALLLAQVFQTMIGERIKKELTAEKNSPVLDGWINPPEPVYMQFYFFFNVTNRD 75
SEQIDNO: 62     LLLLVTSVTLLVAVRVFQKAVDQTIENKIVLNGGKTKVENSWEKPPLPVYIQFYFFFNVTNPE 73
SEQIDNO: 63     LTLILIASISLLVAHVFGTVVLDLQVKQGTVLNGTETFEAWEDPPFPVYMQFYFFFNVTNPL 73
SEQIDNO: 64     VTLLIVSTVLLITHTFMDIVEGGVKQAIVLKNESEVFEDWANDPPPVYMQFYFFFNVTNPL 73
SEQIDNO: 65     AALHIG--GIIVACEFTVLIDAVVDMVALRPGAKTEGWWAKPPVEFRI3LYIYNVTNAD 116
SEQIDNO: 66     LSLVL--GALVTFGFTAFIRFTIDHQVALKVGQSGEGWWSRPVEFIRIFVYNVTNAD 85

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

SEQIDNO: 4      EILRGE-TPRVEEVGPPYTYRELNRKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO: 56     EILRGE-TPRVEEVGPPYTYRELNRKANIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO: 57     EILRGE-TPRVEEVGPPYTYRELNRKANYQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPNLIUL 132
SEQIDNO: 58     EILRGE-IPRLIEVGPPYTYRELNRKADIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPNTDL 132
SEQIDNO: 59     EILRGE-TPRLIEVGPPYTYRELNRKDDIQFGDNGTTISAVSNKAYVFERDQSVGDPKIDL 132
SEQIDNO: 60     EILQGE-IPLLIEVGPPYTYRELNRKANIQFGDNGTTISAVTNKAYVFERDQSVGDPNVDL 132
SEQIDNO: 61     EFLAGKEKAKVTQMGPPYTYREYRPRENVTYLENGTKIFATNPKSEFVFLANM3AGDPEVIR 135
SEQIDNO: 62     EILQGE-IPLLIEVGPPYTYRELNRKANVQFGDNGTTISAVTNKAYVFERDQSVGDPVTDL 132
SEQIDNO: 63     EVLQGA-TPLVBEKGPYTYREYRPRVHVQFLDNGTKVSAALNPKTYVFEPEKSVGNPEVDL 132
SEQIDNO: 64     EVLSGE-KPEVDEIGPPYTYREYRPRENITFSVNGTEVSAVTPKTYVFEPEKSIDGPKVLL 132
SEQIDNO: 65     DFLNSGSKAIVDEVGPYVYSETWEKVNIVENDNGTL-SYNLRRIYSFREL3VG-LELDV 174
SEQIDNO: 66     EFLNGTNPILDELGPYVYVQVWEKVNIKENPNGTI-SYNQKRVYIFNEDL3GG-LEDDV 143

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

SEQIDNO: 4      IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 56     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 57     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 58     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 59     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 60     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 61     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 62     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 63     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 64     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 65     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190
SEQIDNO: 66     IRTLNIPVLTVIEWSQ-V-RFLREIIEAMLKAYQCKLFVTHTVDELLNGYKDEILSLIHV 190

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

SEQIDNO: 4      FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 56     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 57     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 58     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 59     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 60     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 61     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 62     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 63     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 64     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 65     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246
SEQIDNO: 66     FRPDI-----SPYFGLFYERNGTNDGSDYVFLTGEDSYLNFTKIVEWNGKTSLDWWTDECN 246

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

SEQIDNO: 4      MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 56     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 57     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 58     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 59     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 60     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 61     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 62     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 63     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 64     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 65     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303
SEQIDNO: 66     MINGTDGDSFHLITKDEVLVFPSPDFCRSVYITFSDYES-VQGLPAFRYKVPASILANT 303

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```

3      4      5
SEQIDNO:4      ---SDNAGFCIFE-GNCLGSGVLNVSIKNGAPIIMSPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:56     ---SDNAGFCIFE-GNCLGSGVLNVSIKNGAPIIMSPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:57     ---SDNAGFCIFE-GNCLGSGVLNVSIKNGAPIIMSPHFYQADERFVSAIEGMHP-NK 360
SEQIDNO:58     ---SDNAGFCVFE-GNCLGSGVLNISICKNGAPIIMSPHFTEADKKFVSAIDGMHP-NK 360
SEQIDNO:59     ---SDNAGFCIEK-GNCLGSGVLNVSVCKNGAPIIMSPHFYQAEKKFVSAIDGMHP-NK 360
SEQIDNO:60     ----SENAGFCIFE-GNOMDSGVLNISICKNGAPIIMSPFBFYQADEKFVSAIKGMHP-NK 360
SEQIDNO:61     DENPANAGFCVFA-GDCLGKGVLEFVSVCRQGAPIVVSFPHFYQADERYINAIEGMHP-NE 368
SEQIDNO:62     ---SENAGFCIFE-GNOMDAGVLNVSIKNGAPIIMSPHFYQAEKFVSAIKGMPP-NK 360
SEQIDNO:63     TVNPDNAGFCVFE-GNCPGAGVLNVSIKQGAPIFISAHFPHYQADQKFVSDIEGMHP-TS 363
SEQIDNO:64     SVNPNKSGFCVTE-GNCLPSGLLVNSICKKEGAPIVLLSPHFYQADENVINSIRGMKP-VK 364
SEQIDNO:65     DSHPLNMCFPCPAGKPSCPNGLFNVLSCQYDSRIMLSFPHFYLALESPLTQVEGISPPMK 414
SEQIDNO:66     DKNENNMCYCPAG-PPCAPHGLNVSLCQYDEPTLLSFHFYMAQTLLRTAVEGIESPBR 382

      *  *      *      *:::***: .:***:  ****  *:  *  *

```

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

```
SEQIDNO: 4 EDHETFYVDINPLTGIILKAAARFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPPVMYLNESVHLIDKE 420
SEQIDNO: 56 EDHETFYVDINPITGIILKAAARFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPPVMYLNESVHLIDKE 420
SEQIDNO: 57 EDRETIFYDINPITGIILKAAARFQINIYVKKLDDFVETGDIRTMVFPPVMYLNESVHLIDKE 420
SEQIDNO: 58 DYHETFYVDINPLTGIILRAAARFQINVYVKKLDDFIETGWIPTMVFPPVMYINESVLI DDK 420
SEQIDNO: 59 EYNHTFYVDINPLTGIILRAAKRFQINVYVAKLDDFVETGDIQTLPFFPMYINESVLI DKE 420
SEQIDNO: 60 EEHESTFYDINPITGIILRGAARFQINTYVRALDEFVETGDIRTMVFPPVMYLNESVHLIDKE 420
SEQIDNO: 61 EEHSTYFLDNINPTTGVPFIRACKRAQLMLILKRVRGSPNPKFKLINETIFFPIMYVMEATILDE 426
SEQIDNO: 62 EEHESTFYDINRLTGTILLRGAARFQINTYVKKLDDFVETGNIKTMVFPPVMYLNESVHLIDKE 420
SEQIDNO: 63 EYNHTFYVDINPITGLVLQAARKMQINIYVRALREFFVETGMIRTLLIFPMYINESVLI DE 429
SEQIDNO: 64 EHMTFLDLNPITGTLIQAAKRIQVNIVYVRKI NVYLITQDIQTLEFFVMHLNESVLI DDK 424
SEQIDNO: 65 ERKQTFPDVQPMPGTILRVHARIQINLAVSQVDFI KQVANFDI IFFILWFEEGITMLSD 474
SEQIDNO: 66 DKHQLFPI DVQPEMGTALRARARIQINLAVSQVDFI KQVANFPDI VFFILWFEEGIDS LPO 442
```

Dominio trans.

Cola citoplasmática

```

SEQIDNO: 4      TASRLKSMINTTILITNI-----PYIIMALGVVFFGLVFTWLACRQGQGSMDGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 56     TASRLKSMINTTILITNI-----PYIIMALGVVFFGLVFTWLACRQGQGSMDGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 57     TASRLKSVINTTILITNI-----PYIIMALGVVFFGFVFTWLACRQGQGSMDGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 58     TASRLKSVINTTILITNI-----PYIIMALGVVFFGLIFTWLACRQGQGSMDGTFDSRAPLI 476
SEQIDNO: 59     TASRLKSVINTTILIVTNI-----PYIIMALGVVFFGLIFTWLACRQGQGSTDEGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 60     TANQLKSVINTTILVVTNI-----PYIIMALGVVFFGLVFTWLACRQGQGSMDGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 61     SAAQMRMLLLIVTVVSNF-----PVTILALGVILLVLIPLVCRNRPQRKNEVKRIDPTEAP 484
SEQIDNO: 62     TASQLKSVINTTILEVTNI-----PYIIMALGVVFFGLIFTWLACRQGQGSTDEGTADEPAPLI 476
SEQIDNO: 63     SANKLKHVLLERASVVTGI-----PEVIMALGIVFGIVFSVLVCPAQGAREESTEEERPSPLI 479
SEQIDNO: 64     SAKRLKSTLFQCRVANI-----PTIIMGEGTILAPLFTTILSCLQKRSRLEGTEEEERGFPLI 480
SEQIDNO: 65     EYTDL--MRFAEQVPPKIRVALIVGLCALGVLLLLSTP--CLIRNSNRQSTLHLEGSNY 530
SEQIDNO: 66     EILDL--MKVATNIPPPAKFTLTIALFGLGGFLVAVI--CLVRKSHRQSTLHLEGSNY 498

```

```

SEQIDNO: 4      RT----- 478
SEQIDNO: 56     RC----- 478
SEQIDNO: 57     RC----- 478
SEQIDNO: 58     RC----- 478
SEQIDNO: 59     RC----- 478
SEQIDNO: 60     RC----- 478
SEQIDNO: 61     HSTFETKDETAVEIQVNOQAEDEPENRNNQFLNCSYLANSEVZAQKC 531
SEQIDNO: 62     PT----- 478
SEQIDNO: 63     PT----- 481
SEQIDNO: 64     PAS----- 483
SEQIDNO: 65     LATA-----QVIMNKKQNKKNQAPY----- 551
SEQIDNO: 66     LATA-----SYDQAKKKAKMDNGMSKKN----- 522

```

LIMP-2					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_005497.1	<i>H. sapiens</i>	4	NP_775366.1	<i>D. rerio</i>	61
XP_517214.2	<i>P. troglodytes</i>	56	NP_446453.1	<i>R. norvegicus</i>	62
XP_001096458.1	<i>M. mulatta</i>	57	XP_420593.1	<i>G. gallus</i>	63
XP_005639134.1	<i>C. lupus familiaris</i>	58	NP_001018557.1	<i>X. tropicalis</i>	64
NP_001095623.1	<i>B. Taurus</i>	59	NP_726504.2	<i>D. Melanogaster</i>	65
NP_031670.1	<i>M. musculus</i>	60	XP_314345.2	<i>A. gambiae</i>	66

FIGURA 7: ALINEACIÓN DE LIMBIC HUMANA/SLAMP CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

SECUENCIA SEÑAL		DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP	
		1	
SEQIDNO:67	-MVARVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:68	-MVERVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:69	-NGARVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:70	-MVGKRVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:71	-MVGKRVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:72	-----MSCLWTHSVFIQGPF--LLP-GFEGFPVTSVESQRSTDNITVRQGDITAILRCVVED	53	
SEQIDNO:102	-MVGKRVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:103	-MVGKRVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:104	-MVARVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:105	-MVARVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:106	-----MSFAGEAA-----SQILNKAEPLFISRSEAFEPVAGDTETLPCEVAS	42	
SEQIDNO:107	-----MRPCLLRSTIWMLGFLVCLLSLQGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	54	
SEQIDNO:108	-MLGARPPFRSOLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:109	-MVGKRVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:110	-MVARVQFDRKQLPLV-LLRLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
SEQIDNO:111	-----MRPTW-LHSIWVL-GTFLSLP-SLQGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	54	
SEQIDNO:112	-----MRPCLLRSTIWMLGFLVCLLSLQGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	54	
SEQIDNO:113	MQVGRKSCWRQ--LQASPTPLLCCL-LPTGLPVRSDVFNNGTDNITVRQGDITAILRCVVED	57	
		: : : : . *** : * * .	

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

		2	
SEQIDNO:67	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:68	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:69	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:70	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:71	K3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:72	KV-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	112	
SEQIDNO:102	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:103	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:104	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:105	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:106	PGTYVLAWKRGIALLTAGSVKVTEDPRVRLVN---GYSLQIRDAVPPQAGDYICQIAML	38	
SEQIDNO:107	K3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	113	
SEQIDNO:108	KN-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:109	K3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:110	R3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
SEQIDNO:111	R3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	113	
SEQIDNO:112	R3-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	113	
SEQIDNO:113	KV-SKVAVLNRSGLIFAGHDKWSLDPRVELEKRNHSLKSLRIQKVDVYDEGSSYTCVQTQ	116	
		: * * . * : * * : * * * * . ***: * : : . * * * * : :	

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

3

SEQIDNO: 67	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 68	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 69	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 70	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 71	QHTWKQVYLLIVQVPPKISNISA---DITVNEGSSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 72	QQSKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DITVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	167
SEQIDNO: 102	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 103	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 104	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 105	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 106	DPR- EITHSVELVPPKITHVTSGCHLQVPRKGSFVRLECEATGMPMPNITWTRKNNLLSN	157
SEQIDNO: 107	QHTWKQVYLLIVQVPPKISNISA---DITVNEGSSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP----	168
SEQIDNO: 108	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 109	WPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DVTVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 110	HEPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DITVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171
SEQIDNO: 111	WPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DITVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	168
SEQIDNO: 112	QHTWKQVYLLIVQVPPKISNISA---DITVNEGSSNVTLMCIAYGRPEPMITWRHLTP----	168
SEQIDNO: 113	QQPKTSQVYLLIVQVPPKISNISS---DITVNEGSSNVTLCMANGRPPEPVITWRHLTP----	171

. : : * * * : : : . : : * : * * * * * * * * * * * * * * * *

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

4

SEQIDNO: 67	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 68	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 69	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 70	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 71	ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 72	ABALDV-GEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	228
SEQIDNO: 102	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 103	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 104	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 105	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 106	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 107	ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	227
SEQIDNO: 108	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 109	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 110	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	230
SEQIDNO: 111	GREFEGEEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	227
SEQIDNO: 112	ARDFEGEEEFLEIQGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	227
SEQIDNO: 113	AKPLDG-EEYLLIIGITREQSGRYECKAANEVSSADVKQVRYTVNYPPTITESKS-NEAT	228

.. : : * : * : * * * * * . : : : * * * * * * * * * * * * * * * *

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

	5	6
SEQIDNO: 67	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 68	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 69	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 70	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 71	TGKQALLRCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSAQGLEIPNTGSRSVLMVANVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 72	VQAGVNLCEASAVPQPEFWEYRDPERRLSBSQSLTIQVSGSRTVLMVANVTTEHYGNYTC	285
SEQIDNO: 102	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 103	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 104	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 105	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 106	EGQREAMLVCIHVGESQPEVLWKKDTMQITQTEBHVIENRGARHTLIIRSVHPQDFGNYS	276
SEQIDNO: 107	TGKQALLRCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSAQGLEIPNTGSRSVLMVANVTTEHYGNYTC	287
SEQIDNO: 108	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 109	TGRQASLKCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSANGLEIKSTEGQSSSLTVNVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 110	TGRQALLRCEASAVPTDFEYRDDTRINSANGLEIKSTGSGSLLMVANVTTEHYGNYTC	290
SEQIDNO: 111	TGRQALLRCEASAVPTDFEYRDDTRINSANGLEIKSTGSGSLLMVANVTTEHYGNYTC	287
SEQIDNO: 112	TGKQALLRCEASAVPAEDFEWYRDDTRINSAQGLEIPNTGSRSVLMVANVTTEHYGNYTC	287
SEQIDNO: 113	VGRNGTLRCEVTAVPTPEFEWYRDDKRLANTQSITITQTSSTTSLTIANITTEHYGNYTC	289
	* : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Membrana trans.

```

SEQIDNO:67      VAANKLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:68      VAANKLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:69      VAANKLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:70      VAANKLGVTNASLVLFESKYAKTSPDSMQVIE-FLHTDLKSLRHFL-KVNPIQK----- 341
SEQIDNO:71      VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTFIDNATSLAASLWIMANILLCLF-CTC----- 337
SEQIDNO:72      VATNRLGVENASVFLYKEGMRGRDINSAGCICQSIWLLLLCVSSAL-LQC----- 333
SEQIDNO:102     VAANKLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:103     VAANNLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:104     VAANNLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:105     VAANNLGMTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:106     IADMQLGKTRKTVTLTGKPKTAVF---RSVPNSQWKDKYNIWIVDSHSPIEEFKLYYRQ 332
SEQIDNO:107     VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTFIDSATSLAASLWIMANILLCLF-CTC----- 334
SEQIDNO:108     VAANNLGVTNASLVLFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:109     VAANKLGVTNASLILFREGSVRGINGSISLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 338
SEQIDNO:110     VAANKLOVTNASLYLYPPTGRVBNQSVSLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 339
SEQIDNO:111     VAANKLGVTNASLYLYRPGTGRVDNGSMSLAVFLWLLAASLLCCLL-SKC----- 335
SEQIDNO:112     VAANKLGITNTSLYLYI-GPGTFIDSATSLAASLWIMANILLCLF-CTC----- 334
SEQIDNO:113     VASNRLGVQNASLFLYRPGTGRDINGSACVQSLLWLLLASFACLF-LKC----- 337

```

ES 3 004 084 T3

```

SEQIDNO:67 ..... 338
SEQIDNO:68 ..... 338
SEQIDNO:69 ..... 338
SEQIDNO:70 ..... 341
SEQIDNO:71 ..... 337
SEQIDNO:72 ..... 333
SEQIDNO:102 ..... 338
SEQIDNO:103 ..... 338
SEQIDNO:104 ..... 338
SEQIDNO:105 ..... 338
SEQIDNO:106 MTFSTGQLQPLQTHWADIVLFAFFYSHNYTGGNSYLIHGLEFDQZYEARVQAPNRYGMSD 393
SEQIDNO:107 ..... 334
SEQIDNO:108 ..... 338
SEQIDNO:109 ..... 338
SEQIDNO:110 ..... 338
SEQIDNO:111 ..... 335
SEQIDNO:112 ..... 334
SEQIDNO:113 ..... 337

```

```

SEQIDNO:67 ..... 339
SEQIDNO:68 ..... 339
SEQIDNO:69 ..... 339
SEQIDNO:70 ..... 341
SEQIDNO:71 ..... 337
SEQIDNO:72 ..... 333
SEQIDNO:102 ..... 338
SEQIDNO:103 ..... 338
SEQIDNO:104 ..... 338
SEQIDNO:105 ..... 338
SEQIDNO:106 FSLSPFPTISNTCHWMOGOCINPC 417
SEQIDNO:107 ..... 334
SEQIDNO:108 ..... 338
SEQIDNO:109 ..... 338
SEQIDNO:110 ..... 338
SEQIDNO:111 ..... 335
SEQIDNO:112 ..... 334
SEQIDNO:113 ..... 337

```

LIMBIC/LSAMP					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_002329.2	<i>H. sapiens</i>	67	NP_001197297.1	<i>B. Taurus</i>	105
XP_516662.2	<i>P. troglodytes</i>	68	XP_312798.5	<i>A. gambiae</i>	106
XP_002716722.1	<i>O. cuniculus</i>	69	NP_001096385.1	<i>X. tropicalis</i>	107
NP_780757.1	<i>M. musculus</i>	70	XP_003434117.1	<i>C. lupus familiaris</i>	108
NP_001086181.1	<i>X. laevis</i>	71	XP_001362972.1	<i>M. domestica</i>	109
NP_001034921.1	<i>D. rerio</i>	72	NP_990205.1	<i>G. gallus</i>	110
NP_058938.1	<i>R. norvegicus</i>	102	XP_002190582.1	<i>T. guttate</i>	111
XP_001502710.1	<i>E. caballus</i>	103	NP_001096385.1	<i>X. tropicalis</i>	112
NP_001231626.1	<i>S. scrofa</i>	104	XP_003449349.1	<i>O. niloticus</i>	113

FIGURA 8: ALINEACIÓN DE ENDOLINA HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

	SECUENCIA SEÑAL	DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP
SEQIDNO: 5	MSRLSRSLWAAATCLAVLCVSAQPNITTLAPNVTEVET-----TT-----TKVVPTTQM	53
SEQIDNO: 73	MSGSRRLWAAATCLAVLCVSAQPNITTLAPNVTEVET-----TT-----TKVVPTTQM	50
SEQIDNO: 74	MSRLSRSLWAAATCLAVLCVSAQPNITTLAPNVTEVET-----TT-----TKVVPTTQM	53
SEQIDNO: 75	MSGLSRQLLWAVGCLAALCVLTAAGNTTLA-FNVTEASS-FPEITTTVPVSPPTTLSPPLV	54
SEQIDNO: 76	MSGLSRQLLWAVGCLAALCVLTAAGNTTLA-FNVTEASS-FPEITTTVPVSPPTTLSPPLV	56
SEQIDNO: 77	MSGLSRQLLWAVGCLAALCVLTAAGNTTLA-FNVTEASS-FPEITTTVPVSPPTTLSPPLV	58
SEQIDNO: 78	MSGLSRQLLWAVGCLAALCVLTAAGNTTLA-FNVTEASS-FPEITTTVPVSPPTTLSPPLV	55
SEQIDNO: 79	MSGASRLWAAATCLAVLCVSAQPNITTLAPNVTEVET-----TT-----TKVVPTTQM	49

	DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
SEQIDNO: 5	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								110
SEQIDNO: 73	PTVLPETCASFNCSVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								109
SEQIDNO: 74	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								110
SEQIDNO: 75	PTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								108
SEQIDNO: 76	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								112
SEQIDNO: 77	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								112
SEQIDNO: 78	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								112
SEQIDNO: 79	TTTAPETCEGRNSCVSCFNASTV-NTTCFWIECKD--ESYCSHNSTVSDCVVNTTGFC								108
	*	*	*	*	*	*	*	*	*

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP		
SEQIDNO: 5	VPT-ATVPTANSTAKPTVQPSSTT-SKVTTLSTNTNTVPTISQPVKSTFPAASFIG	168
SEQIDNO: 73	VIPPTTPVPT-NSTAKPTTRESSPIPTPSVVISAGETNTTLLTPTISQPERKSTFLAASFIG	168
SEQIDNO: 74	VPT-ATLVPTANSTAKPTVQPSSTT-SKVTTLSTNTNTVPTISQPVKSTFPAASFIG	168
SEQIDNO: 75	GPT-VEPLPT-NSTAKTTTTLPSSSA-STTATTSGETNTTLAFTTQPMRKSTFPAASFIG	165
SEQIDNO: 76	VPT-TTPTPT-NSTAKTTTTLGGTTT-STTATTSGETNTTLSPITQPTRKSTFPAASFIG	169
SEQIDNO: 77	VPT-TTPTPT-NSTAKTTTTLESTTT-STTATTSGETANTTLTETIQPMRKSTFPAASFIG	169
SEQIDNO: 78	APE-FTMPT-NSTAKPTTQPSSTA-TTTATTSGETNTLSPITSQPERKSTFPAASFIG	169
SEQIDNO: 79	VIP-TTPVPT-NSTAKPTTRESSPIPTPSVVISAGATNTTVPTISQPERKSTFPAASFIG	166
	* * * * *	* * * * *

Membrana trans. Cola citoplasmática

SEQIDNO: 5	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	197
SEQIDNO: 73	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	197
SEQIDNO: 74	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	197
SEQIDNO: 75	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	194
SEQIDNO: 76	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	196
SEQIDNO: 77	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	196
SEQIDNO: 78	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	196
SEQIDNO: 79	GIVLVLCVQAVIFFLYKFKCKSKERNYHTL	195

Endolina					
N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:	N.º de registro	Especie	SEQ ID NO:
NP_006007.2	<i>H. sapiens</i>	5	NP_001039506.1	<i>B. taurus</i>	76
NP_058594.1	<i>M. musculus</i>	73	XP_004011265.1	<i>O. arles</i>	77
XP_001091286.1	<i>M. mulatto</i>	74	XP_532256.2	<i>C. lupus familiaris</i>	78
XP_001924661.2	<i>S. scrofa</i>	75	NP_114000.1	<i>R. norvegicus</i>	79

FIGURA 10: ALINEACIÓN DE LAMP5 HUMANA CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS

	SECUENCIA SEÑAL	DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP
		1
SEQIDNO: 93	MDLRGPAVPSIURLRVLLMLFHTMAQIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 94	MDLRGPAVPSIURLRVLLMLFHTMAQIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 95	MDLRGPAVPSVDRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 96	MDLRGPAVPSVYRLRVLLMLFHTMAQIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 97	MDLRFPALLSGDRLRVLLMLFHTVTRIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 98	MDLRVKTLLGGDLRLRLMLFPFHVIVQTVAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 99	MDLRGPALLSGDRLRLRLMLFHTMAQIMAEQEVENLSGLSTNPEKDI FVVRNNGTTCILMA	60
SEQIDNO: 100	-----MAAGRLPGLLPFLHAAAPLAAEQEVENLSGLSPNPEKDI FVVRNRTTCILMA	52
SEQIDNO: 101	--MEYRACTSALRNPVLLILLCTFSCNLAQEVENLSGLSSNPDKNI FAIRENNGTTCILMA	58

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

SEQIDNO:93	EFAAKEIVPVYDVGASNYVLDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:94	EFAAKEIVPFDVGASNYVLDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:95	EFAANTIVPFDVGASNYVLDLITEQADIALTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:96	EFAAKEIVPFDVGASNYVLDLITEQADISLTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:97	EFAANTIVPFDVGASNYVLDLITEQADISLTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:98	EFAAKEIVPFDVGASNYVLDLITEQADISLTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:99	EFAAKEIVPFDVGASNYVLDLITEQADISLTRGAEVKGRCGHSGSELEQVFWVDRAVALKML	120
SEQIDNO:100	EFAAKEIVPFDVGASNYVLDLITEQADISLTRGAEMKGRCGTWSSELEISWLERAYTLKLF	112
SEQIDNO:101	EFSARILVPYEVPSSEVDWDLERASIQLPDTEIRPKCWNNESEHLWSWLDKAYTLKLF	118

DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAMP

SEQIDNO:93	FVK-----	ESNNMSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:94	FVK-----	ESNNMSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:95	FVK-----	ESNNTSKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:96	FVK-----	ESRNASKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:97	FLK-----	ESNNTFKGPEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:98	FVK-----	ESNNTSKGPEATWRLKRVHVVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:99	FVK-----	ESNNTSKGLEATWRLSKVQFVYDSSEKTHF	153
SEQIDNO:100	FLKVRGCPRLGPGPCAAALRGPDQPCPPQEGHNTSRGPEATWPLSRIGQPSYDTSERTYF		172
SEQIDNO:101	FSK-----	EGQDA--SKSRWMSKIQFLYDPSERTIF	149
	* * *	* * * * *	

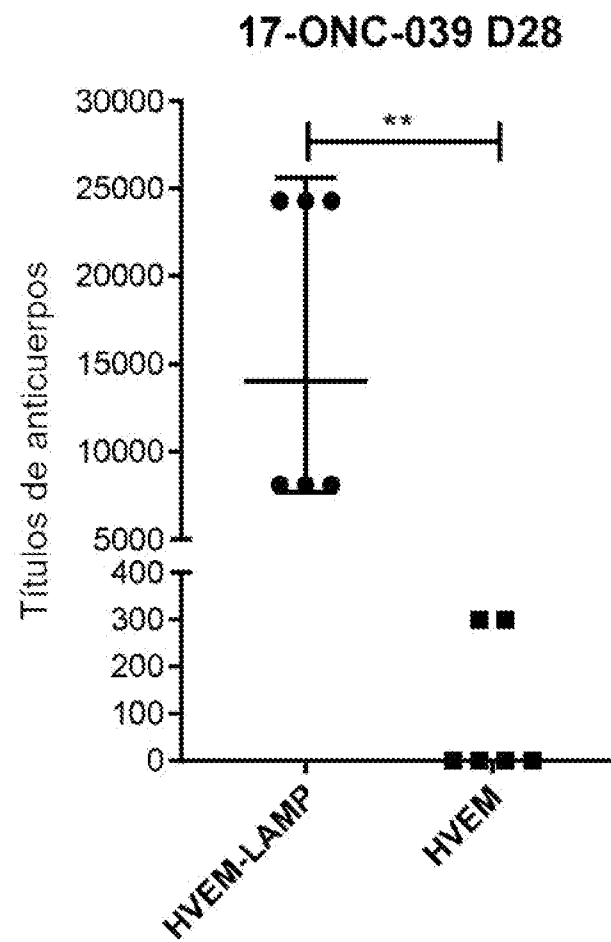


Figura 11

Anticuerpo de IgG específico
para HVEM (día 28)

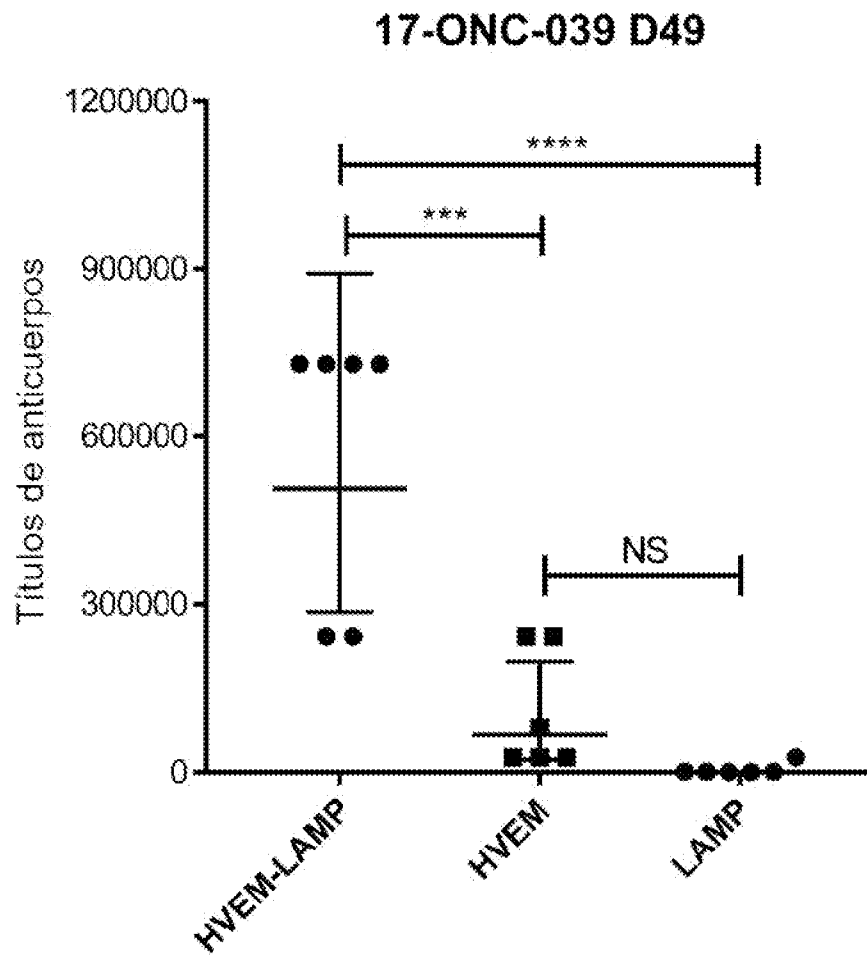


Figura 12

Anticuerpo de IgG específico para HVEM (día 49)

Figura 13:

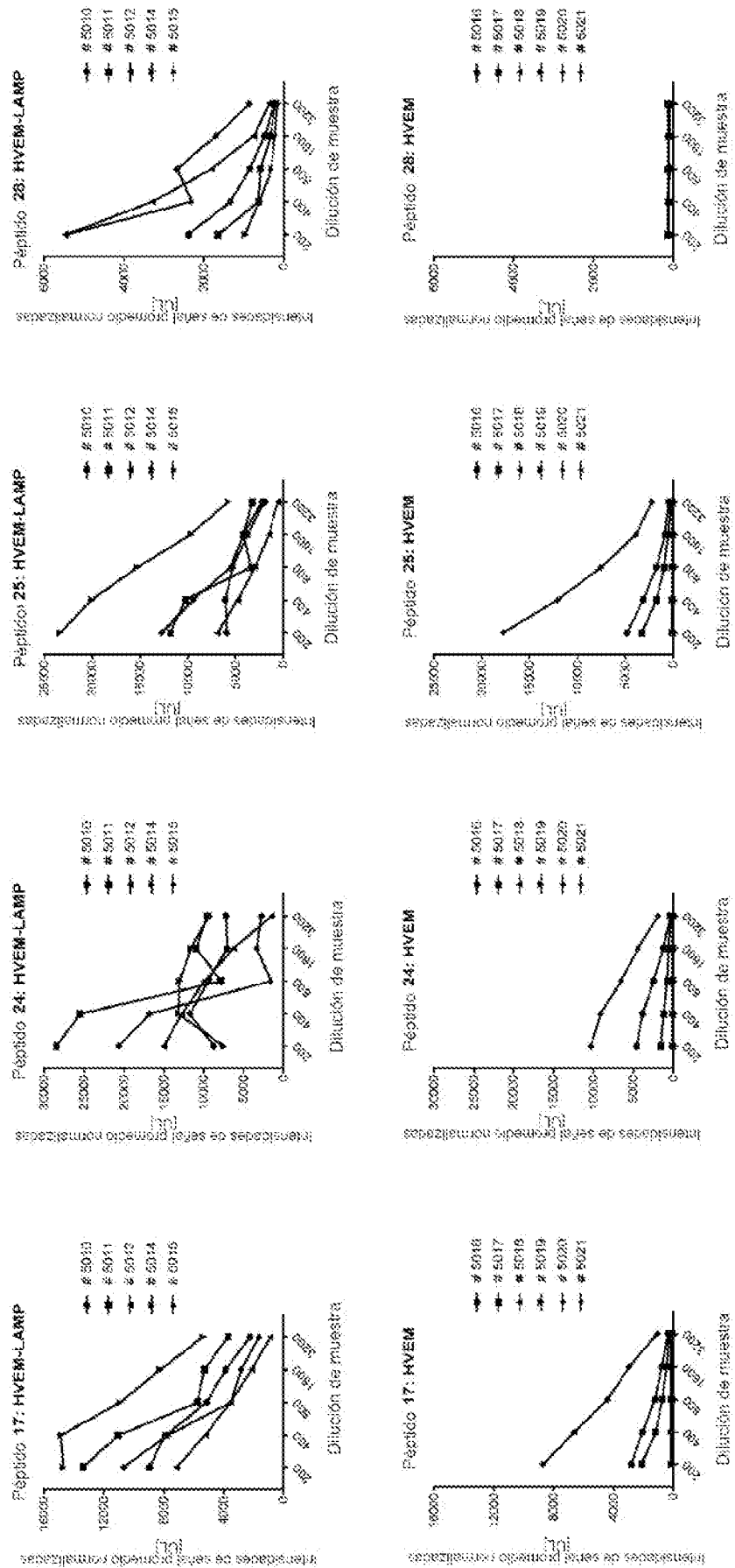


Figura 14

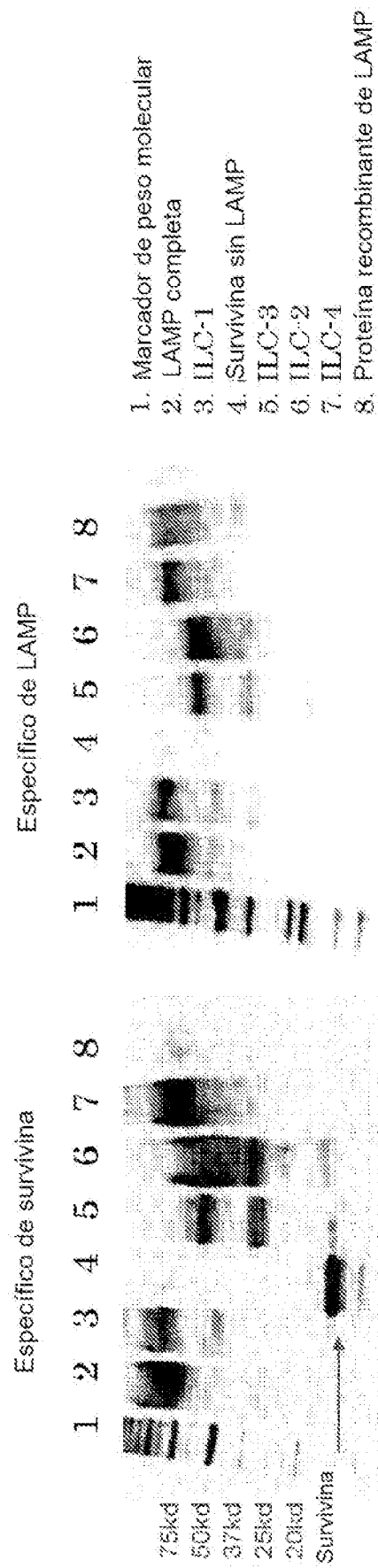


Figura 15:

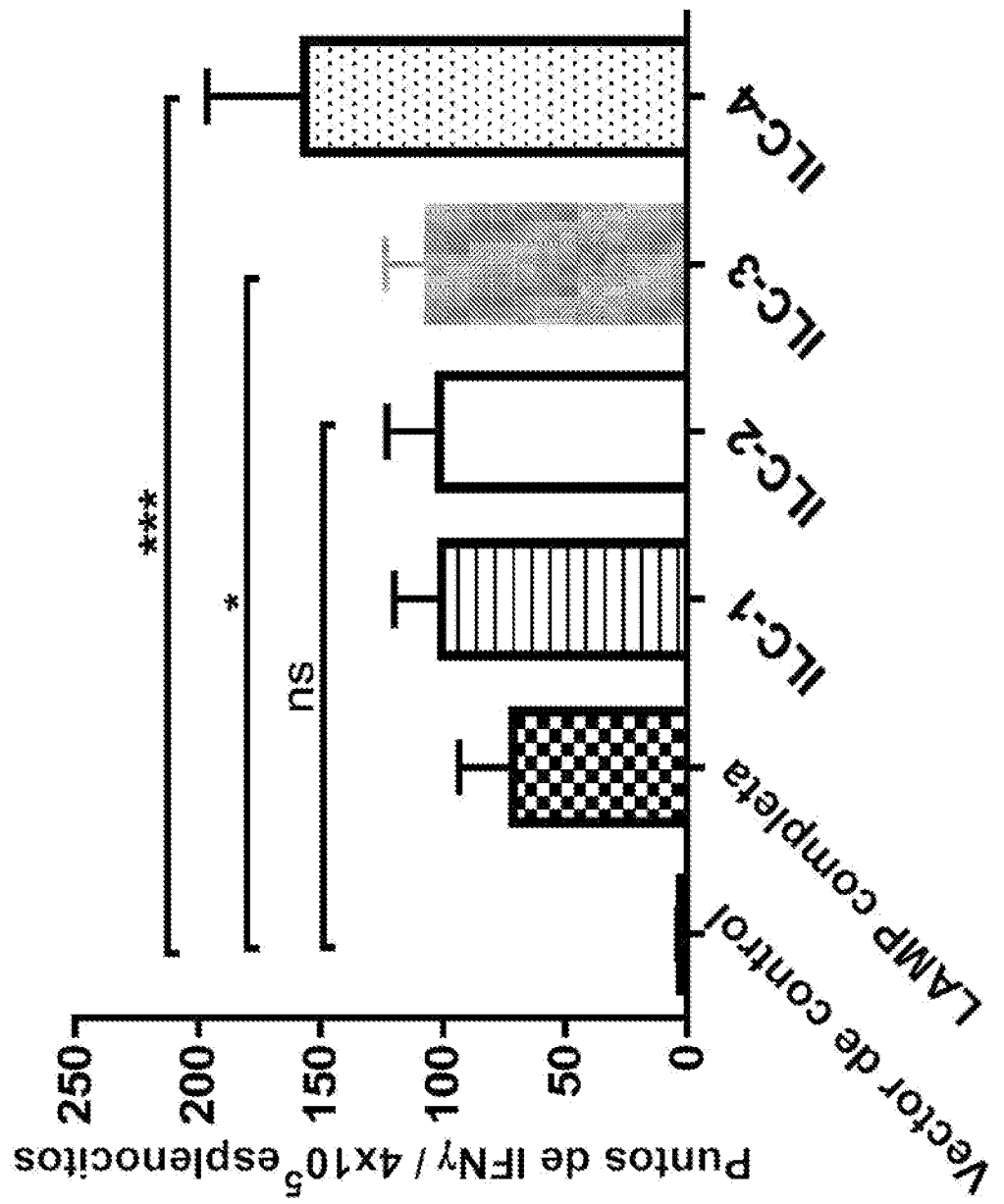


Figura 16

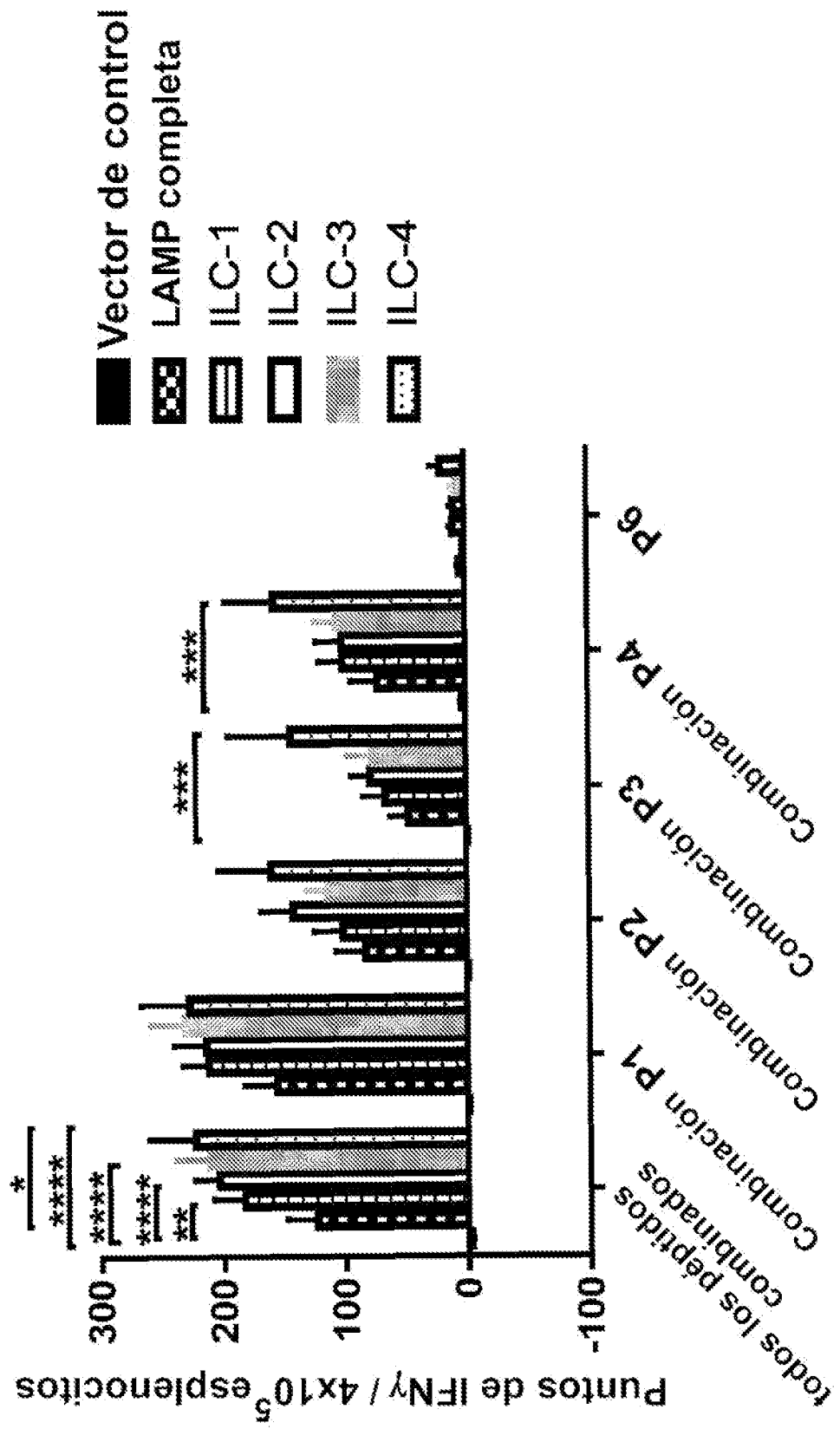


Figura 17

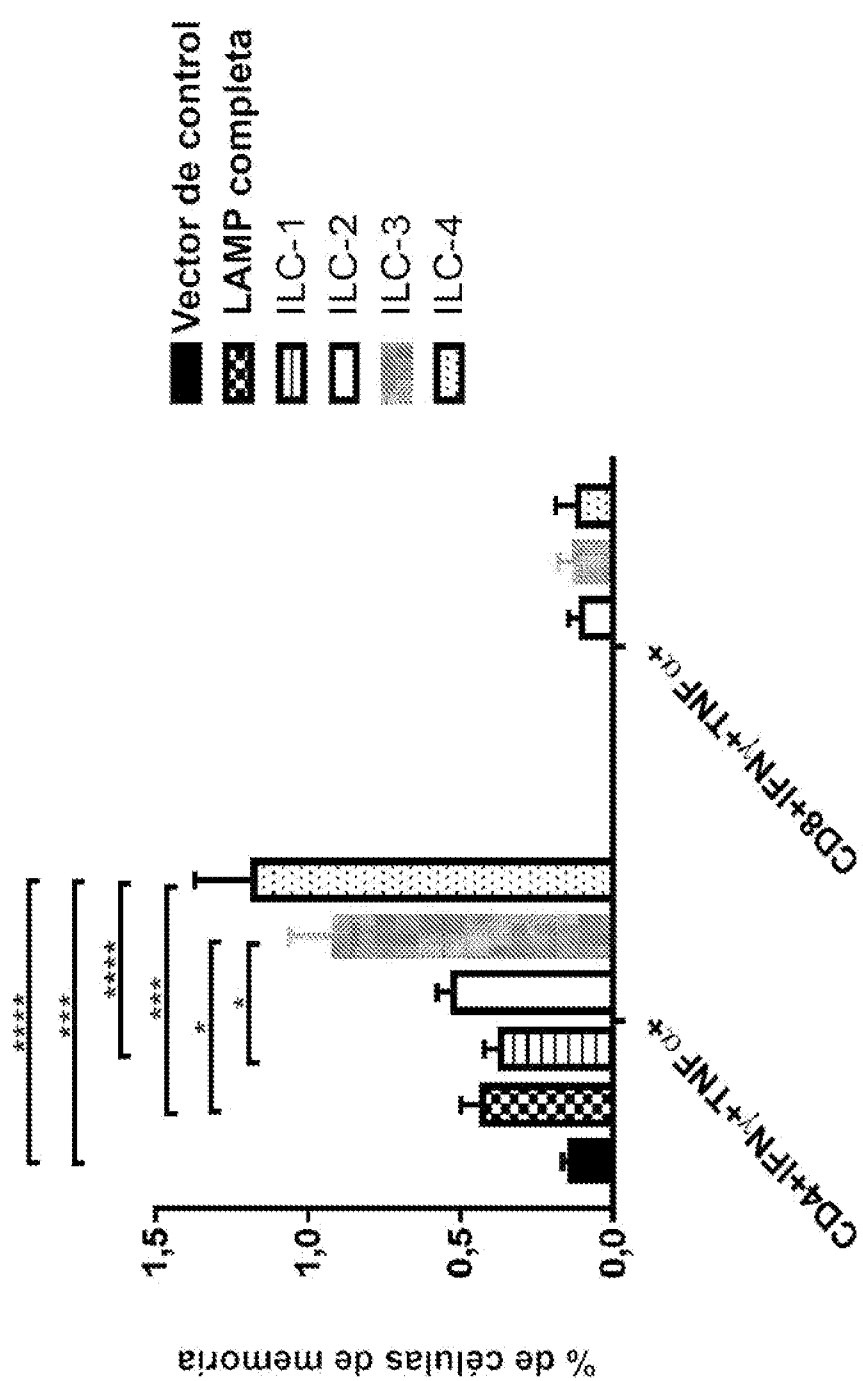


Figura 18:

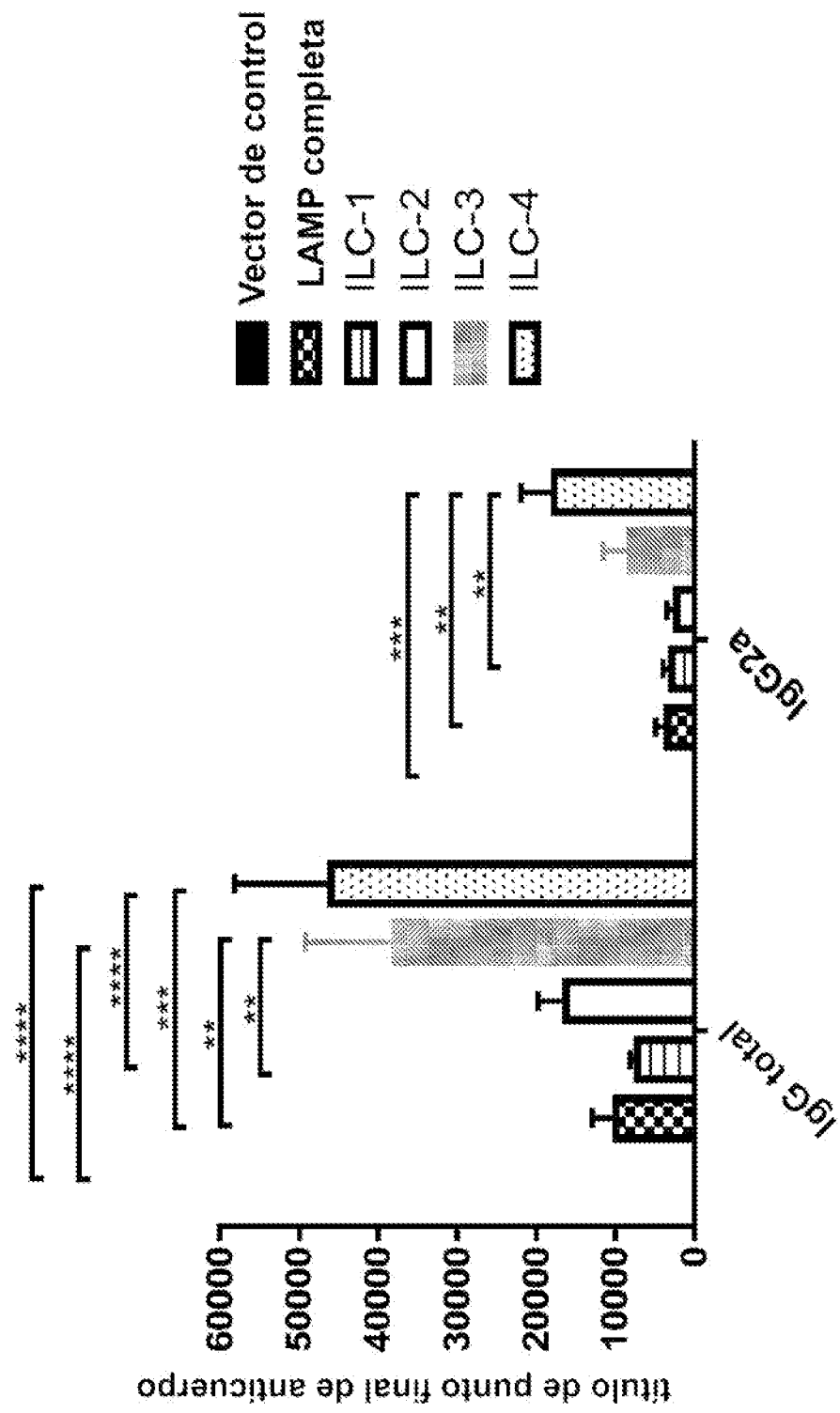


Figura 19

Survivina - Ejemplo de un constructo de LAMP completo (SEQ ID NO:115)

maprsarrpllllllllglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLIASMGLQLNLTIERKDNNTTVTR
LLNINPNKTSASGSCGAHLVTLEHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYK
CNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEM**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACT**
TPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFKCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIA
KETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMDFTLIPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI

Survivina - Ejemplo de un constructo de ILC-1 (SEQ ID NO:116)

maprsarrpllllllllglmhcasaa**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFK**
FKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAM
DAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTNFRN
ATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETR
CEQDRPSPTTAPPAPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLIASMGLQLNLTIERKDNNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAH
LVTLEHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHVRVTKAFSVNIF
KVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEMLIPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI

Survivina - Ejemplo de un constructo de ILC-2 (SEQ ID NO:117)

maprsarrpllllllllglmhcasaa**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFK**
KELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD
AMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTNFRNAT
RYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDATIQAYLSNSSFSRGETRCE
QDILPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI

Survivina - Ejemplo de un constructo de ILC-3 (SEQ ID NO:118)

maprsarrpllllllllglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLE**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQ**
CFKCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAA
MDEFTLIPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI

Survivina - Ejemplo de un constructo de ILC-4 (SEQ ID NO:119)

maprsarrpllllllllglmhcasaaMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDP
SLVIAFGRGHTLTNFRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLH
DATIQAYLSNSSFSRGETRCEQDLE**MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLA**
QCFFCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQ
LAAMDFTCLIASMGLQLNLTIERKDNNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLEHSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQ
IQNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHVRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSEM
LIPIAVGGALAGLVLIIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI