

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 518**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10822611 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2486134**

54 Título: **Uso de receptores semejantes a Toll y agonista para tratar cáncer**

30 Prioridad:

06.10.2009 US 249253 P

07.10.2009 US 249596 P

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

28.04.2014

73 Titular/es:

PANACELA LABS, INC. (50.0%)

73 High Street

Buffalo, NY 14203, US y

ROSWELL PARK CANCER INSTITUTE (50.0%)

72 Inventor/es:

GUDKOV, ANDREI V.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 457 518 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

Uso de receptores semejantes a Toll y agonista para tratar cáncer

Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para tratar cáncer y enfermedades infecciosas.

5 Antecedentes de la invención

Los receptores semejantes a Toll son responsables del reconocimiento de los patrones más comunes de patógenos bacterianos y virales. Su activación resulta en el reclutamiento de la respuesta inmune innata y posteriormente adaptativa. Las células receptoras del sistema inmune en el sitio de la presencia de antígenos es una etapa clave en una respuesta inmune eficaz. Ésta es la razón por la que la inmunización implica el uso de diferentes tipos de adyuvantes. Aunque la mayoría de los tumores expresan antígenos específicos de tumor, usan varios mecanismos que les permiten escapar del reconocimiento inmune. Se ha demostrado recientemente en modelos de ratón que la activación de TLR5 por su ligando y agonista, flagelina bacteriana, resulta en la inducción de un efecto antitumoral frente a aquellos tumores que expresan TLR5 funcional. Esto abre una oportunidad general para considerar a los agonistas de TLR5 en la inmunoterapia del cáncer. Existen dos obstáculos principales en el camino de llevar esta idea a la práctica. En primer lugar, está la rara incidencia de tumores que expresan TLR5 funcional que limita la aplicabilidad de esta estrategia sólo a un subconjunto pequeño de tumores. En segundo lugar, la administración sistémica de agonista de TLR5 da lugar a la activación de la señalización de TLR5 en todas las células que tienen receptor funcional haciendo que la respuesta no esté centrada y no sea específica de tumor. De acuerdo con esto, existe una necesidad en la técnica de un mecanismo o método para la activación autocrina de la señalización del receptor TLR en células infectadas o tumorales con un efecto sistémico mínimo permitiendo así atraer la respuesta inmune innata específicamente a la célula infectada o tumoral.

Resumen de la invención

La presente invención puede estar dirigida a un vector que comprende un primer y segundo ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico codifica un receptor semejante a toll y el segundo ácido nucleico codifica un agonista de receptor semejante a toll. El primer ácido nucleico puede codificar una forma secretada de un receptor semejante a toll. El segundo ácido nucleico puede ser una forma secretada de flagelina. El agonista de receptor semejante a toll puede ser flagelina. El vector puede ser un vector de expresión de mamíferos. El vector puede expresarse a partir de un adenovirus, un lentivirus o un liposoma. La forma secretada de flagelina puede ser CBLB502S. El receptor semejante a toll puede ser TLR-5.

La presente invención puede usarse para tratar cáncer en un mamífero que comprende administrar a un mamífero que lo necesite un agente que comprende el vector que comprende un primer y segundo ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico codifica un receptor semejante a toll y el segundo ácido nucleico codifica un agonista de receptor semejante a toll. El cáncer puede ser un tumor. El tumor puede derivar del grupo que consiste en próstata, mama, colon, esófago, estómago, pulmón, pancreático, renal, tiroides, ovarios garganta o el cuello uterino. El tumor puede derivar del grupo que consiste en sarcomas, melenomas, leucemias y linfomas. El agente puede administrarse en trans o fuera del tumor del mamífero. El agente puede administrarse directamente en un tumor del mamífero. El agente puede administrarse en combinación con un inmunoestimulador. El inmunoestimulador puede seleccionarse del grupo que consiste en hormona del crecimiento, prolactina y vitamina D. La hormona de crecimiento puede ser somatotrofina. El agente puede administrarse en combinación con una citoquina. La citoquina puede ser un factor de células madre.

La presente invención también puede usarse para tratar una infección en un mamífero que comprende administrar a un mamífero que lo necesite el agente del agente que comprende el vector que comprende un primer y segundo ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico codifica un receptor semejante a toll y el segundo ácido nucleico codifica un agonista de receptor semejante a toll. El cáncer puede ser un tumor. La infección puede derivar del grupo que consiste en virus, bacterias, parásitos protozoarios y hongos.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1A-1C representa mapas esquemáticos de vectores adenovirales que expresan TLR5, CBLB502S y su combinación (TLR5 + CBLB502S).

La Figura 2 representa los resultados de la proporción del volumen tumoral en ratones durante un número de días en células tumorales (A549) transducidas con un vector control (sin TLR5) o vector que expresa TLR5 en el que los ratones se tratan tres días bien con CBLB502S o PBS.

La Figura 3 representa la supresión del crecimiento tumoral por inyección de adenovirus que comprenden vector que coexpresa CBLB502S y receptor semejante a Toll en el que el adenovirus se inyecta en tumor de carcinoma de colon CT26 de ratones singénicos y se estudian los efectos en cis y en trans de las construcciones de vectores adenovirales.

La Figura 4 muestra la estructura de dominio de flagelina bacteriana. La traza del núcleo Ca, distribución del núcleo hidrofóbico e información estructural de F41. Cuatro núcleos hidrofóbicos distintos que definen los dominios D1, D2a, D2b y D3. Todos los átomos de cadena lateral hidrofóbicos se representan con el núcleo Ca. Los átomos de la cadena lateral están codificados por color: Ala, amarillo; Leu, Ile o Val, naranja; Phe y Tyr, morado (átomos de carbono) y rojo (átomos de oxígeno). c, Posición y región de varias características estructurales en la secuencia de aminoácidos de la flagelina. Se muestran, de arriba a abajo: el fragmento F41 en azul; tres plegamientos en hoja b en marrón; la distribución de la estructura secundaria con una hélice a en amarillo, estructura b en verde y giro b en morado; la marca tic en cada 50 residuo en azul; los dominios D0, D1, D2 y D3; la región de contacto de la subunidad axial en el proto-elemento en magenta; la secuencia de aminoácidos bien conservada en rojo y la región variable en violeta; las mutaciones puntuales en F41 que producen los elementos de diferentes superenrollamientos. Las letras en la parte inferior indican la morfología de elementos mutantes: L (D107E, R124A, R124S, G426A), lineal tipo L; R (A449V), lineal tipo R; C (D313Y, A414V, A427V, N433D), curly33.

La Figura 5 muestra un esquema de los dominios de flagelina de Salmonella, sus fragmentos y su interacción con TLR5. Las barras oscuras indican regiones del gen de flagelina usadas para construir fragmentos que comprenden A, B, C, A' y B'.

La Figura 6 representa derivados de flagelina. La estructura de dominio y límites aproximados (coordenadas de aminoácidos) de derivados de flagelina seleccionados (listados a la derecha). La flagelina FlIC de Salmonella dublin está codificada en 505 aminoácidos (aa).

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos para las variantes de flagelina siguientes: AA' (SEQ ID NO: 7-8), AB' (SEQ ID NO: 9-10), BA' (SEQ ID NO: 11-12), BB' (SEQ ID NO: 13-14), CA' (SEQ ID NO: 15-16), CB' (SEQ ID NO: 17-18), A (SEQ ID NO: 19-20), B (SEQ ID NO: 21-22), C (SEQ ID NO: 23-24), GST-A' (SEQ ID NO: 25-26), GST-B' (SEQ ID NO: 27-28), AA'n1-170 (SEQ ID NO: 29-30), AA'n1-163 (SEQ ID NO: 33-34), AA'n54-170 (SEQ ID NO: 31-32), AA'n54-163 (SEQ ID NO: 335-36), AB'n1-170 (SEQ ID NO: 37-38), AB'n1-163 (SEQ ID NO: 39-40), AA'n1-129 (SEQ ID NO: 41-42), AA'n54-129 (SEQ ID NO: 43-44), AB'n1-129 (SEQ ID NO: 45-46), AB'n54-129 (SEQ ID NO: 47-48), AA'n1-100 (SEQ ID NO: 49-50), AB'n1-100 (SEQ ID NO: 51-52), AA'n1-70 (SEQ ID NO: 53-54) y AB'n1-70 (SEQ ID NO: 55-56). La secuencia líder pRSETb se muestra en *itálica* (el líder incluye Met, que también es el aminoácido 1 de FlIC). El dominio constante N terminal está subrayado. La secuencia conectora de aminoácidos está en **negrita**. El dominio constante C terminal está subrayado. GST, si está presente, está resaltado.

La Figura 8 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos del extremo conservado amino (Fig. 8A) y carboxi (Fig. 8B) de 21 especies de bacterias. Los 13 aminoácidos conservados importantes para la actividad TLR5 se muestran con sombreado. Las secuencias de aminoácidos se identifican por sus números de registro de TrEMBL (primera letra= Q) o Swiss-Prot (primera letra= P).

La Figura 9 muestra la secuencia de ácido nucleico y aminoácidos para la proteína receptora semejante a Toll 5 humana.

Descripción detallada

Los inventores han hecho el descubrimiento sorprendente de que la provisión de un receptor semejante a toll, tal como el receptor semejante a toll 5 (TLR-5), en combinación con un agonista del receptor semejante a toll, tal como flagelina, resulta en un efecto cis y trans que recluta células implicadas en la respuesta inmune tanto innata (efecto cis) como adaptativa (efecto trans) para matar específicamente células cancerosas y células infectadas con un patógeno a través de la ruta de apoptosis de NF- κ B. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría, la idea implementada en esta invención fue (i) superar la dependencia de las estrategias de inmunización mediadas por TLR en la expresión de TLR preexistente en un tumor mediante la transducción del tumor con una construcción que dirige la expresión de TLR; y (ii) dirigir la respuesta inmune al tumor mediante la creación de un conjunto local de agonista de TLR. Por ejemplo, las formulaciones de fármaco que comprenden TLR simultáneamente inducen la expresión y activan TLR, exponiendo de esta manera a las células tumorales al sistema inmune del huésped imitando la situación de penetración bacteriana masiva a través de la pared intestinal.

Mediante la provisión de un TLR tal como TLR5 y un agonista de TLR tal como flagelina, para interaccionar y activar el sistema inmune tanto innato como adaptativo, el método puede usarse para tratar tumores derivados del cáncer de próstata, mama, colon, esófago, estómago, pulmón, pancreático, renal, tiroides, ovarios, garganta o el cuello uterino así como para tratar sarcomas, melenomas, leucemias y linfomas. Las aplicaciones de este método no están limitadas a tratamientos de cáncer, ya que este método también puede usarse para tratar infecciones derivadas de virus, bacterias, parásitos protozoarios y hongos.

Las variaciones en la provisión del TLR y agonista de TLR pueden incluir vectores, que co-expresan el receptor TLR y una forma secretable de flagelina que activa la actividad TLR en la misma célula de mamífero comprometida. El método de la presente invención también puede incluir construcciones de vector que expresan el receptor TLR en una célula de mamífero y el agonista de TLR que se está administrando en trans a la célula. Por ejemplo, un vector adenoviral puede requerir la modificación de flagelina para conseguir su síntesis y secreción eficaz por las células de mamífero.

1. Definiciones.

La terminología usada en la presente memoria es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante. Tal y como se usa en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

- 5 Para el recitado de intervalos numéricos en la presente memoria, se contempla explícitamente cada número que interviene en el citado intervalo con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

"Administrar" puede significar una única dosis o múltiples dosis de un agente o agente.

- 10 "Análogo" puede significar, en el contexto de un péptido o polipéptido, un péptido o polipéptido que comprende uno o más aminoácidos no estándar u otras variaciones estructurales del conjunto convencional de aminoácidos.

- "Anticuerpo" puede significar un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos, o derivados de éstos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos de cadena única, fragmentos divalentes, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de éstos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad o mezclas de éstos que presenta una especificidad de unión suficiente para un epítipo deseado o una secuencia derivada de éste. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede derivatizarse por la unión de uno o más restos químicos, peptídicos o polipeptídicos conocidos en la técnica. El anticuerpo puede conjugarse con un resto químico.

- 20 Un "derivado" puede significar un péptido o polipéptido diferente en algo distinto de la estructura primaria (aminoácidos y análogos de aminoácidos). Los derivados pueden diferenciarse por estar glicosilados, una forma de modificación posterior a la traducción. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden presentar patrones de glicosilación debidos a la expresión en sistemas heterólogos. Si se retiene al menos una actividad biológica, estos péptidos o polipéptidos son derivados según la invención. Otros derivados pueden incluir péptidos de fusión o polipéptidos de fusión que tienen un extremo N o C modificado covalentemente, péptidos o polipéptidos PEGilados, péptidos o polipéptidos asociados con restos lipídicos, péptidos o polipéptidos alquilados, péptidos o polipéptidos unidos mediante un grupo funcional de la cadena lateral de un aminoácido a otros péptidos, polipéptidos o químicos y modificaciones adicionales como se entenderá en la técnica.

Un "fragmento" puede significar una parte de un péptido o polipéptido de referencia.

Un "homólogo" puede significar un péptido o polipéptido que comparte un ancestro evolutivo común.

- 30 Una "secuencia líder" puede ser un ácido nucleico que codifica cualquier secuencia peptídica que está unida y se traduce con un péptido o polipéptido de interés para permitir que el péptido o polipéptido de interés se dirija apropiadamente a través del retículo endoplásmico y complejos de Golgi de una célula eucariota para el propósito de la secreción extracelular desde la membrana celular. La secuencia peptídica líder puede derivar de fosfatasa alcalina. La secuencia líder puede tener una secuencia de ADN que comprende
- 35 atgctgctgctgctgctgctggcctgaggctacagctct cctgggc.

- Un "liposoma" puede significar una burbuja muy pequeña (vesícula) compuesta por el mismo material que la membrana celular. Un liposoma puede llenarse con fármacos y usarse para administrar fármacos para cáncer y otras enfermedades. Un liposoma puede rellenarse con un vector. Una membrana liposomal puede estar compuesta de fosfolípidos, que son moléculas que tienen un grupo de cabeza y un grupo de cola. La cabeza del liposoma puede estar atraída por el agua y la cola, que está compuesta por una cadena hidrocarbonada larga, es repelida por el agua. Las colas pueden estar repelidas por el agua y alinearse para formar una superficie alejada del agua. Los lípidos en la membrana plasmática pueden ser principalmente fosfolípidos como fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Los liposomas pueden estar compuestos por fosfolípidos derivados de naturales con cadenas lipídicas mixtas (como la fosfatidiletanolamina de huevo) o de componentes tensioactivos puros como DOPE
- 45 (dioleoilfosfatidiletanolamina).

Un "péptido" o "polipéptido" puede significar una secuencia de aminoácidos unida y puede ser natural, sintético o una modificación o combinación de natural y sintético.

- "Sustancialmente idéntico" puede significar que una primera y segunda secuencias de aminoácidos son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% sobre una región de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100 aminoácidos.
- 50

- "Tratar", "tratamiento" o "para tratar" puede significar cada uno para aliviar, suprimir, reprimir, eliminar, prevenir o ralentizar la aparición de síntomas, signos clínicos o patología subyacente de una afección o trastorno de una manera temporal o permanente. Prevenir una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto antes del inicio de la enfermedad. Suprimir una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la inducción de la afección o trastorno pero antes de su
- 55

aparición clínica. Reprimir la afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la aparición clínica de la enfermedad.

Una "variante" puede significar un péptido o polipéptido que se diferencia en la secuencia de aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservativa de aminoácidos, pero que retiene al menos una actividad biológica. Los ejemplos representativos de "actividad biológica" incluyen la capacidad de unirse a un receptor semejante a toll y ser unidos por un anticuerpo específico. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína de referencia con una secuencia de aminoácidos que retiene al menos una actividad biológica. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofiliidad, grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica como que implica típicamente un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132

(1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos con índices hidropáticos similares pueden sustituirse y aún así retener la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofiliidad de los aminoácidos también puede usarse para revelar sustituciones que resultarían en proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofiliidad de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofiliidad media local más alta de ese péptido, una medida útil que se ha indicado que se correlaciona bien con la antigenicidad e inmunogenicidad. Patente U.S. No. 4.554.101, incorporada en su totalidad en la presente memoria por referencia. La sustitución de aminoácidos que tienen valores similares de hidrofiliidad puede resultar en péptidos que retienen la actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tienen valores de hidrofiliidad dentro de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofiliidad de aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. Consistente con esta observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y, particularmente, las cadenas laterales de esos aminoácidos, como se revela por la hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y otras propiedades.

Un "vector" puede significar una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un plásmido, una levadura o un cromosoma artificial de mamífero. Un vector puede ser un vector de ARN o ADN. Un vector puede ser un vector extracromosómico auto-replicativo o un vector que se integra en el genoma de un huésped.

2. Receptor semejante a Toll

En la presente memoria se proporciona un receptor semejante a toll (TLR) que puede ser un tipo de receptor de reconocimiento de patrón (PRR). El TLR puede reconocer moléculas que son productos moleculares conservados derivados de patógenos que incluyen bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y virus, pero que se pueden distinguir de las moléculas del huésped, referidas colectivamente como patrones moleculares asociados con patógeno (PAMP). El TLR también puede reconocer moléculas endógenas liberadas de células dañadas o moribundas, referidas colectivamente como patrón molecular asociado a daño (DAMP). Un PAMP o DAMP puede ser un agonista de TLR como se describe adicionalmente más adelante. El TLR puede ser un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado que recluta moléculas adaptadoras en el citoplasma de células con el fin de propagar una señal. El TLR puede ser de un ser humano u otra especie de mamífero tal como mono rhesus, ratón o rata. El TLR puede ser al menos 30-99% idéntico a un TLR que recluta moléculas adaptadoras en el citoplasma de células con el fin de propagar una señal.

El TLR puede ser uno de entre diez y quince tipos de TLR que se estima que existen en la mayor parte de especies de mamíferos. El TLR puede ser uno de los 13 TLR (denominados simplemente TLR1 a TLR13) que se han identificado en seres humanos y ratones conjuntamente, o puede ser una forma equivalente que se ha encontrado en otras especies de mamíferos. El TLR puede ser uno de los 11 miembros (TLR1-TLR11) que se han identificado en los seres humanos.

El TLR puede expresarse por diferentes tipos de células inmunes y puede estar localizado en la superficie celular o en el citoplasma celular. El TLR puede expresarse en células cancerosas. El TLR puede ser expresado por células epiteliales normales en el sistema digestivo, queratinocitos normales en la piel, células epiteliales alveolares y bronquiales y células epiteliales del tracto reproductor femenino. Estas células que recubren un órgano pueden ser la primera línea de defensa frente a la invasión de microorganismos y los TLR expresados en las células epiteliales pueden tener un papel crucial en la regulación de la proliferación y apoptosis.

La célula cancerosa que expresa TLR puede seleccionarse de la tabla siguiente:

Tabla 1. Expresión de TLR en células cancerosas humanas

| TIPO DE CÁNCER | TLR |
|-------------------------|------------------------------|
| Cáncer gástrico | TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 |
| Cáncer colorrectal | TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 |
| Cáncer de ovario | TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 |
| Cáncer cervical | TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 |
| Cáncer de pulmón | TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 |
| Cáncer de próstata | TLR4, TLR9 |
| Melanoma | TLR2, TLR3, TLR4 |
| Cáncer de cerebro | TLR2, TLR4 |
| Cáncer de mama | TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 |
| Carcinoma hepatocelular | TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9 |
| Cáncer laríngeo | TLR2, TLR3, TLR4 |

El TLR expresado en células cancerosas puede regular al alza la cascada de NF- κ B y producir proteínas anti-apoptóticas que contribuyen a la carcinogénesis y proliferación de células cancerosas.

- 5 Se sabe que cuatro moléculas adaptadoras de TLR están implicadas en la señalización. Estas proteínas se conocen como factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), Tirap (también denominado Mal), Trif y Tram. Los adaptadores activan otras moléculas en la célula, incluyendo determinadas proteínas quinasas (IRAK1, IRAK4, TBK1 e IKKi) que amplifican la señal y finalmente dan lugar a la inducción o supresión de genes que orquestan la respuesta inflamatoria. Las rutas de señalización de TLR durante el reconocimiento del patógeno pueden inducir reacciones inmunes mediante rutas extracelulares e intracelulares mediadas por MyD88, factor nuclear potenciador de la
- 10 cadena ligera kappa de células B activadas (NF- κ B) y proteína quinasa asociada a mitógeno (MAPK). En total, miles de genes se activan por la señalización de TLR y, colectivamente, el TLR constituye una de las vías de entrada más pleiotrópicas, pero firmemente reguladas para la modulación génica.

- 15 Los TLR junto con los receptores de interleuquina-1 forman una superfamilia de receptores, conocida como la "superfamilia de receptor de interleuquina-1/receptor semejante a Toll". Todos los miembros de esta familia tienen en común un dominio denominado TIR (receptor Toll-IL-1). Pueden existir tres subgrupos de dominios TIR. Las proteínas con dominios TIR del subgrupo I son receptores para interleuquinas que son producidos por macrófagos, monocitos y células dendríticas y todos tienen dominios de inmunoglobulina (Ig) extracelulares. Las proteínas con dominios TIR del subgrupo II son TLR clásicos y se unen directamente o indirectamente a moléculas de origen microbiano. Un tercer subgrupo de proteínas que contienen dominios TIR (III) consiste en proteínas adaptadoras que son exclusivamente citosólicas y median la señalización de proteínas de los subgrupos 1 y 2. El TLR puede ser un
- 20 fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado que retiene bien un dominio TIR del subgrupo I, dominio TIR del subgrupo II o dominio TIR del subgrupo III.

- 25 El TLR puede funcionar como un dímero. Por ejemplo, aunque la mayor parte de los TLR parecen funcionar como homodímeros, TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6, teniendo cada dímero una especificidad de ligando diferente. EL TLR también puede depender de otros co-receptores para una sensibilidad completa para el ligando, tal como en el caso del reconocimiento por TLR4 de LPS, que requiere MD-2. Se sabe que CD14 y la proteína de unión a LPS (LBP) facilitan la presentación de LPS a MD-2.

a. TLR1

- 30 El TLR puede ser TLR-1, que reconoce PAMP con una especificidad para bacterias gram-positivas. TLR1 también se ha designado como CD281.

b. TLR5

- 35 El TLR puede ser el receptor semejante a Toll 5. La proteína codificada por el TLR-5 puede jugar un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. TLR-5 puede reconocer PAMP que se expresan en agentes infecciosos, y median la producción de citoquinas necesarias para el desarrollo de la inmunidad eficaz. TLR-5 puede reconocer flagelina bacteriana, un componente principal de los flagelos bacterianos y un factor de virulencia. La activación del TLR puede movilizar el factor nuclear NF- κ B y estimular la producción del factor de necrosis tumoral alfa.

3. Agonista del receptor semejante a Toll

En la presente memoria también se proporciona un agonista de TLR. El agonista de TLR puede ser un PAMP, que puede ser un producto molecular conservado derivado de un patógeno. El patógeno puede ser una bacteria Gram-positiva, bacteria Gram-negativa, hongo o virus. El agonista de TLR puede ser un ligando de patrón molecular asociado a daño (DAMP), que puede ser una molécula endógena liberada de células dañadas o moribundas. Un DAMP o PAMP puede iniciar una respuesta inmune a través de señales de TLR y reclutar moléculas adaptadoras en el citoplasma de células con el fin de propagar una señal. El agonista de TLR puede ser un agonista para el TLR, que puede ser un ligando de la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2. TLR y ligandos

| TLR | Ligando DAMP | Ligando PAMP |
|-----------|---|--|
| TLR1 | | Lipoproteínas triacilo |
| TLR2 | Proteínas de choque térmico | Péptidoglicano |
| | HMGB1 (alta movilidad del grupo de caja 1-anfoterina) | Lipoproteína |
| | | Ácido lipoteicoico |
| | | Zimosán |
| TLR3 | ARNds propio | ARNds viral |
| TLR4 | Proteínas de choque térmico | Proteínas de choque térmico |
| | Fibrinógeno | Lipopolisacáridos |
| | Heparán sulfato | Proteína de fusión RSV |
| | Fibronectina | Proteínas de la cubierta de MMTV (virus de tumor mamario de ratón) |
| | Ácido hialurónico | Paclitaxel |
| | HMGB1 | |
| TLR5 | | flagelina |
| TLR6 | | Ácido lipoteicoico |
| | | Lipoproteínas triacilo |
| | | zimosán |
| TLR | Ligando DAMP | Ligando PAMP |
| TLR7/TLR8 | ARNss propio | ARNss viral |
| TLR9 | ADN propio | ADN bacteriano y viral |
| TLR10 | | |
| TLR11 | | Profilina |

El agonista de TLR puede ser un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado de un PAMP o DAMP que se une a un TLR e induce la actividad mediada por TLR, tal como activación de actividad NF- κ B. El fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado agonista de TLR puede ser al menos 30-99% idéntico a los aminoácidos de un agonista de TLR e inducir actividad mediada por TLR.

El agonista de TLR puede estar dirigido a un TLR tal como TLR-5. El agonista de TLR puede ser un agonista de TLR-5 y estimular la actividad de TLR-5. El agonista de TLR puede ser un anticuerpo anti-TLR5 u otra molécula pequeña. El agonista de TLR puede ser flagelina.

La flagelina también puede ser una flagelina o polipéptido relacionado con flagelina. La flagelina puede ser de cualquier fuente, incluyendo una variedad de especies bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas. La flagelina puede ser un polipéptido de flagelina de cualquier especie bacteriana Gram-positiva o Gram-negativa incluyendo, pero no limitado a, un polipéptido de flagelina descrito en la Pub. de Pat. U.S. No. 2003/000044429. Por ejemplo, la flagelina puede tener una secuencia de aminoácidos de una especie bacteriana representada en la Figura 7 de la Publicación de Patente U.S. No. 2003/0044429. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de flagelina listadas en la Figura 7 de U.S. 2003/0044429 están disponibles públicamente en fuentes incluyendo la base de datos Genbank de NCBI. La flagelina también puede ser un péptido de flagelina correspondiente a un número de registro listado en los resultados BLAST mostrados en la Fig. 25 de la Pub. de Patente U.S. 2003/000044429, o una variante de éste. La flagelina también puede ser un polipéptido de flagelina como se describe en la Publicación de

Solic. de Patente U.S. No. 2009/0011982. La flagelina puede ser uno cualquiera de un polipéptido de flagelina como se describe en las Figuras 6 y 7 de la presente memoria.

La flagelina puede ser un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado de una flagelina que se une a TLR5 e induce actividad mediada por TLR5, tal como activación de actividad NF- κ B. Un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado de flagelina puede ser al menos 30-99% idéntico a los aminoácidos de una flagelina que se une a TLR5 e induce actividad mediada por TLR5.

La flagelina puede ser de una especie de *Salmonella*, un ejemplo representativo de la cual es *S. dublin* (codificada por Número de Registro GenBank M84972). El polipéptido relacionado con flagelina puede ser un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado de M84972, o combinación de éstos, que se une a TLR5 e induce actividad mediada por TLR5, tal como activación de actividad NF- κ B. Un fragmento, variante, análogo, homólogo o derivado de flagelina puede obtenerse por un diseño con base racional basado en la estructura de dominio de Flagelina y la estructura conservada reconocida por TLR5.

La flagelina puede comprender al menos 10, 11, 12 ó 13 de los 13 aminoácidos conservados mostrados en la Fig. 5 (posiciones 89, 90, 91, 95, 98, 101, 115, 422, 423, 426, 431, 436 y 452). La flagelina puede ser al menos 30-99% idéntica a los aminoácidos 1 174 y 418 505 de M84972. La Fig. 26 de la Publicación de Solic. de Patente U.S. No. 2009/0011982 lista el porcentaje de identidad del extremo amino y carboxi de la flagelina con actividad estimuladora de TLR-5 conocida, comparado con M84972.

La flagelina puede ser el componente principal del flagelo bacteriano. La flagelina puede estar compuesta por tres dominios (Fig. 4). El dominio 1 (D1) y el dominio 2 (D2) pueden ser discontinuos y pueden formarse cuando los residuos en el extremo amino y extremo carboxi se yuxtaponen por la formación de una estructura en horquilla. El extremo amino y carboxi que comprenden los dominios D1 y D2 pueden estar muy conservados, mientras el dominio variable medio (D3) puede ser altamente variable. Los estudios con una proteína recombinante que contiene el amino D1 y D2 y el carboxilo D1 y D2 separados por una bisagra de *Escherichia coli* (ND1-2/ECH/CD2) indican que D1 y D2 pueden ser bioactivos cuando se acoplan a un elemento ECH. Esta quimera, pero no la bisagra sola, puede inducir la degradación de I κ Ba, activación de NF- κ B y producción de NO e IL-8 en dos líneas celulares de epitelio intestinal. El dominio no conservado D3 puede estar en la superficie del filamento flagelar y puede contener los epítomos antigénicos principales. La actividad proinflamatoria potente de la flagelina puede residir en las regiones D1 y D2 N y C altamente conservadas (Véase la Figura 4).

La flagelina puede inducir la actividad de NF- κ B mediante la unión al receptor semejante a Toll 5 (TLR5). El TLR puede reconocer una estructura conservada que es particular de la flagelina. La estructura conservada puede estar compuesta por un gran grupo de residuos que de alguna manera son permisivos a variación en el contenido de aminoácidos. Smith et al., Nat. Immunol. 4: 1247-53 (2003), cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria por referencia, han identificado 13 aminoácidos conservados en la flagelina que son parte de la estructura conservada reconocida por TLR5. Los 13 aminoácidos conservados de la flagelina que pueden ser importantes para la actividad de TLR5 se muestran en la Fig. 5.

Se han preparado numerosos mutantes delecionales de flagelina que retienen al menos parte de la actividad estimuladora de TLR5. La flagelina puede ser uno de dichos mutantes delecionales y puede ser un mutante delecional descrito en los Ejemplos de la presente memoria. La flagelina puede comprender una secuencia traducida del número de registro GenBank D13689 que carece de los aminoácidos 185-306 ó 444-492 o del número de registro GenBank M84973 que carece de los aminoácidos 179-415 o una variante de éstos.

La flagelina puede comprender inserciones de transposones y cambios en el dominio variable D3. El dominio D3 puede sustituirse en parte, o completamente, con una bisagra o polipéptido conector que permite que los dominios D1 y D2 se plieguen apropiadamente de manera que la variante estimula la actividad de TLR5. Los elementos bisagra de la variante pueden encontrarse en la proteína MukB de *E. coli* y pueden tener una secuencia como se muestra en SEQ ID NOS: 3 y 4, o una variante de éstas.

La flagelina como se ha descrito anteriormente puede comprender además una secuencia líder. La flagelina que comprende además una secuencia líder puede ser CBLB502S.

4. Agente

Esta invención también se refiere a un agente que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un TLR y agonista de TLR. El agente puede administrar el TLR separadamente del agonista de TLR. El agente puede ser un vector. El vector puede comprender un primer ácido nucleico que codifica el TLR y un segundo ácido nucleico que comprende el agonista de TLR. El vector puede ser capaz de transducir células de mamífero. El vector puede ser capaz de la expresión bi-cistónica del TLR y/o agonista de TLR usando promotores fuertes. El vector puede comprender sólo un gen que codifica el TLR, que puede estar controlado por un promotor fuerte. El vector puede administrarse a una célula de mamífero por un sistema de vector relacionado con virus o liposoma. El sistema de vector de virus puede ser un adenovirus o un citomegalovirus.

El agente puede ser un liposoma que alberga el vector. El liposoma puede ser capaz de transducir células de mamífero y administrar el vector para la expresión.

El agente puede ser una formulación de fármaco que induce simultáneamente la expresión y activa el TLR, exponiendo de esta manera las células tumorales o infectadas al sistema inmune del huésped imitando la situación de una penetración masiva a través de la pared intestinal. El agente puede ser una formulación de fármaco que expresa el TLR en combinación con el agonista de TLR y puede administrarse sistemáticamente en disolución para administración tal como intramuscularmente. El agente puede ser una formulación de fármaco que expresa el TLR en combinación con el agonista de TLR, que puede expresarse a partir del mismo vector, tal como un sistema de vector adenoviral o de citomegalovirus. El agente puede ser una formulación de fármaco que expresa el TLR en combinación con el agonista de TLR expresado en la forma de una nano-partícula, que puede portar un agonista funcional a la superficie celular de una célula de mamífero.

El agente puede ser un agente farmacéutico que comprende la formulación de fármaco descrita anteriormente, que puede producirse usando métodos muy conocidos en la técnica. El agente también puede comprender un coagente.

El vector puede comprender un primer ácido nucleico que codifica TLR5 y un segundo ácido nucleico que comprende flagelina. El vector puede ser capaz de expresar TLR5 y/o flagelina usando un promotor fuerte. El vector de expresión puede comprender además una secuencia líder clonada antes del extremo 5' del gen que codifica el TLR o TLR5 y/o flagelina. El vector de expresión puede ser un sistema de vector basado en pCD515. El vector de expresión puede ser pCD515-CMV-hTLRS-EF1-502 como se describe en la Figura 1A. El vector de expresión puede ser pCD515-CMV-hTLR5 como se describe en la Figura 1B. El vector de expresión puede ser pCD515-CMV-Sseap-502 como se describe en la Figura 1C.

El agente puede ser una formulación de fármaco que induce simultáneamente la expresión y activa el TLR, exponiendo de esta manera las células tumorales o infectadas al sistema inmune del huésped imitando la situación de una penetración masiva a través de la pared intestinal. La formulación de fármaco puede estar en la forma de un sistema de expresión viral que alberga el vector. La formulación de fármaco puede ser un adenovirus que expresa TLR5 humano funcional en combinación con:

el agonista de TLR, administrado sistemáticamente en disolución para administración, tal como intramuscularmente;

el agonista de TLR, expresado a partir del mismo vector adenoviral que el TLR; o

el agonista de TLR, expresado en la forma de nano-partículas que portan el agonista de TLR funcional, tal como flagelina, que puede derivar de CBLB502, en su superficie. La nano-partícula puede estar basada en un bacteriófago T7, o formarse completamente para retener su actividad biológica. La nano-formulación puede proporcionar una activación de informador en respuesta a NF- κ B dependiente de la dosis y puede resultar en la internalización celular por endocitosis para la estrategia de inmunización eficaz (Mobian AP-A).

a. Administración

La administración de los agentes usando el método descrito en la presente memoria puede ser oralmente, parenteralmente, sublingualmente, transdérmicamente, rectalmente, transmucosalmente, tópicamente, mediante inhalación, mediante administración bucal, o combinaciones de éstas. La administración parenteral incluye, pero no está limitada a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal, e intraarticular. Para uso veterinario, el agente puede administrarse como una formulación conveniente según la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la ruta de administración que es la más apropiada para un animal particular. Los agentes pueden administrarse a un paciente humano, gato, perro, animal grande o un ave.

El agente puede administrarse simultáneamente o metronómicamente con otros tratamientos. El término "simultáneo" o "simultáneamente" tal y como se usa en la presente memoria, significa que el agente y otro tratamiento se administran en 48 horas, preferiblemente 24 horas, más preferiblemente 12 horas, aún más preferiblemente 6 horas y lo más preferiblemente 3 horas o menos, uno respecto al otro. El término "metronómicamente" tal y como se usa en la presente memoria significa la administración del agente en momentos diferentes del otro tratamiento y a una determinada frecuencia respecto a la administración repetida.

El agente puede administrarse en cualquier punto antes de otro tratamiento incluyendo aproximadamente 120 hr, 118 hr, 116 hr, 114 hr, 112 hr, 110 hr, 108 hr, 106 hr, 104 hr, 102 hr, 100 hr, 98 hr, 96 hr, 94 hr, 92 hr, 90 hr, 88 hr, 86 hr, 84 hr, 82 hr, 80 hr, 78 hr, 76 hr, 74 hr, 72 hr, 70 hr, 68 hr, 66 hr, 64 hr, 62 hr, 60 hr, 58 hr, 56 hr, 54 hr, 52 hr, 50 hr, 48 hr, 46 hr, 44 hr, 42 hr, 40 hr, 38 hr, 36 hr, 34 hr, 32 hr, 30 hr, 28 hr, 26 hr, 24 hr, 22 hr, 20 hr, 18 hr, 16 hr, 14 hr, 12 hr, 10 hr, 8 hr, 6 hr, 4 hr, 3 hr, 2 hr, 1 hr, 55 mins., 50 mins., 45 mins., 40 mins., 35 mins., 30 mins., 25 mins., 20 mins., 15 mins., 10 mins., 9 mins., 8 mins., 7 mins., 6 mins., 5 mins., 4 mins., 3 mins., 2 mins. y 1 min. El agente puede administrarse en cualquier punto antes de un segundo tratamiento del agente incluyendo aproximadamente 120 hr, 118 hr, 116 hr, 114 hr, 112 hr, 110 hr, 108 hr, 106 hr, 104 hr, 102 hr, 100 hr, 98 hr, 96 hr, 94 hr, 92 hr, 90 hr, 88 hr, 86 hr, 84 hr, 82 hr, 80 hr, 78 hr, 76 hr, 74 hr, 72 hr, 70 hr, 68 hr, 66 hr, 64 hr, 62 hr, 60 hr, 58 hr, 56 hr, 54 hr, 52 hr, 50 hr, 48 hr, 46 hr, 44 hr, 42 hr, 40 hr, 38 hr, 36 hr, 34 hr, 32 hr, 30 hr, 28 hr, 26 hr, 24 hr,

22 hr, 20 hr, 18 hr, 16 hr, 14 hr, 12 hr, 10 hr, 8 hr, 6 hr, 4 hr, 3 hr, 2 hr, 1 hr, 55 mins., 50 mins., 45 mins., 40 mins., 35 mins., 30 mins., 25 mins., 20 mins., 15 mins., 10 mins., 9 mins., 8 mins., 7 mins., 6 mins., 5 mins., 4 mins., 3 mins., 2 mins. y 1 min.

El agente puede administrarse en cualquier punto después de otro tratamiento incluyendo aproximadamente 1 min, 2 mins., 3 mins., 4 mins., 5 mins., 6 mins., 7 mins., 8 mins., 9 mins., 10 mins., 15 mins., 20 mins., 25 mins., 30 mins., 35 mins., 40 mins., 45 mins., 50 mins., 55 mins., 1 hr, 2 hr, 3 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 10 hr, 12 hr, 14 hr, 16 hr, 18 hr, 20 hr, 22 hr, 24 hr, 26 hr, 28 hr, 30 hr, 32 hr, 34 hr, 36 hr, 38 hr, 40 hr, 42 hr, 44 hr, 46 hr, 48 hr, 50 hr, 52 hr, 54 hr, 56 hr, 58 hr, 60 hr, 62 hr, 64 hr, 66 hr, 68 hr, 70 hr, 72 hr, 74 hr, 76 hr, 78 hr, 80 hr, 82 hr, 84 hr, 86 hr, 88 hr, 90 hr, 92 hr, 94 hr, 96 hr, 98 hr, 100 hr, 102 hr, 104 hr, 106 hr, 108 hr, 110 hr, 112 hr, 114 hr, 116 hr, 118 hr y 120 hr. El agente puede administrarse en cualquier punto después de un segundo tratamiento del agente incluyendo aproximadamente 120 hr, 118 hr, 116 hr, 114 hr, 112 hr, 110 hr, 108 hr, 106 hr, 104 hr, 102 hr, 100 hr, 98 hr, 96 hr, 94 hr, 92 hr, 90 hr, 88 hr, 86 hr, 84 hr, 82 hr, 80 hr, 78 hr, 76 hr, 74 hr, 72 hr, 70 hr, 68 hr, 66 hr, 64 hr, 62 hr, 60 hr, 58 hr, 56 hr, 54 hr, 52 hr, 50 hr, 48 hr, 46 hr, 44 hr, 42 hr, 40 hr, 38 hr, 36 hr, 34 hr, 32 hr, 30 hr, 28 hr, 26 hr, 24 hr, 22 hr, 20 hr, 18 hr, 16 hr, 14 hr, 12 hr, 10 hr, 8 hr, 6 hr, 4 hr, 3 hr, 2 hr, 1 hr, 55 mins., 50 mins., 45 mins., 40 mins., 35 mins., 30 mins., 25 mins., 20 mins., 15 mins., 10 mins., 9 mins., 8 mins., 7 mins., 6 mins., 5 mins., 4 mins., 3 mins., 2 mins. y 1 min.

b. Formulación

El método puede comprender administrar el agente. Los agentes proporcionados en la presente memoria pueden estar en la forma de comprimidos o pastillas formuladas de una manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que pueden ser agentes de aglutinamiento, relleno, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no están limitados a, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Los materiales de relleno pueden ser lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no están limitados a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes pueden ser almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes pueden ser lauril sulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos muy conocidos en la técnica.

Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden ser formulaciones líquidas tales como suspensiones acuosas o grasas, disoluciones, emulsiones jarabes y elixires. Los agentes también pueden formularse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. El agente de suspensión puede ser jarabe de sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetil celulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes pueden ser lecitina, monooleato de sorbitán y goma arábiga. Los vehículos no acuosos pueden ser aceites comestibles, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres grasos, propilenglicol y alcohol etílico. Los conservantes pueden ser p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden formularse como supositorios, que pueden contener bases de supositorio tales como manteca de caco o glicéridos. Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden formularse para inhalación, que puede ser en una forma tal como una disolución, suspensión o emulsión que puede administrarse como un polvo seco o en la forma de un aerosol usado un propelente, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden formularse como formulaciones transdérmicas que comprenden vehículos acuosos o no acuosos tales como cremas, pomadas, lociones, pastas, escayola medicada, parche o membrana.

Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden formularse para administración parenteral tal como por inyección, inyección intratumoral o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en la forma de suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos y pueden contener agentes de formulación incluyendo, pero no limitado a, agentes de suspensión, estabilizantes y dispersantes. El agente también puede proporcionarse en una forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado incluyendo, pero no limitado a, agua estéril sin pirógenos.

Los agentes proporcionados en la presente memoria también pueden formularse como una preparación de liberación sostenida, que puede administrarse por implante o por inyección intramuscular. Los agentes pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (como una emulsión en un aceite aceptable, por ejemplo), resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles (como una sal poco soluble, por ejemplo).

c. Dosificación

El método puede comprender administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente a un paciente que lo necesita. La cantidad terapéuticamente eficaz requerida para uso en terapia varía con la naturaleza de la afección que se está tratando, la cantidad de tiempo deseada para activar la actividad de TLR y la edad/condición del paciente. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento de seres humanos adultos están

típicamente en el intervalo de 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg por día. La dosis puede ser aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg por día. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una única dosis o como dosis múltiples administradas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más sub-dosis por día. Las dosis múltiples pueden desearse o requerirse.

- 5 La dosificación puede ser a cualquier dosificación tal como aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, 425 mg/kg, 450 mg/kg, 475 mg/kg, 500 mg/kg, 525 mg/kg, 550 mg/kg, 575 mg/kg, 600 mg/kg, 625 mg/kg, 650 mg/kg, 675 mg/kg, 700 mg/kg, 725 mg/kg, 750 mg/kg, 775 mg/kg, 800 mg/kg, 825 mg/kg, 850 mg/kg, 875 mg/kg, 900 mg/kg, 925 mg/kg, 950 mg/kg, 975 mg/kg ó 1 mg/kg.

5. Método para tratar cáncer

- En la presente memoria se proporciona un vector y agente para uso en el tratamiento del cáncer mediante la administración del agente a un mamífero que lo necesita. También pueden usarse para inmunoterapia frente al cáncer mediante la conversión de las células tumorales a un estado en el que responden al agonista de TLR con la estimulación intratumoral dirigida de TLR, centrando de esta manera una respuesta inmune en el tumor. Los tumores primarios pueden tratarse antes de la eliminación quirúrgica con el fin de reducir el riesgo del desarrollo de metástasis, así como para tratar otros nódulos tumorales. El método puede comprender la inyección intratumoral. El agente puede inyectarse en un tumor primario antes de la eliminación quirúrgica con el fin de reducir el riesgo del desarrollo de metástasis, así como para tratar otros nódulos tumorales. Puede tratarse cualquier tumor que es accesible para una inyección intratumoral de adenovirus.

- Puede tratarse una variedad de cánceres según esta invención, incluyendo carcinoma, vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, recto, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), esófago, estómago, vesícula biliar, cuello uterino, tiroides y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos del linaje linfocítico incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkins, linfoma no de Hodgkins, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mielóide incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático incluyendo fibrosarcoma, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoactantoma, seminoma, cáncer de tiroides folicular, teratocarcinoma y cánceres del tracto gastrointestinal o la cavidad abdominopélvica.

- El método puede combinarse con otros métodos para tratar cáncer, incluyendo el uso de un inmunoestimulador, citoquina o quimioterapéutico. El inmunoestimulador puede ser una hormona de crecimiento, prolactina o vitamina D.

6. Tratamiento de células infectadas

- En la presente memoria se proporciona un vector y agente para uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa mediante la administración simultánea de células transducidas por el agente. Pueden usarse para tratar una infección viral, bacteriana, de parásitos protozoarios o fúngica. Puede tratarse con éste cualquier enfermedad infecciosa mediante el uso de una inyección intracelular que resulta en la activación autocrina de la señalización de TLR de las células infectadas con un efecto sistémico mínimo y permitiendo de esta manera atraer una respuesta inmune innata específica a las células infectadas. El tratamiento puede combinarse con otras terapias para tratar infecciones virales, bacterianas, de parásitos protozoarios o fúngicas.

- El tratamiento puede comprender administrar el agente. El tratamiento puede comprender la administración de una vacuna que comprende el agente y puede usarse en combinación con cualquier otra vacunación, que puede comprender una construcción que expresa un antígeno elegido.

Ejemplo 1

Síntesis de vector TLR5/flagelina de expresión bi-cistrónica y tratamiento de células tumorales

- Se crearon construcciones de vector para expresar el receptor semejante a Toll 5 (TLR-5) y flagelina CBLB502. El vector pCD515 se usó como un núcleo para estas construcciones. La secuencia de ADNc de TLR-5 humano y el ADN que codifica el agonista del receptor semejante a toll CBLB502 se fusionaron individualmente con un péptido líder derivado de fosfatasa alcalina lo que permite el direccionamiento de la proteína expresada a través del retículo endoplásmico (ER) y Golgi hacia la secreción extracelular.

- La construcción de vector pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s expresó la forma secretada de flagelina CBLB502 (CBLB502S) y el receptor semejante a toll 5 (TLR5) en la superficie celular. Este vector adenoviral requirió la modificación de CBLB502 para conseguir su síntesis y secreción eficaz por las células de mamíferos. La

construcción de adenovirus comprende la secuencia de ácido nucleico líder (Atgctgctgctgctgctgctggcctgaggctacagctctccctgggc) derivada de la fosfatasa alcalina y se clonó antes del extremo 5' del gen de la flagelina de Salmonella truncado (fliC) (véase Burdelya et al., Science 320: 226-230 (2008)) para codificar una forma secretable de flagelina (es decir, CBLB502S). Se clonó un promotor EF1 (factor de elongación la) antes del extremo 5' de este casete que codifica CBLB502S. El gen TLR5 se derivó de seres humanos y tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 9. Se clonó un promotor de CMV antes del extremo 5' del gen TLR5. Esta construcción co-expresa TLR5 y CBLB502S. Esta construcción se muestra en la Figura 1A.

El vector de expresión pCD515-CMV-hTLR5 se construyó para expresar la forma de TLR-5 humano (véase la Figura 9). La construcción de adenovirus comprende un promotor de CMV fuerte clonado antes del extremo 5' del casete de hTLR5. Esta construcción se muestra en la Figura 1B.

El vector de expresión pCD515-CMV-Sseap-502 se construyó para expresar la flagelina secretada CBLB502 y el semejante a toll. La construcción de adenovirus comprende un promotor de CMV fuerte clonado antes del extremo 5' de la secuencia líder SEAP 502 gen de flagelina (fliC). Esta construcción se muestra en la Figura 1C. [Se necesita información de clonación]

Ejemplo 2

Síntesis de vector TLR5/flagelina de expresión bi-cistrónica y tratamiento de células tumorales

Se transdujeron dos líneas celulares informadoras de mamíferos, ambas expresando GFP que responde a NF- κ B y que se diferencian en su estado de TLR5, con las construcciones de vector pCD515, pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s, pCD515-CMV-hTLR5-502, pCD515-CMV-hTLR5 y pCD515-CMV-Sseap-502 (véase la Tabla 3 a continuación).

Tabla 3. Actividad de las construcciones adenovirales como activadores de la señalización de TLR5

| Tratamiento | Línea informadora 293-sin actividad | Línea informadora 293-TLR |
|--|-------------------------------------|---------------------------|
| CBLB502 | - | + |
| Ad5 (control) (pCD515) | - | - |
| Ad5 (TLR5) (pCD515-CMV-hTLRS) | - | - |
| Ad5 (TLR5) + CBLB502 (pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502) | + | + |
| Ad5 (CBLB502S) (pCD515-CMV-Sseap-502) | - | + |
| Ad5 (TLR5) (pCD515-CMV-hTLR5) + Ad5 (CBLB502S) (pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s) | + | + |
| Ad5 (CBLB502S + TLR5) (pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s) | + | + |

El vector que co-expresa TLR5 y el agonista de TLR5 CBLB502S fue suficiente para inducir la expresión del informador NF- κ B en células 293-sin actividad que no expresan ninguno de los TLR conocidos y que no pueden activarse por el agonista de TLR5 solo. Este experimento demuestra que TLR5 y la flagelina CBLB502S pueden funcionar en trans o en cis para activar la señalización de TLR5.

Ejemplo 3

Para ensayar los efectos antitumorales de adenovirus bi-cistrónicos que tienen (pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s), se inyectaron 10 ml de la suspensión adenoviral (1.102-1.011 UI/ml) en uno de dos tumores singénicos que crecen s.c. en ratones Balb/c que se originan de células de carcinoma de colon de ratón CT26 cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 3-5 mm y el tamaño tumoral se monitorizó hasta que los tumores control no inyectados alcanzaron el límite de tamaño que requiere la terminación del experimento. Se inyectó a los ratones control (de nuevo, un tumor de dos por ratón) vector adenoviral que expresa la proteína roja fluorescente (RFP). Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 4. La ausencia casi completa de crecimiento de los tumores a los que se inyectó (pCD515-CMV-hTLR5-EF1-502s) estuvo acompañada de un crecimiento reducido del tumor no inyectado en el mismo animal comparado con los tumores en los animales control a los que se inyectó adenovirus que expresa RFP. Este resultado indica (i) efecto potente en cis y (ii) visible en trans de pCD515-CMV-hTLR5-EF1-

502s indicativo de reclutamiento de respuesta inmune tanto innata (efecto cis) como adaptativa (efecto trans). Ninguno de los demás virus control listados en la Tabla 1 (es decir, AD5 (control) y Ad5 (TLR5)) inyectado solo tuvo efectos supresores del crecimiento en los tumores.

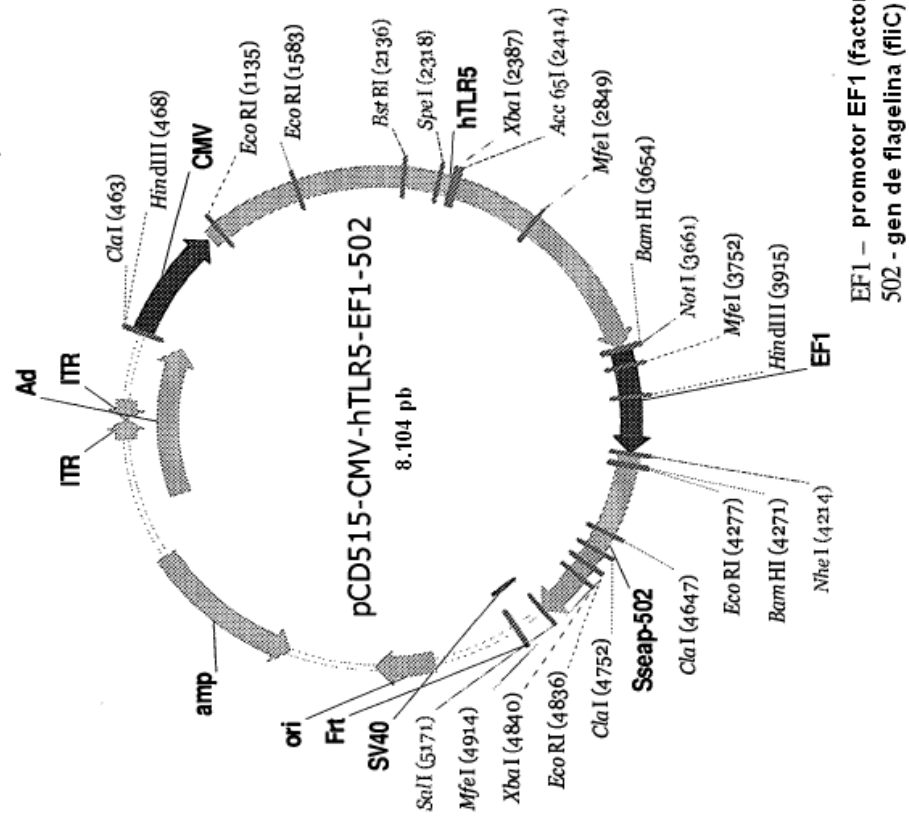
- 5 Así, la expresión ectópica forzosa de TLR5 hace que tipos de células tumorales, que originariamente eran deficientes en TLR5, respondan altamente a la estimulación con TLR5 lo que resulta en la ruptura de la inmunotolerancia tumoral, atracción potente de la respuesta inmune innata que estimula el desarrollo eficaz de la respuesta inmune adaptativa con un efecto antitumoral general posterior.

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende un primer y segundo ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico codifica un receptor semejante a toll y el segundo ácido nucleico codifica un agonista del receptor semejante a toll seleccionado del grupo que consiste en proteínas de choque térmico, alta movilidad del grupo de caja 1, fibrinógeno, fibronectina, proteína de fusión RSV, proteínas de la cubierta del virus de tumor mamario de ratón, flagelina y profilina.
5
2. El vector de la reivindicación 1, en el que el agonista del receptor semejante a toll es flagelina.
3. El vector de la reivindicación 1, en el que el vector es un vector de expresión.
4. El vector de la reivindicación 3, en el que el vector es un vector de expresión de mamíferos.
5. El vector de la reivindicación 3, en el que el vector se expresa a partir de un adenovirus, un lentivirus o un liposoma.
10
6. El vector de la reivindicación 1, en el que el primer ácido nucleico es una forma secretada de un receptor semejante a toll.
7. El vector de la reivindicación 2, en el que la flagelina es una forma secretada de flagelina.
8. El vector de la reivindicación 1, en el que el receptor semejante a toll es TLR-5.
9. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como un medicamento.
15
10. Un agente para uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero que lo necesita, en el que el agente comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. El agente para uso de la reivindicación 10, en el que el cáncer es un tumor.
12. El agente para uso de la reivindicación 11, en el que el tumor deriva del grupo que consiste en próstata, mama, colon, esófago, estómago, pulmón, pancreático, renal, tiroides, ovarios, garganta, cuello uterino, sarcomas, melenomas, leucemias y linfomas.
20
13. Un agente para uso en el tratamiento de una infección en un mamífero que lo necesita, en el que el agente comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. El agente para uso de la reivindicación 13, en el que la infección es por un organismo seleccionado del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un parásito protozoario y un hongo.
25

FIGURA 1A

Mobilan = AD(TLR5+CBLB502S)



EF1 - promotor EF1 (factor de elongación lα).
502 - gen de flagelina (fliC)

FIGURA 1B

AD(TLR5)

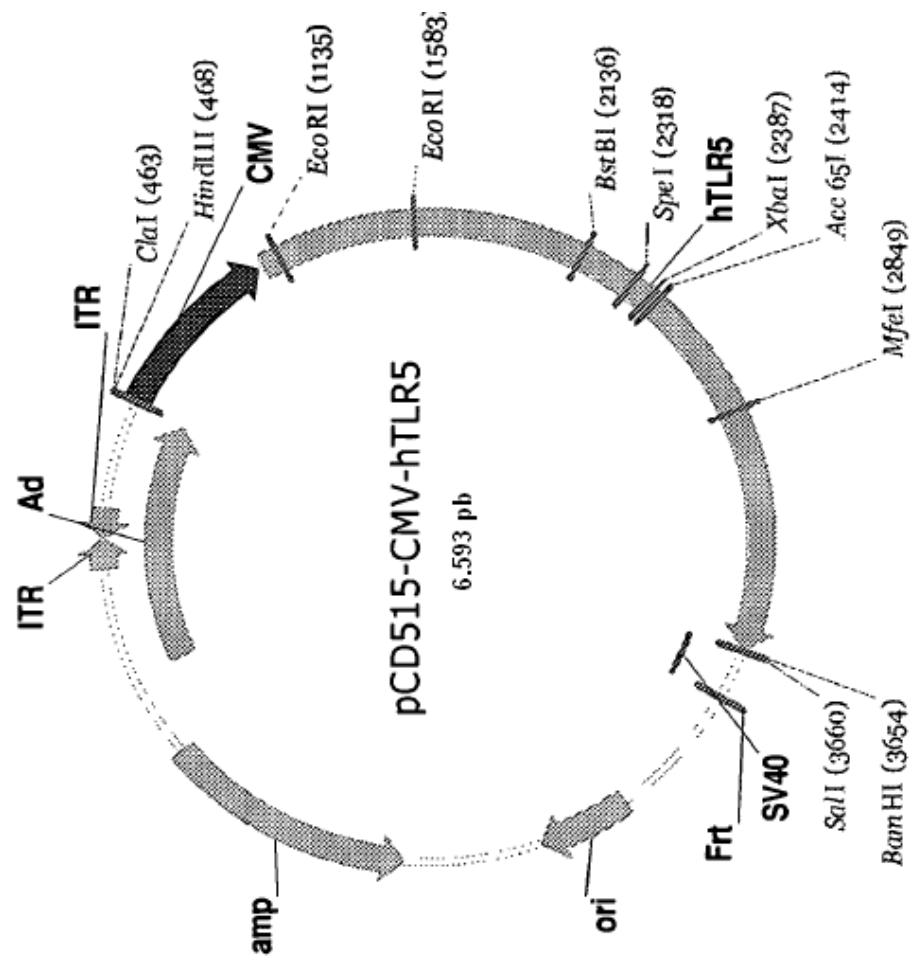
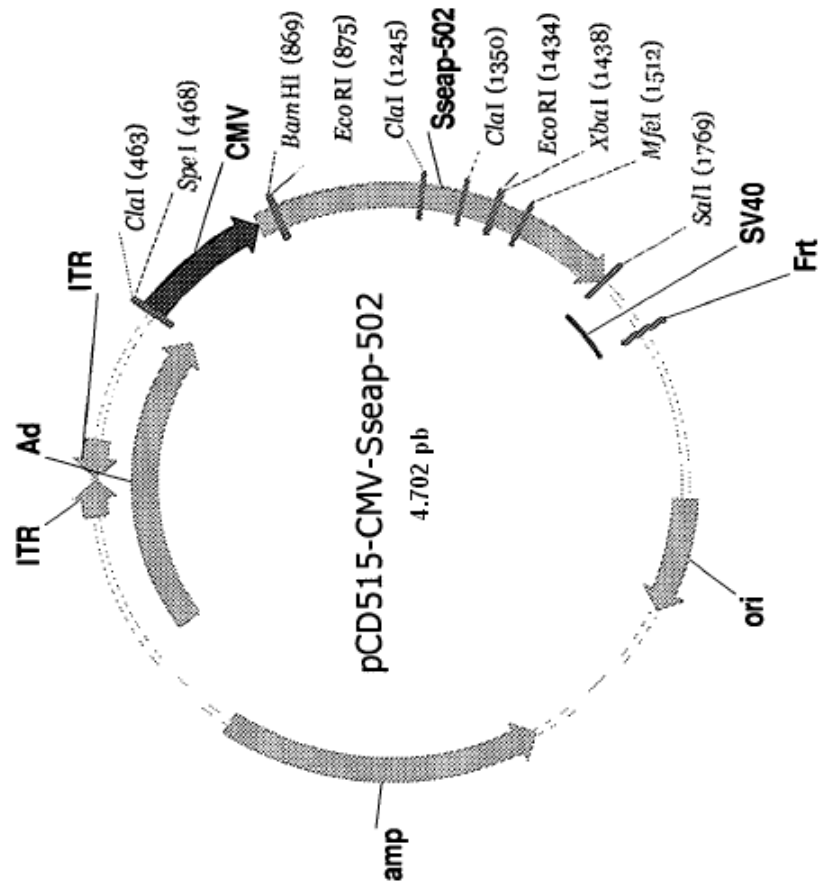


FIGURA 1C

AD(CBLB502S)



Sseap - Atgctgtgctgtgctgtgctgtggcctgaggtacagctctccctgggc - secuencia líder SEAP
502 - gen de flagelina (fliC)

FIGURA 2

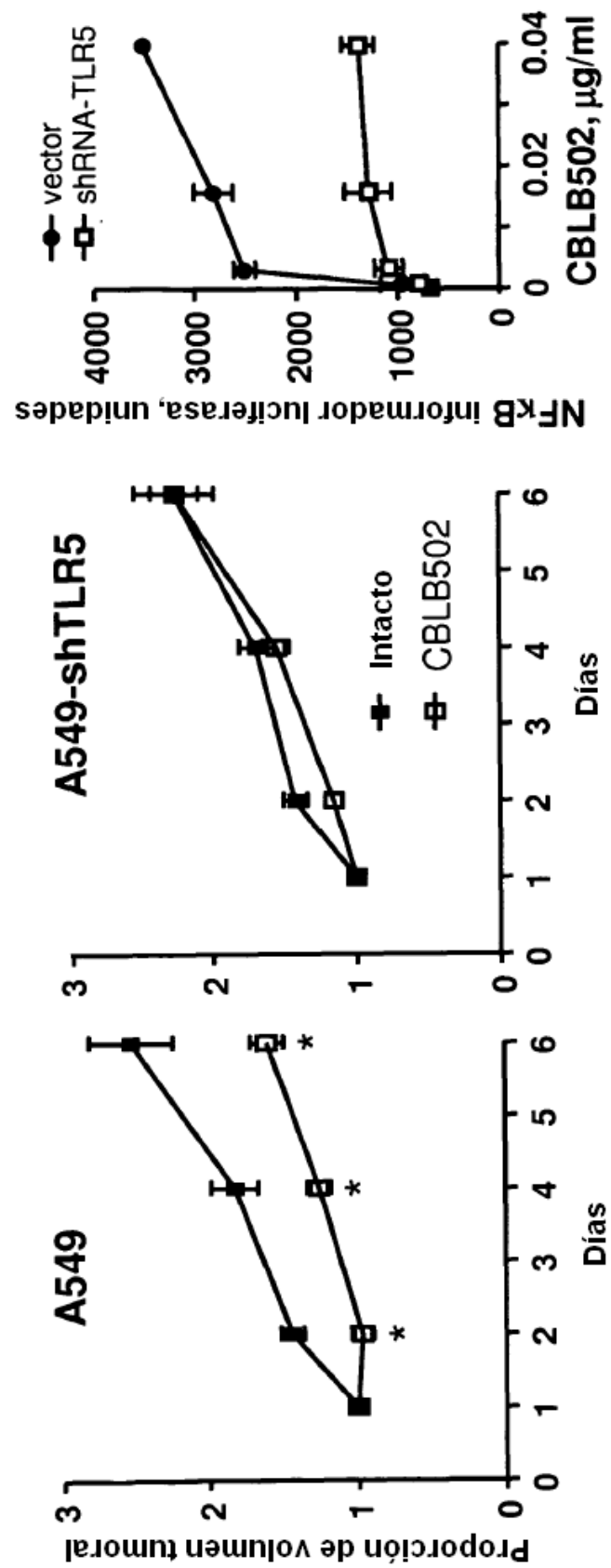


FIGURA 3

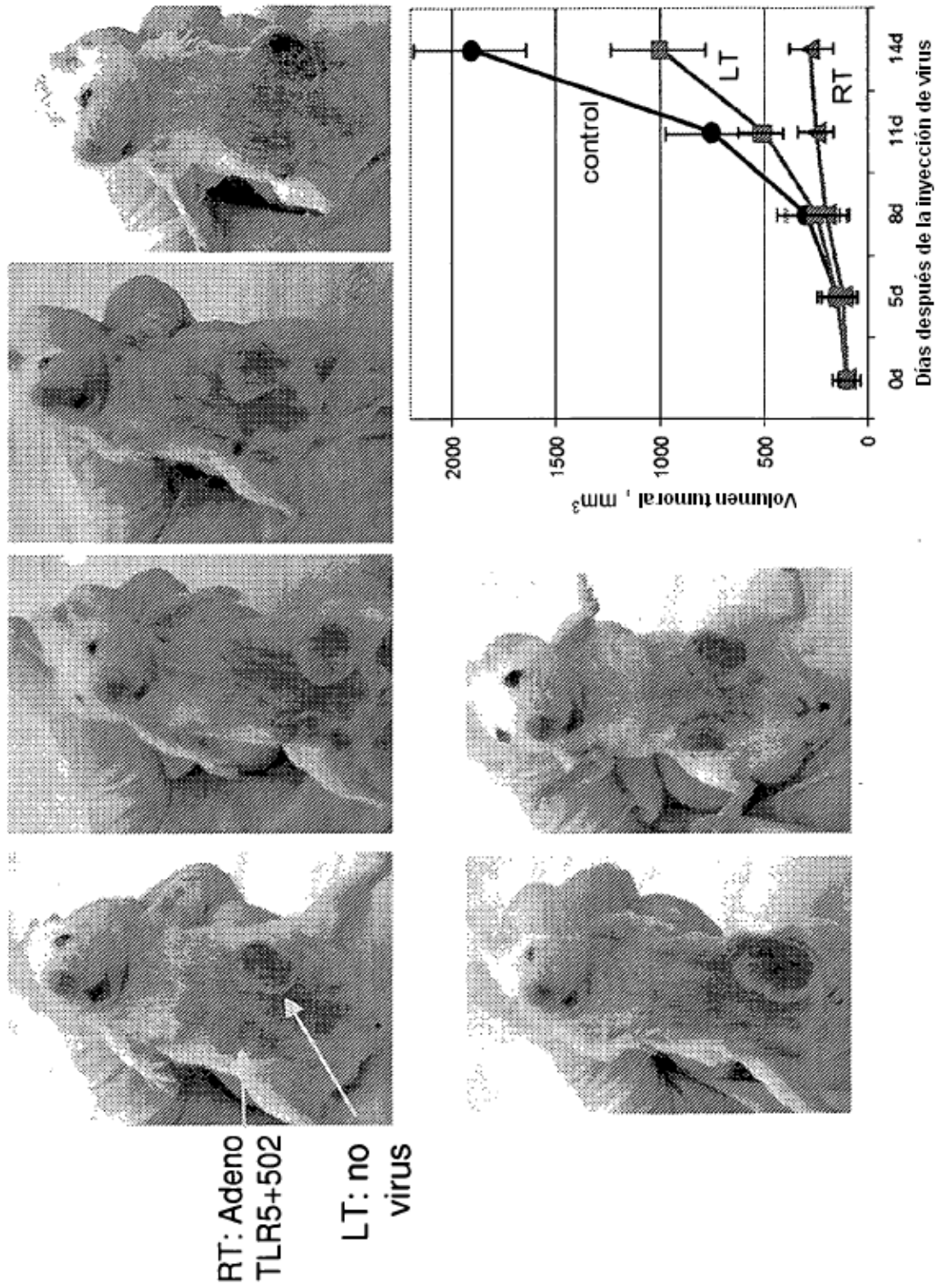


FIGURA 4

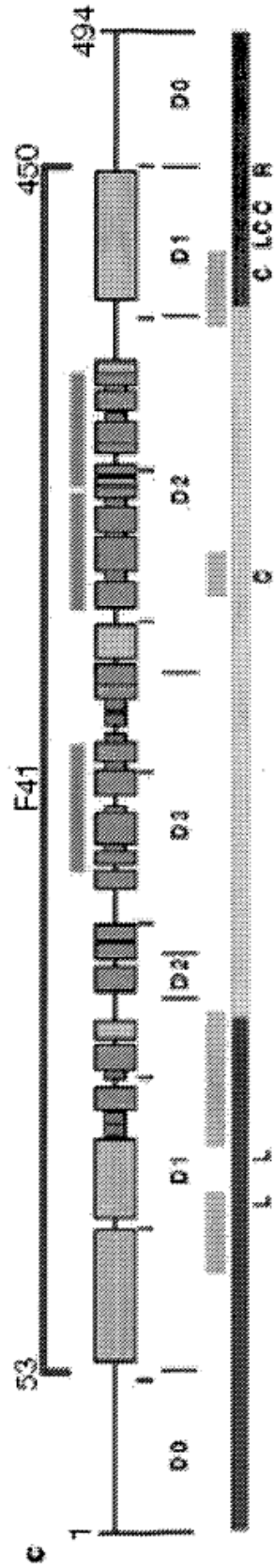


FIGURA 5

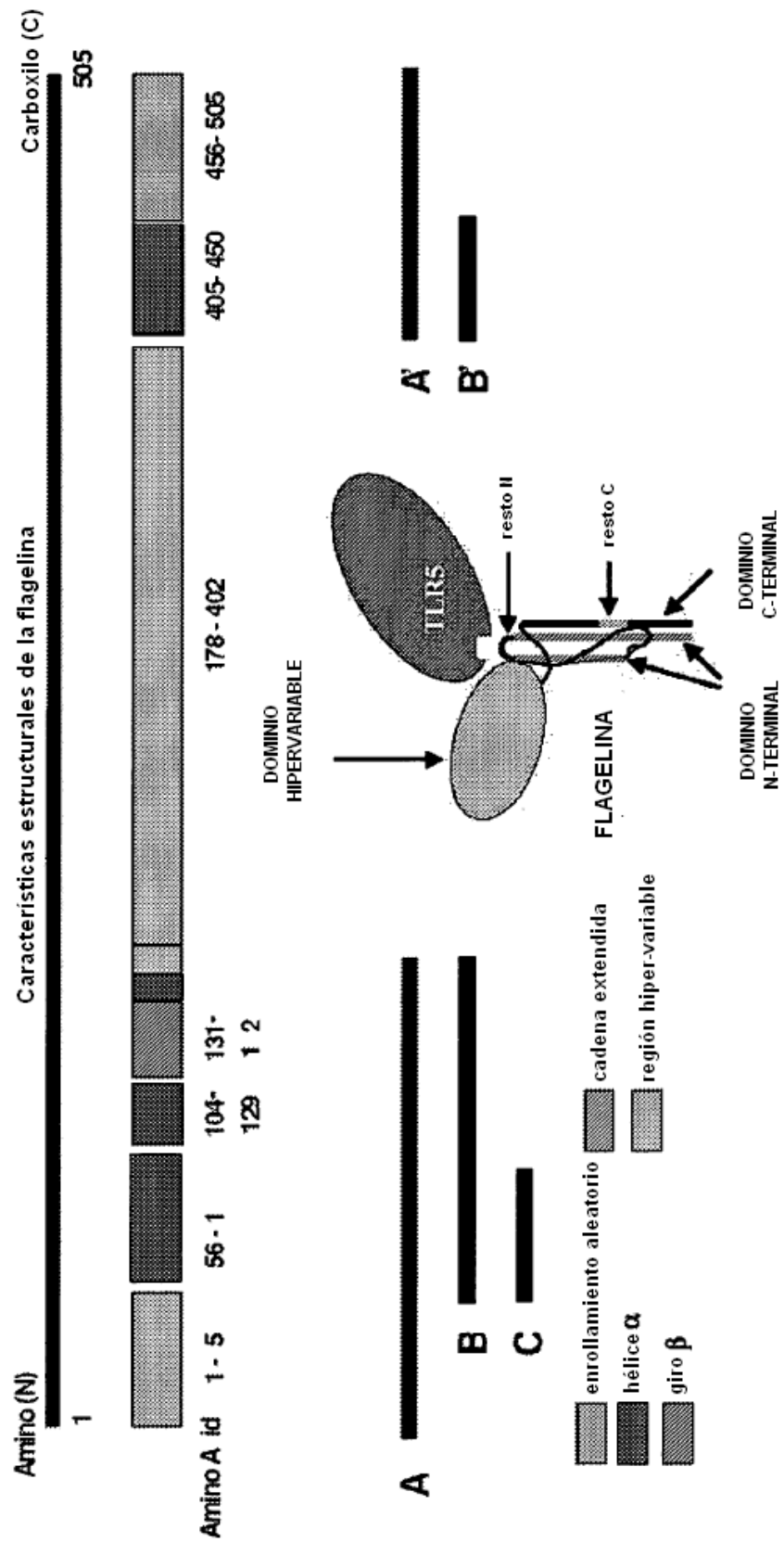


FIGURA 6

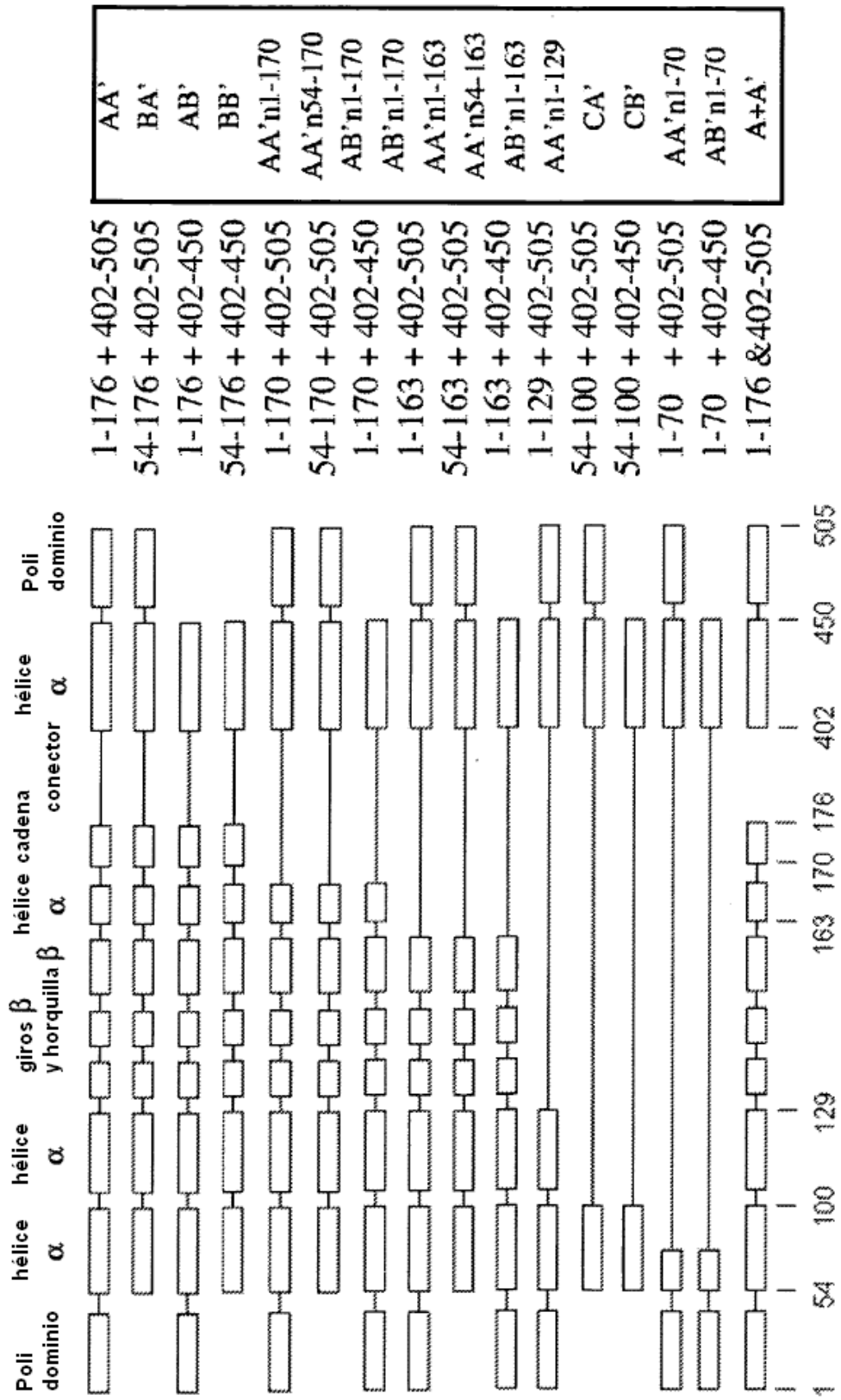


FIGURA 7

AA'

Secuencia de nucleótidos (990 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
 ATGGGTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
 AACAGCCTGTCGCTGTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCCTCAGTGAGTTCC
 GCTATTGAGCGTCTGTCCCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
 CAGGCGATTGCTAACCCTTCACTTCTAATATCAAAGGCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
 GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
 AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCGTTCAGGCCACTAACGGGACTAACCTCTGATTCC
 GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
 AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAGGACAACCAGATGAAAATCCAG
 GTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATTACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGC
 CTGGCCCTTGATGGGTTCAATGTTAATTCCTCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGAAAT
 CTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCCGCGAGCCAAGAAAAGTACCGCT
 AACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCGAGTTCGTCTCTCTG
 GGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTACGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAAT
 CTGAACCTCCGCGCGTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATG
 TCTAAAGCGCAGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCGGTT
 CCGCAAAACGTCCTCTCTTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (329 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMQMRDL YDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
 KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
 ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
 DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLOKIDVKSGLDGFNV
 NSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAARKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSL
 GAIQNRFDSAITNLGNTVTNLSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQOAGTS
 VLAQANQVPQNVLSLLR

AB'

Secuencia de nucleótidos (825 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
 ATGGGTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
 AACAGCCTGTCGCTGTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCCTCAGTGAGTTCC
 GCTATTGAGCGTCTGTCCCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
 CAGGCGATTGCTAACCCTTCACTTCTAATATCAAAGGCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
 GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
 AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCGTTCAGGCCACTAACGGGACTAACCTCTGATTCC
 GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
 AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAGGACAACCAGATGAAAATCCAG
 GTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATTACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGC
 CTGGCCCTTGATGGGTTCAATGTTAATTCCTCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGAAAT
 CTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCCGCGAGCCAAGAAAAGTACCGCT
 AACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCGAGTTCGTCTCTCTG
 GGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTACGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (274 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMQMRDL YDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
 KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
 ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
 DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLOKIDVKSGLDGFNV
 NSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAARKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSL
 GAIQNRFDSAITNL

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

BA'

Secuencia de nucleótidos (831 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAG
GACAACCAGATGAAATCCAGGTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATTACCATCGATCTG
CAAAAAATTGATGTGAAAAGCCTTGGCCTTGATGGGTTCAATGTTAAT**TCCCCGGGAATT**
TCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCC
GCAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTG
GACGCAGTTCTGTTCTTCTGCGGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTACGCCATTACCAAC
CTTGGAATACGGTAACCAATCTGAATCCGCGCGTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTAT
GCAACGGAAGTTTCTAATATGTCTAAAGCGCAGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTT
CTGGCCAGGCTAACAGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (276 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQQRLEEID
RVSNQTFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSGLDGFNVN
SPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDVAVRSSLG
AIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSV
LAQANQVPQNVLSLLR

BB'

Secuencia de nucleótidos (666 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAG
GACAACCAGATGAAATCCAGGTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATTACCATCGATCTG
CAAAAAATTGATGTGAAAAGCCTTGGCCTTGATGGGTTCAATGTTAAT**TCCCCGGGAATT**
TCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCC
GCAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTG
GACGCAGTTCTGTTCTTCTGCGGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTACGCCATTACCAAC
CTTTAG

Secuencia de proteína (221 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQQRLEEID
RVSNQTFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSGLDGFNVN
SPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDVAVRSSLG
AIQNRFDSAITNL

CA'

Secuencia de nucleótidos (603 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
TCCCCGGGAATT**TCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTACATTAATCAAT**
GAAGACGCTGCGCAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCA
TTGTCAAAAGTGGACGAGTTCGTTCTTCTGCGGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTCA

FIGURA 7. CONTINUACIÓN

GCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAACTCCGCGCTAGCCGTATCGAA
GATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATGTC TAAAGCGCAGATTCTGCAGCAGGCT
GGTACTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCGATTCCGCAAAACGTCTCTTTACTGCGT
TAG

Secuencia de proteína (200 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATSPGISGGGGGILD SMGTLINE DAA
AAKSTANPLASIDSALS KVD AVRSSLGAIQNRFD SAI TNLGNTVTNLNSAR
SRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

CB'

Secuencia de nucleótidos (438 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
TCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGAATTTAGACTCCATGGGTACATTAAATCAAT
GAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCA
TTGTCAAAAGTGGACGAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTCA
GCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (145 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATSPGISGGGGGILD SMGTLINE DAA
AAKSTANPLASIDSALS KVD AVRSSLGAIQNRFD SAI TNL

A

Secuencia de nucleótidos (639 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAAATACA
AACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCTCACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGTTCACTTCTAATATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGCTGTTCAGGCCACTAACGGGACTAACTCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTTGGAAGAAATCGATCGCGTTCT
AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCCGTGCTCAGGACAACCAGATGAAATCCAG
GTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGC
CTTGCCCTTGATGGGTTCAAIGTTAATTTCCCGGGATGA

Secuencia de proteína (212 AA), los últimos tres aminoácidos

derivan de cebador y policonector pRSETb:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQRL EEI
DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNV
NSPG

B

Secuencia de nucleótidos (480 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGT
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTTGCTCAG
GACAACAGATGAAATCCAGGTGGTGTACGATGGTGAACCAATTACCATCGATCTG
CAAAAAATTGATGTGAAAAGCCTTGGCCTTGATGGGTCAATGTAAAT**TCCCCGGGATGA**

Secuencia de proteína (159 AA), los últimos tres aminoácidos derivan de cebador y policonector pRSETb:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQVRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQRLIID
RVSNTQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSGLDGFNVN
SPG

C

Secuencia de nucleótidos (252 pb):

ATGCGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGT
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTCCAGGCCACT
TCCCCGGGATGA

Secuencia de proteína (83 AA), los últimos tres aminoácidos derivan de cebador y policonector pRSETb:

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQVRVRELSVQAT**SPG**

GST-A'

Secuencia de nucleótidos (1.038 pb), GST resaltado:

ATGTCCTTATCTAGGTTATTTGGAATTAAGGGCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTT
TTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTTGATGAGCGCGAIGAAGGTGATAAA
TGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATTTGAT
GGTGTATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAAC
ATGTTGGGTGGTTGTCCAAAGACCGTGCAGAGATTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTGT
GATATTAGATACGGTGTTCGAGAAATGATATAGTAAAGACTTTGAAGCTCTCAAAGTT
GATTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTTATGTCATAAA
ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCTGACTTCAATGTTGATGACGCTCTGAT
GTGTTTTTATACATGGACCCAAATGTGCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTAAA
AAACGTTATTGAAGCTATCCCAACAATGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCA
TGGCGTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTGGTGGTGGCGACCATCCICCAAAATCGGAT
CTGGTTCCCGTGGATCCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTTAGACTCCATG
GGTACATTAAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCT
TCAATTGATTCTGCATTGTCAAAGTGGACGCAGTTCGTTCTTCTTGGGGGCAATTCAA
AACCGTTTTGATTACGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGAACCAATCTGAACCTCCGCG
CGTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATGCTAAAGCGCAG
ATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACAGGTTCCGCAAAACGTC
CTCTCTTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (345 AA):

MSPTLGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLVERDEGDKWRNKKFELGLEF
PNLPYYIDGDVKLTQSMALIRYLADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAFLDIRY
GVSRIAYSQDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDPFMY
DALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEATPOIDKYLKSSKYIAWPLOGWQA
TFGGGDHPPKSDLVPRG**SPGI**SGGGGGIILDSMGTLINEDAAAANKSTANPLA
SIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDASITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATE
VSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

GST-B'

Secuencia de nucleótidos (873 pb), GST resaltado:

ATGTCGCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCCTGGTGCACGCCACTCGACTTCTT
TTGGAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAA
TGGCGAAAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTATTATATTGAT
GGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATAGGTTATATAGCTGACAAGCACAAAC
ATGTTGGGTGGTTTGCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTG
GATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGT
GATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTITATGTCATAAA
ACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCAIGTTGTATGACGCCTTGTAT
TTGTTTATTATACATGGACCCAAATGTGCCGTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAA
AAACGTAATTGAAGCTATCCCAAAATTTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATAGCA
TGGCCTTTGCACGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCTCCAAAATCGGAT
CTGGTTCCGCGTGGATCCCGGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTTAGACTCCATG
GGTACATTAAATCAATGAAGACGCTGCCGAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCT
TCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCGAGTTCTGTTCTCTCTGGGGGCAATTCAA
AACCGTTTTGATTACGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (290 AA):

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLRYERDEGDKWRNKKFELGLEF
PNLPYYIDGDKVLTSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDIRY
GVSRIAYSKDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLY
DALDVVLYMDPMLDAFPLKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIAWFLQGWQA
TFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAANKSTANPLA
SIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDASITNL

AA'n1-170

Secuencia de nucleótidos (972 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAA
ATGGGTTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTGCGTGTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCTCACTGAGTTCC
GCATTAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTCAGGCCACTAACGGGACTAATCTGATTC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTTGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAGGACAACCAGATGAAATCCAG
GTGGTGTCTAACGATGGTGAACCAATTACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGC
CTTGGCCTTATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTTAGACTCCATGGGTACA
TTAATCAATGAAGACGCTGCCGAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATT
GATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGAGTTCTGTTCTCTCTGGGGGCAATTTCAAACCGT
TTTGATTAGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAATCCGCGCGTAGC
CGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATGCTAAAGCGCAGATTCTG
CAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCT
TACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (323 AA):

MRGSHHHHHGMSMTGGQMGRLDYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSADDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQVRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
DRVSNQTFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSGLIPGIS
GGGGGILDSMGTLINEDAAAANKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNR
FDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQAN
QVPQNVLSLLR

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

AA'n1-163

Secuencia de nucleótidos (951 pb):

ATGCGGGGTTCATCA TCA TCATCA TCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGA TAAGGA TCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCTGCTGCTGTTGACCCAGAA TAACCTGAACAAATCTCAGTCTCTACTGAGTTC
GCTATTGAGCGTGCTCTTGCTTGGTCTGCGTATCAACAGCGCAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATA TCAAAAGGCC TGACTAGGCTTCCCGTTAAC
GCTAACGACGGCATTTC TATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGCTGTT CAGGCCACTAACGGGACTAACCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGA AATT CAGCAACGCTTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
AATCAGACTCAATTTAACGGTGTTAAAGTCTCTCTCAGGACAACCATGAAATCCAG
GTGGTGCTAACGATGGTGA AACCATTACCATCGATCTGCAAAAAATTTATCCCGGGAATT
TCCGGTGGTGGTGGTGGAAATTC TAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGC
GCAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTG
GACGCAGTTCGTTCTCTCTGGGGGCAATTC AAAACCGTTTGATTAGCCATTACCAAC
CTTGCGCAATACGGTAACCAA TCGAATCCCGCGGTAGCCGATACGAAGATGCTGACTAT
CGAACCGAAGTTTCTAATATGCTTAAAGCGAGATTCTGACGAGCGTGGTACTTCGTT
TCCGCGCAGGC TTAACAGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (316 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNLRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKI **IPGISGGGGGIL**
DSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDVRSSLGAIQNRFDSAITN
LGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVL
SLLR

AA'n54-170

Secuencia de nucleótidos (813 pb):

ATGCGGGGTCTCA TCATCA TCATCA TCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTAGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAAACGCTAACCGCAGGCATTTCTATTGCGCAGACCTAGGAG
CGCGTGAATGAATCAACAACCTGCAGCGTGTCGTGAGTTGCTGTTCTAGGCCACT
AACGGGACTAATCTGTATCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAATTCAGCAACGTCGT
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTTAAAGTCTCTCTCAG
GACAACCGATGAAATCCAGGTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATACCATCGATCTG
CAAAAAATTGATGTGAAAGGCTTGGCCCTTATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGA
CTTATAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAGAAAGTACC
GCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCGATTGTCAAAGTGGACGCGATTCGTTCTTCT
CTGGGGCAATTCAAAACCGTTTTGATTAGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACC
AATCTGAATCCGCGAGTAGCCGATTCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAAT
ATGTCATAAGCGCAGATCTGCAGCAGCGTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCA
GTTCCGCAAAACGTCCTCTTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (270 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQMGRLDYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQVRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEED
RVSNQTFQNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGL**IPGISG**
GGGGILDSMGTLINEDAAAKKSTANPLASIDSALSKVDVRSSLGAIQNR
DSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQ
VPQNVLSLLR

AA'n54-163

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

Secuencia de nucleótidos (792 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTTAAAGTCTCTCTCAG
GACAACCAGATGAAAATCCAGGTGGTGTCTAACGATGGTGAAACCATTACCATCGATCTG
CAAAAAATTATCCCGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGAAATTTAGACTCCATGGGTACA
TTAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATT
GATCTGCAATTGTCAAAGTGGACGCAAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAAACCGT
TTTGATTACGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAACCTCCGCGCTAGC
CGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATGTCTAAAGCGCAGATTCTG
CAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCCAGGTTCGCAAAACGTCCTCTCT
TTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (263 AA):

MRGSHHHHHGMA SMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQVRRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEID
RVSNTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKI **IPGIS**SGGGGGILD
SMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDIAITNL
GNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLS
LLR

AB'n1-170 (o AA'n1-170c402-450)

Secuencia de nucleótidos (807 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAAATACA
AACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCTCTACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACTAACGGGACTAACTCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAGGACCAACCAGATGAAATCCAG
GTTGGTGCTAACGATGGTGAACCAATTACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGC
CTTGGCCTTATCCCGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGAAATTTAGACTCCATGGGTACA
TTAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATT
GATTCTGCATTGTCAAAGTGGACGCAAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAAACCGT
TTTGATTACGCCATTACCAACCTTAG

Secuencia de proteína (268 AA):

MRGSHHHHHGMA SMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQVRRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
DRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSGL**IPGIS**
GGGGGILD**SMG**TLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNR
FDSAITNL

AB'n1-163 (o AA'n1-163c402-450)

Secuencia de nucleótidos (786 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAAATACA
AACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCTCTACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

GCTAACGACGGCATTTCATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACTAACGGGACTAACTCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
AATCAGACTCAATTTAACGGTGTAAAGTCTCTCTCAGGACACCAGATGAAATCCAG
GTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATACCATCGATCTGCAAAAAATTATCCCGGGAATT
TCCGGTGGTGGTGGTGGGAATCTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCC
GCAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAGTG
GACGCAGTTCGTTCTTCTCTGGGGCAATTCAAACCGTTTTGATTACGCCATTACCAAC
CTTTAG

Secuencia de proteína (261 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
DRVSNQTFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKI**IPGISGGGGGIL**
DSMGTLINEDAAAAKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRFDSAITN
L

AA'n1-129

Secuencia de nucleótidos (849 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCCACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTTCATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACTAACGGGACTAACTCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCT
AATCAGATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATCTAGACTCCATGGGTACATTA
ATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGAT
TCTGCATTGTCAAAGTGGACGCGAGTTCTGTTCTCTCTGGGGCAATTCAAACCGTTTT
GATTCAGCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAATCCGCGCGTAGCCGT
ATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTCTAATATGTCTAAAGCGCAGATTCTGCAG
CAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTTA
CTGCGTTAG

Secuencia de proteína (282 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEI
DRVSNQ**IPGISGGGGGILDSMGT**LINEDAAAAKSTANPLASIDSALSKVDA
VRSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQ
QAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

AA'n54-129

Secuencia de nucleótidos (690 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTTCATTGCGCAGACCACTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATT
CTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCT
AACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAGTGGACGCGAGTTCTGTTCTCTCTG
GGGGCAATTCAAACCGTTTTGATTTCAGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAAT
CTGAATCCGCGCTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATG

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

TCTAAAGCGCAGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCAGGTT
CCGCAAAACGTCCTCTCTTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (229 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEID
RVSNQIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSSKVDAV
RSSLGAIQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

AB'n1-129

Secuencia de nucleótidos (684 pb):

ATGCGGGGTTCATCATCATCATCATGCGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCCTACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACCTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTTATTCGCGAGACCCTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACTAACGGGACTAACTCTGATTCC
GATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCGGAAGAAATCGATCGCGTTCT
AATCAGATCCCGGGAATTTCGCGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTACATTA
ATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGAT
TCTGCATTGTCAAAGTGGACGCAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAACCGTTTT
GATTCAGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (227 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEID
DRVSNQIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSSKVDA
VRSSLGAIQNRFDSAITNL

AB'n54-129

Secuencia de nucleótidos (525 pb):

ATGCGGGGTTCATCATCATCATCATGCGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGTTCACTTCTAATATCAAAGGC
CTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCCTGAAGGT
GCGCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAGGCCACT
AACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAACGCTCTG
GAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGATCCCGGGAATTTCGCGTGGTGGTGGTGGGAATT
CTAGACTCCATGGGTACATTAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCT
AACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAGTGGACGCAGTTCGTTCTTCTCTG
GGGGCAATTCAAACCGTTTTGATTTCAGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (174 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPFTSNIKGLTQASRNANDGI
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSLKSIQDEIQORLEEID
RVSNQIPGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSSKVDAV
RSSLGAIQNRFDSAITNL

AA'n1-100

Secuencia de nucleótidos (762 pb):

ATGCGGGGTTCATCATCATCATCATCATGCGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCCTACTGAGTTCC

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAAGGCCACTATCCCGGGAATTTCCGGTGGT
GGTGGTGGGAATTTCTAGACTCCATGGGTACATTAAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAG
AAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTT
CGTTCTTCTCTGGGGCAATTCAAACCGTTTGTATTCAGCCATTACCAACCTTGGCAAT
ACGGTAACCAATCTGAAC TCCGCGCTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAA
GTTTCTAATATGTCTAAAGCGCAGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAG
GCTAACCAGGTTCCGCAAACGTCCTCTCTTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (253 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATIPGISGGGGGILD SMGTLINEDA
AAAKKSTANPLASIDSALSKVDVRSSLGAIQNRFD SAITNLGNTVTNLSA
RSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR

AB'n1-100

Secuencia de nucleótidos (597 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAAATCTCAGTCCCTCACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGCGCTGAATGAAATCAACAAC
AACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTTCAAGGCCACTATCCCGGGAATTTCCGGTGGT
GGTGGTGGGAATTTCTAGACTCCATGGGTACATTAAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAG
AAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATTGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTT
CGTTCTTCTCTGGGGCAATTCAAACCGTTTGTATTCAGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (198 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDG
ISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATIPGISGGGGGILD SMGTLINEDA
AAAKKSTANPLASIDSALSKVDVRSSLGAIQNRFD SAITNL

AA'n1-70

Secuencia de nucleótidos (672 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAAATCTCAGTCCCTCACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTTCTAGACTCCATGGGTACA
TAAATCAATGAAGACGCTGCCGACGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAATT
GATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTTCTGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAACCGT
TTTGATTGAGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAAC TCCGCGCTAGC
CGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGGAAGTTTCTAATATGTCTAAAGCGCAGATTCTG
CAGCAGGCTGGTACTTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACAGGTTCCGCAAACGTCCTCTCT
TTACTGCGTTAG

Secuencia de proteína (223 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDI
PGISGGGGGILD SMGTLINEDAAA KSTANPLASIDSALSKVDVRSSLGA

FIGURA 7, CONTINUACIÓN

IQNRFDSAITNLGNTVTNLNSARSRIEDADYATEVSNMSKAQILQQAGTSVL
AQANQVPQNVLSLLR

AB'n1-70

Secuencia de nucleótidos (507 pb):

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
ATGGGTCTGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGATGGCACAAGTCATTAATACA
AACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCTCACTGAGTTCC
GCTATTGAGCGTCTGTCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGC
CAGGCGATTGCTAACCGCTTCACTTCTAATATCAAAGGCCTGACTCAGGCTTCCCGTAAC
GCTAACGACATCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTCTAGACTCCATGGGTACA
TTAATCAATGAAGACGCTGCCGAGCCAAGAAAAGTACCGCTAACCCTGGCTTCAATT
GATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAAACCGT
TTTGATTGAGCCATTACCAACCTTTAG

Secuencia de proteína (168 AA):

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDPMAQVINTNSLSLLTQNNLN
KSQSSLSSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNANDI
PGISGGGGGILDSMGTLINEDAAAANKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGA
IQNRFDSAITNL

FIGURA 8A

| | | | | | | | | | |
|--------|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | |
| Q53970 | 1 | MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQASRNAND | | | | | | | |
| P72151 | 1 | MALTVENTNIASLNTQRNLNASSNDLNTSLQRLTTGYRINSAKDDAAGLQISNRLSNQISGLNVATRNAND | | | | | | | |
| Q5X5M6 | 1 | MAQVINTNVASLTAQRNLGVSGNMMQTSIQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISQRMATAQIRGMNQAVRNAND | | | | | | | |
| Q6VMV6 | 1 | MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNAND | | | | | | | |
| P13713 | 1 | MAQVINTNSLSLMAQNNLNKSQSSSLGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNAND | | | | | | | |
| Q93RK8 | 1 | --MRINHNI AALNTSRQLNAGSNSAAKNMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRSQIRGLDMASKNAQD | | | | | | | |
| Q02551 | 1 | --MKVNTNIIISLKTQEYLRKNNEGMTQAQERLASGKRINSSLDAAAGLAVVTRMNVKSTGLDAASKNSSM | | | | | | | |
| Q09012 | 1 | MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSSLSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNAND | | | | | | | |
| Q8GNT8 | 1 | MAQVINTNSLSLMAQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANINGLTQASRNAND | | | | | | | |
| Q9FAE7 | 1 | MASTINTNVSSSLTAQRNLSLSQSSSLNTSIQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISERFTSQIRGLNQAVRNAND | | | | | | | |
| Q8ZF76 | 1 | MA-VINTNSLSLLTQNNLNKSQSSSLGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNAND | | | | | | | |
| Q7N5J4 | 1 | MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQGTLGSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANVRGLTQAARNAND | | | | | | | |
| O33578 | 1 | -MTTINTNIGAI AQAAMTKVNDQFNTAMTRLSTGLRINAAKDDAAGMAIGKMTAQVMGLNQAIRNAQD | | | | | | | |
| Q56826 | 1 | MASVINTNDSALLAQNNLTLSKGLGSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANVKGLTQAARNAND | | | | | | | |
| P42273 | 1 | MAQVINTNYLSLVTQNNLNRSQSALGNAIERLSSGMRINSAKDDAAGQAIANRFTSNINGLTQASRNAND | | | | | | | |
| O31059 | 1 | --MVVQHNMQAANASRMLGITGDSKSTEKLSSGFKINRAADDAAGLSISEKMRKQIRGLDQASTNASD | | | | | | | |
| Q7VZC2 | 1 | MAAVINTNYLSLVAQNNLNKSQSALGSAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANVKGLTQAARNAND | | | | | | | |
| Q9F4A4 | 1 | --MI INHNMNALNAHRNMMGNIA TAGKSMEKLSSGLRINRAGDDAAGLAISEKMRGQIRGLDQASRNAQD | | | | | | | |
| Q8P9C4 | 1 | MAQVINTNVMSLNAQRNLNTNSSMALSIIQQLSSGKRITSASVDAAGLAISERFTTQIRGLDVASRNAND | | | | | | | |
| Q82UA3 | 1 | MPQVINTNIASLNAQRNLNVSQNSLSTALQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISERMTSQIRGMNQAARNAND | | | | | | | |
| Q84IC5 | 1 | -GFRINTNGASLNAQVNAGLNSRNLDSLARLSSGLRINSAADDASGLAIADSLKTQANS LGQAIINNAND | | | | | | | |
| | | :: * : : | | | | | | | |
| | | : : : * : * : : * : : : : : * * : | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | |
| Q53970 | 71 | GISIAQTTEGALNEINNNLQVRRELSVQATHTGNSDSLKS IQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQ | | | | | | | |
| P72151 | 71 | GISLAQTAEAGALQQSTNIIQRI RDLALQSAIIGNSDADRAALQKEVAAQQAELTRISDTTTFGGRKLLDG | | | | | | | |
| Q5X5M6 | 71 | GISLAQVAEGAMQETTNIQRMRELSVQAATHTGNSSDRASIQSEISQLKSELERIAQNTTEFNQGRILDG | | | | | | | |
| Q6VMV6 | 71 | GISVAQTTEGALNEINNNLQVRRELSVQATHTGNSDSLSSIQAEITQRLEEIDRVSEQTQFNGVKVLAE | | | | | | | |
| P13713 | 71 | GISLAQTTEGALNEVNDNLQHIRRLTVQAQHGNSSTSDLS IQDEITQRLSEINRISEQTDFNGVKVLS | | | | | | | |
| Q93RK8 | 69 | GISLIQTSEGALNETHSIIQRMSELATQAATHTNTSDRSELQKEMDQLASEVTRISTDTEFNKTKLLDG | | | | | | | |
| Q02551 | 71 | GIDLLQTADSALSSMSSIIQRMRLAVQSSIGSFSEDRKQYTA EFGSLIKELDHVADTTNYYNNIKLLDQ | | | | | | | |
| Q09012 | 69 | GISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELSVQATHTGNSDSLNS IQDEITQRLSEIDRVSNQTQFNGVKVLAS | | | | | | | |
| Q8GNT8 | 71 | GISLAQTTEGALNEVNDNLQHIRRLTVQAQHGNSSSDLQSIQDEITQRLSEIDRISQQTDFNGVKVLSK | | | | | | | |
| Q9FAE7 | 71 | GISLAQTAEAGALKSTGDIQVRRELVQSAIATNSSGDRKAIQAEVQQLSEMDRIAGNTEFNQKLLDG | | | | | | | |
| Q8ZF76 | 70 | GISIAQTTEGSLNEINNNLQVRRELTVOAQHGNSSSDLDS IQDEISLRLAEIDRVSDQTQFNGKVLAE | | | | | | | |
| Q7N5J4 | 71 | GISIAQTTEGALNEINTNLQRIRELTVOAQHGNSSESDIKSIQEEVTQRLKEIDRISEQTQFNGVRVLR | | | | | | | |
| O33578 | 70 | GKNLVDTTTEGAHVEVSSMLQRLRELVQSSIDTNTAADRGSLAAEGKQLIAEINRVAESTTFNGMKVLDG | | | | | | | |
| Q56826 | 71 | GISIAQTTEGALNEINNNLQRIRELTVOSEIGNSKSDLS IQKEVTQRLEEIDRISTQTQFNGIKVLNG | | | | | | | |
| P42273 | 71 | GISVSQTTEGALNEINNNLQRIRELTVOAKHTGNSNSDINSIQNEVNQRLDEINRVSEQTQFNGVKVLSG | | | | | | | |
| O31059 | 69 | GISAVQTAEAGALTEVHSMQRMNELAVQAATHTGNSSEDRSSIQDEINQLTTEIDRVAETTKFNETYLLKG | | | | | | | |
| Q7VZC2 | 71 | GISIAQTTEGALNEINNNLQRIRELTVOASHGNSASDIDS IQQEVNQRLLEEINRIAEQTDFNIGIKVLKS | | | | | | | |
| Q9F4A4 | 69 | GISLIQTAEAGALAETHSIIQRMRELSVQSAATNTNVAVDRTAIQDEINSLTEEINRISGDTFNQTKLLDG | | | | | | | |
| Q8P9C4 | 71 | GISLAQTAEAGAMVEIGNNLQRIRELSVQSAIATNSATDREALNSEVKQLTSEIDRVANQTSFNGTKLLNG | | | | | | | |
| Q82UA3 | 71 | GISLAQTAEAGALVEIGNNLQRIRELVQSAIATNSSEDDREALQKEVTQLIDEIQRVGEQTSFNGTKLLDG | | | | | | | |
| Q84IC5 | 70 | ANSMLQIADKAMDEQLKILETIKVKATQAAQDGTAKTRAMIQGEINKLMEELDNIANTTTYNGKQLLSG | | | | | | | |
| | | . . : : : . * : : : * : : * | | | | | | | |
| | | * : . . * : . * | | | | | | | |

FIGURA 8A, CONTINUACIÓN

| | | | | | | | |
|--------|-----|---|---|---------------------------------------|---|-----------------------|-------|
| | | | | | | | |
| Q53970 | 141 | DNQ-MK--IQVGANDG----- | | ETITIDLQ----- | | KID-VKSLG---- | LDGFN |
| P72151 | 141 | SFGTTS--FQVGSNAY----- | | ETIDISLQNASASAIGSYQVG-SNGAGTVASVAGTA | | | |
| Q5X5M6 | 141 | SFSGAS--FQVGANSN----- | | QTINFSIG----- | | SIK-ASSIGGIATATGTE | |
| Q6VMV6 | 141 | NNE-MK--IQVGANDG----- | | ETITINLA----- | | KID-AKTLG---- | LDGFN |
| P13713 | 141 | DQK-LT--IQVGANDG----- | | ETIDIDLK----- | | KID-AKQLG---- | MDTF- |
| Q93RK8 | 139 | TAQNLT--FQIGANEG----- | | QTMSLSIN----- | | KMD-SE----- | SLK |
| Q02551 | 139 | TATGAATQVSIQASDKAN----- | | DLINIDLFNAKGLSAGTITLGS GSTVAGYSALSVAD | | | |
| Q09012 | 141 | DQT-MK--IQVGANDG----- | | ETIEIALD----- | | KID-AKTLG---- | LDNFS |
| Q8GNT8 | 141 | DQK-LT--IQVGANDG----- | | ETIDIDLK----- | | NIN-AQSLG---- | LDKFN |
| Q9FAE7 | 141 | SFGSAT--FQVGANAN----- | | QTITATTGNFRNNY-GAQLT-ASASG--AATSGAS | | | |
| Q8ZF76 | 140 | NTT-MS--IQVGANDG----- | | ETIDINLQ----- | | KID-SKSLG---- | LGSYS |
| Q7N5J4 | 141 | DSK-MT--IQVGANDN----- | | EVIDIDLK----- | | KID-KEALN---- | LKFT |
| O33578 | 140 | SFTGKQ--LQIGADSG----- | | QTMAINVDSAAATDIGAHKISSASTVVADAALDIT | | | |
| Q56826 | 141 | DVTEMK--IQVGANDN----- | | ETIGIKLG----- | | KIN-SEKLN---- | LKEFS |
| P42273 | 141 | EKSKMT--IQVGTNDN----- | | EVIEFNLD----- | | KID-NDTLG---- | VASDK |
| O31059 | 139 | GNGDRT--VRVYAHDA GLVGSLSQNTTKATFQMRKLEIGDSY TIGGTTYKIG-AETVK--EAMTALK | | | | | |
| Q7VZC2 | 141 | NATDMTSLIQVGAKDN----- | | ETIDIKID----- | | RNS-NWNLY---- | DAVGT |
| Q9F4A4 | 139 | GFKG-E--FQIGANSN----- | | QTVKLDIG----- | | NMS-AA----- | SLG |
| Q8P9C4 | 141 | DFSGAL--FQVGADAG----- | | QTIGINS----- | | IVDAN-VDSL G--KANFAAS | |
| Q82UA3 | 141 | SFASQI--FQVGANEG----- | | ETIDFTD----- | | | |
| Q84IC5 | 140 | SFSNAQ--FQIGDKAN----- | | QTVNATIG----- | | STN-SAKVGQTRFETGAV | |
| | | . | : | | : | | |

FIGURA 8B

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|------|------|------|------|-----|----|-----|------|-----|------|-------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-------|-----|----|-----|----|---|---|---|---|----|---|----|----|----|---|---|---|---|------|----|---|----|---|---|---|---|---|---|----|---|---|-------|---|---|---|------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-------|-------|-------|---|---|-----|---|-----|
| Q53970 | 418 | PLAS | DSAL | SKVD | VRSS | GAI | QH | FDS | AITN | LGN | TVTN | LSARS | RIED | ADY | ATE | VSH | MSKA | QIL | QOAG | TSV | LAQ | ANQ | VPQ | NVLS | LLR-- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P72151 | 401 | AI | AV | TN | AL | AA | ID | Q | RA | D | G | AV | Q | N | F | K | N | T | ID | N | L | T | N | I | SE | NA | TN | ARS | RI | K | D | T | F | AA | E | TA | AL | SK | N | Q | V | L | QOAG | TA | I | LA | Q | N | Q | L | P | Q | AV | L | S | LLR-- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q5X5M6 | 387 | AI | K | R | I | D | A | A | L | N | S | V | H | R | A | K | G | A | L | Q | H | F | E | S | T | I | A | N | L | Q | N | V | S | D | N | L | S | A | A | R | S | R | I | Q | D | A | D | Y | A | E | M | A | S | L | T | K | N | Q | I | L | QOAG | T | A | M | L | A | Q | A | N | S | L | P | Q | S | V | L | S | LLR-- | | | | | | |
| Q6VMV6 | 400 | P | L | E | T | D | K | A | L | A | K | V | D | I | L | R | S | G | A | V | Q | N | F | D | S | A | I | T | N | L | G | N | T | V | N | L | S | A | R | S | R | I | E | D | A | D | Y | A | T | E | V | S | H | M | S | R | A | Q | I | L | QOAG | T | S | V | L | A | Q | A | N | Q | T | T | Q | N | V | L | S | LLQ-- | | | | | | |
| P13713 | 264 | P | L | A | T | D | K | A | L | A | Q | V | D | I | L | R | S | G | A | V | Q | N | F | D | S | V | I | N | N | L | S | T | V | N | L | S | A | S | Q | S | R | I | Q | D | A | D | Y | A | T | E | V | S | H | M | S | R | A | N | I | L | QOAG | T | S | V | L | A | Q | A | N | Q | S | T | Q | N | V | L | S | LLR-- | | | | | | |
| Q93RK8 | 245 | A | L | T | I | K | T | A | I | D | T | V | S | S | E | R | A | K | G | A | V | Q | N | F | L | E | H | T | I | N | N | L | G | T | S | S | E | N | L | T | A | E | S | R | I | R | D | V | M | A | S | E | M | E | Y | T | K | N | I | L | T | Q | A | S | Q | A | M | L | A | Q | A | N | Q | Q | P | V | L | Q | L | L | K | G-- | | |
| Q02551 | 481 | V | I | G | L | D | A | A | T | K | I | N | F | Q | R | A | D | G | A | Y | N | F | L | E | Y | T | A | K | G | L | M | G | A | Y | E | N | M | Q | A | S | E | S | R | I | R | D | A | M | A | E | F | V | S | L | T | T | K | Q | I | L | V | Q | S | G | T | A | M | L | A | Q | A | N | M | K | P | N | S | V | L | K | L | Q | Q | I-- |
| Q09012 | 437 | P | L | S | K | I | D | E | A | L | A | K | V | D | I | L | R | S | G | A | V | Q | N | F | D | S | A | I | T | N | L | G | N | T | V | N | L | S | A | R | S | R | I | E | D | A | D | Y | A | T | E | V | S | H | M | S | R | A | Q | I | L | QOAG | T | S | V | L | A | Q | A | N | Q | T | T | Q | N | V | L | S | LLR-- | | | | | |
| Q8GNT8 | 329 | P | L | A | T | D | K | A | L | S | Q | V | D | I | L | R | S | G | A | V | Q | N | F | D | S | V | I | N | N | L | S | T | V | N | L | S | A | S | R | S | R | I | Q | D | A | D | Y | A | T | E | V | S | H | M | S | R | A | Q | I | L | QOAG | T | S | V | L | A | Q | A | N | Q | S | T | Q | N | V | L | S | LLR-- | | | | | | |
| Q9FAE7 | 405 | A | L | K | I | D | A | A | S | A | V | N | F | Q | R | A | S | G | A | L | Q | S | F | E | T | T | V | N | L | Q | S | T | S | E | N | M | S | A | S | R | S | R | I | Q | D | A | F | A | E | T | A | N | L | S | R | S | Q | I | L | QOAG | T | A | M | V | A | Q | A | N | Q | L | P | Q | G | V | L | S | LLK-- | | | | | | | |
| Q8ZF76 | 282 | P | L | E | T | D | D | A | L | K | Q | V | D | I | L | R | S | G | A | V | Q | N | F | E | S | A</ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

FIGURA 9

TLR5 de Homo Sapiens

```

1  mgdhldlllg vvlmagpvfg ipscsfdgri afyrfcnltq vpqvlntter lllsfnyirt
61 vtassfpfle qlqllelgsq ytpltidkea frnlpnlril dlgsakiyfl hpdafqglfh
121 lfelrlyfcg lsdavlkdgy frnlkaltrl dlsknqirsl ylhpsfgkln slksidfssn
181 qiflvcehel eplqgktlsf fslaanslys rvsvdwgkcm npfrnmvlei ldvsngngwtv
241 ditgnfsnai sksqafslil ahhimgagfg fhnikdpdqn tflaglarssv rhldlshgfv
301 fslnsrvfet lkdlkvlsla ynkinkiafe afyglndlnqv lnlsynllge lyssnfyglp
361 kvayidlqkn hiaiiqqdtf kflekltqtd lrdnalttih fipsipdifl sgnklvtlph
421 inltanlihl senrlenldi lyfllrvphl qililnqnrf sscsgdqtps enpsleqlfl
481 genmlqlawe telcwdvfeg lshlqvlyln hnylnslppg vfshltalrg lslnsnrltv
541 lshndlpanl eildisrnql lapnrdvfv lsvldithnk ficecelstf inwlnhtnvt
601 iagppadiyc vypsfsqvs lfslstegcd eeevlkslkf slfivctvtl tlflmtiltv
661 tkfrgfcfic yktaqrlyfk dhpqgtepdm ykydaylcfs skdftwvqna llkhldtqys
721 dqnrfnlcfe erdfvpgenr ianiqdaewn srkivclvsv hflrdgwcle afsyaqgrcl
781 sdlnsalimv vvgslsqyql mkhqsirgfv qkqqylrwpe dfqdvvgwflh klsqqilkke
841 kekkkdnnp lqtvatis

```