

MUTEÍNAS LIGHT Y USOS DE ESTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud PCT núm. PCT/CN2022/097735, presentada el 8 de junio de 2022. El contenido de la solicitud PCT anterior se considera parte de la presente y se incorpora a la presente en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

10

El listado de secuencias titulado DCF230337WO-Sequence listing.xml, que se creó el 6 de junio de 2023 y tiene un tamaño de 95.646 bytes, se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

15

CAMPO TÉCNICO

- La presente descripción se relaciona con a una muteína LIGHT (o “mutante LIGHT”), un vector aislado que comprende el polinucleótido que codifica la muteína LIGHT, una célula huésped que comprende el polinucleótido aislado o el vector aislado que
- 20 codifica la muteína LIGHT, una composición farmacéutica que comprende la muteína/muteínas LIGHT, el uso de la muteína LIGHT, el polinucleótido aislado, el vector aislado, la célula huésped o la composición farmacéutica en la elaboración de un fármaco para prevenir o tratar una enfermedad, y un método para prevenir o tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto
- 25 una cantidad terapéuticamente efectiva de las muteína/muteínas LIGHT o el polinucleótido aislado, el vector aislado, la célula huésped o la composición farmacéutica.

ANTECEDENTES

La documentación de esta sección tiene únicamente el propósito de proporcionar la información de antecedentes relacionada con la presente descripción, y la
5 información presente bajo esta sección no constituye necesariamente la técnica anterior.

LIGHT (similar a la linfotoxina, exhibe expresión inducible y compite con la glicoproteína D del virus del herpes simple para el mediador de entrada del virus del herpes, un receptor expresado por las células T) se conoce como miembro 14 del
10 factor de necrosis tumoral de la superfamilia (TNFSF14), también conocido como ligando HVEM-L (HVEM-L). LIGHT es una proteína de membrana compuesta por 240 aminoácidos (AA) (sec. con núm. de ident.: 86), de los cuales 37 AA forman el dominio citoplásmico, 22 AA forman el dominio transmembrana, y 181 AA forman el dominio extracelular. LIGHT se induce transitoriamente en las células inmunitarias,
15 especialmente las células dendríticas inmaduras (DC) y las células T activadas. La forma de LIGHT anclada a la membrana puede ser escindida por proteasas, dando como resultado una estructura funcional soluble (Yu et al., 2004).

LIGHT tiene tres receptores: mediador de entrada del virus del herpes (HVEM), receptor de linfotoxina beta (LT β R), y receptor señuelo 3 (DcR3). El HVEM se
20 expresa en células T, células NK y células dendríticas. La interacción entre LIGHT y HVEM estimula la activación, proliferación y supervivencia de las células T. Otro receptor LT β R se encuentra en la superficie de las células epiteliales, estromales, DC inmaduras, y mieloides, pero no en los linfocitos. La interacción LIGHT-LT β R conduce a la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión implicadas en la
25 formación de ganglios linfáticos y la migración de células dendríticas. El tercer compañero de unión, DcR3, es una proteína soluble, que amortigua la señal de activación iniciada por LIGHT (Liu et al., 2021). Introducir LIGHT en tumores o

microentorno tumoral podría ser una estrategia potente para la inmunoterapia contra el cáncer.

Hemos diseñado genéticamente LIGHT humana para interactuar selectivamente con sus receptores con el objetivo de utilizar la proteína LIGHT recombinante como un agente terapéutico.

SUMARIO

Para el propósito mencionado anteriormente, se proporciona en la presente descripción una nueva muteína LIGHT. En algunas modalidades, las muteínas LIGHT tienen la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 87 o la sec. con núm. de ident.: 88 o las sec. con núms. de ident.: 1-85, o las sec. con núms. de ident.: 89-93.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 86. En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 87. En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 88. En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núms. de ident.: 1-85 o la sec. con núms. de ident.: 89-93.

En la presente descripción se proporciona una nueva muteína LIGHT, que se selecciona del grupo que consiste en una proteína que tiene más de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 86.

97 %, 98 %, 99 % de homología con la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 87. En algunas modalidades, las nuevas muteínas LIGHT, que comprenden una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 86. Las mutaciones de aminoácidos seleccionadas de una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 95, 103, 117, 125, 150, 152, 155, 157, 158, 160, 161, 175, 184, 189, 190, 198, 202, 208, 214, 220, 221, 227, 228, y la combinación de cualquiera de ellas, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT comprenden una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 87. Las mutaciones de aminoácidos seleccionadas de una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 95, 103, 117, 125, 150, 152, 155, 157, 158, 160, 161, 175, 184, 189, 190, 198, 202, 208, 214, 220, 221, 227, 228, y la combinación de cualquiera de ellas, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 87, y la posición del primer aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 87 se define como la posición 74.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT comprenden una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 88. Las mutaciones de aminoácidos seleccionadas de una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 95, 103, 117, 125, 150, 152, 155, 157, 158, 160, 161, 175, 184, 189, 190, 198, 202, 208, 214, 220, 221, 227, 228, y la combinación de cualquiera de ellas, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 88, y la posición del primer aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 88 se define como la posición 87.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident. 86, 87 u 88 y que tiene una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en S103N, Q117E/Q117N/Q117H/Q117R, L126M, G150A/G150S/G150R, V152M,

L158Q/L158P/L158M, S160G/S160N/S160T/S160A, T161G/T161P/T161S/T161N, L166M, E175K, Q184R, R189S, A190T/A190V, W198Q, F202Y, H208Y/H208R, K214E, L220S/L220N/L220T/L220R/L220M, D221G, E222K/E222S, L227T/L227M, R228L, R232H y la combinación de cualquiera de ellos.

- 5 En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident. 100 y que tiene una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A95T, A101D, N102R, S103N, Q117E/Q117N/Q117H/Q117R, L126M, V135I, T136S, G150A/G150S/G150R, V152M, P155R, G157S, L158Q/L158P/L158M,
- 10 S160G/S160N/S160T/S160A, T161G/T161P/T161S/T161N, L166M, P174L, E175K, Q184R, R189S, A190T/A190V, W198Q, F202Y, H208Y/H208R, E213D, K214E, L220S/L220N/L220T/L220R/L220M, D221G, E222K/E222S/E222Q/E222D/E222N, L227T/L227M, R228L, R232H y la combinación de cualquiera de ellos, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 87, y la posición del
- 15 primer aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 87 se define como la posición 74.

- En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT que tiene la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident. 88 y que tiene una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A95T, A101D, N102R, S103N, S104P, L105P, T116S,
- 20 Q117E/Q117N/Q117H/Q117R, L126M, V135I, T136S, G150A/G150S/G150R, V152M, P155R, L156P, G157S, L158Q/L158P/L158M, S160G/S160N/S160T/S160A, T161G/T161P/T161S/T161N, L166M, P174L, E175K, Q184R, R189S, A190T/A190V, W198Q, F202Y, H208Y/H208R, E213D, K214E, L220S/L220N/L220T/L220R/L220M, D221G, E222K/E222S/E222Q/E222D/E222N,
- 25 L227T/L227M, R228L, R232H y la combinación de cualquiera de ellos, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 88, y la posición del primer aminoácido de sec. con núm. de ident.: 87 se define como la posición 87.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una muteína LIGHT de unión a LT β R, que se selecciona del grupo que consiste en muteínas LIGHT que tienen la secuencia establecida en la sec. con núms. de ident.: 1-75, 76-85 y las sec. con núms. de ident.: 89-93. O la muteína se selecciona de una proteína que tiene

5 la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 87 o la sec. con núm. de ident.: 88 y se compara con la sec. con núm. de ident.: 87 o la sec. con núm. de ident.: 88 que tiene al menos una diferencia de aminoácidos.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a LT β R es HVEM (p. ej., HVEM humano) de no unión, la muteína LIGHT incluye la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-11.

10

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a LT β R es de unión a HVEM, la muteína LIGHT incluye la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 12-75, las sec. con núms. de ident.: 77-85 y las sec. con núms. de ident.: 89-93.

15 En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a LT β R se une a DcR3 con afinidad reducida, en comparación con LIGHT silvestre, la muteína LIGHT incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 52, 58, 61 y 89-93.

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT de unión a LT β R, que es una proteína de unión a mHVEM (HVEM de ratón) y una proteína de no unión a hHVEM (HVEM humano). Por ejemplo, la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 9 u 11.

20

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una muteína LIGHT de unión a LT β R humana, que se selecciona del grupo que consiste en muteína LIGHT que tiene la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 9, 11, 12, 22, 37, 52. 53-85.

25

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una muteína LIGHT de unión a LT β R de ratón, que se selecciona del grupo que consiste en muteína LIGHT

que tiene la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1, 9, 11, 12, 22, 38 y 52. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una muteína LIGHT de unión a LT β R y de unión a hHVEM, que se selecciona del grupo que consiste en muteínas LIGHT que tienen la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.:

5 21, 22, 37 y 51. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una muteína LIGHT de unión a LT β R y de no unión a hHVEM, que se selecciona del grupo que consiste en muteínas LIGHT que tienen la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 9 y 11.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una LIGHT de unión
10 a LT β R en forma truncada y las muteínas de estas que comprenden la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1 a 85. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una LIGHT de unión a LT β R y unión a mHVEM en forma truncada y las muteínas de estas, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las sec. con núms. de ident. 1
15 a 85. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporciona una LIGHT de unión a LT β R y de unión a mHVEM en forma truncada y las muteínas de estas, que es hHVEM de no unión, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-11.

En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan muteínas LIGHT
20 de unión a LT β R y de unión a HVEM, que comprenden la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 12-75, las sec. con núms. de ident.: 77-85 y las sec. con núms. de ident.: 89-93.

En otro aspecto, se proporciona en la presente descripción un polinucleótido aislado que codifica la muteína LIGHT proporcionada en la presente descripción.

25 En otro aspecto, se proporciona en la presente descripción un vector aislado que comprende el polinucleótido que codifica la muteína LIGHT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente descripción una célula huésped que comprende el polinucleótido aislado o el vector aislado que codifica la muteína LIGHT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente descripción una composición farmacéutica que comprende la muteína/muteínas LIGHT, el polinucleótido aislado, el vector aislado o la célula huésped.

En otro aspecto, se proporciona en la presente descripción el uso de la muteína LIGHT o el polinucleótido aislado o el vector aislado o la célula huésped o la composición farmacéutica en la elaboración de un agente terapéutico para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, o afección.

La descripción proporciona un método para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la muteína/muteínas LIGHT, el polinucleótido aislado, el vector aislado, la célula huésped, o la composición farmacéutica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

La siguiente es una breve descripción de las figuras, que se presentan con el propósito de ilustrar las modalidades ilustrativas descritas en la presente y no con el propósito de limitar las mismas.

La Figura 1 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de LT β R humano. LIGHT-9, LIGHT-11, LIGHT-21, LIGHT-22, LIGHT-52, LIGHT-3, LIGHT-29 y LIGHT-20 muestran afinidades de unión más fuertes que LIGHT humana silvestre. El eje X es la concentración de proteína LIGHT (ng/ml), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 2 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de LT β R de ratón. LIGHT-3, LIGHT-9, LIGHT-11, LIGHT-29, LIGHT-22 y LIGHT-52 muestran una afinidad de unión más fuerte que LIGHT humana silvestre. El eje X es la concentración de proteína LIGHT (ng/ml), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 3 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de HVEM humano. LIGHT-20, LIGHT-21, LIGHT-22, LIGHT-29 y LIGHT-52 muestran una afinidad de unión más fuerte que LIGHT humana silvestre, mientras que LIGHT-3, LIGHT-9 y LIGHT-11 no se unen al HVEM humano. El eje X es la concentración de proteína LIGHT (ng/ml), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

Las Figuras 4A y 4B muestran los resultados de alineación de los aminoácidos 1-60 y 61-120 de LIGHT-1 a LIGHT-90 con LIGHT humana de longitud completa, respectivamente. Las Figuras 5A y 5B muestran los resultados de alineación de los aminoácidos 121-180 y 181-240 de LIGHT-1 a LIGHT-90 con LIGHT humana de longitud completa, respectivamente.

La Figura 6 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de LT β R humano. LIGHT-1, LIGHT-2, LIGHT-58, LIGHT-52, LIGHT-86 y LIGHT-88 muestran afinidad de unión similar con LIGHT humana silvestre. El eje X es la concentración de proteína LIGHT trimérica (nM), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 7 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de LT β R de ratón. LIGHT-58, LIGHT-60, LIGHT-61, LIGHT-86, LIGHT-87, LIGHT-88 y LIGHT-89 muestran una afinidad de unión más fuerte que LIGHT humana silvestre. El eje X es la concentración de proteína LIGHT trimérica (nM), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 8 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al dominio extracelular de HVEM humano. LIGHT-58, LIGHT-60, LIGHT-61 y LIGHT-52 muestran una afinidad de unión más fuerte que LIGHT humana silvestre, mientras que LIGHT-1, LIGHT-2, LIGHT-88 y LIGHT-89 no se unen al HVEM humano. El eje X es la concentración de proteína LIGHT trimérica (nM), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 9 muestra el análisis ELISA de muteínas LIGHT que se unen al DcR3 humano (Uniprot O95407). LIGHT-1, LIGHT-2, LIGHT-86, LIGHT-87, LIGHT-88, LIGHT-89 y LIGHT-90 muestran afinidad de unión reducida que LIGHT humana

silvestre. El eje X es la concentración de proteína LIGHT (nM), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 10 muestra el análisis ELISA de la unión de LIGHT-60, LIGHT-61 y LIGHT-90 al dominio extracelular de LT β R humano. LIGHT-60, LIGHT-61 y LIGHT-90 muestran afinidad similar al dominio extracelular de LT β R humano, en comparación con LIGHT (74-240) (LIGHTwt, ECD de LIGHT silvestre). El eje X es la concentración de proteína LIGHT (nM), y el eje Y es la absorbancia a 450 nm.

La Figura 11 muestra la activación funcional de LT β R humano por LIGHT90, LIGHT60 y LIGHT63 en células reporteras Hela-NK-kB. En la tabla se muestran las EC50 de cada variante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se explica con mayor detalle a continuación. Esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de todas las diferentes maneras en que puede implementarse la invención o todas las características que pueden añadirse a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una modalidad pueden incorporarse en otras modalidades, y las características ilustradas con respecto a una modalidad particular pueden eliminarse de esa modalidad. Además, numerosas variaciones y adiciones a las diversas modalidades sugeridas en la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción que no se apartan de la presente invención. Por lo tanto, la siguiente descripción pretende ilustrar algunas modalidades particulares de la invención, y no especificar exhaustivamente todas las permutaciones, combinaciones y variaciones de estas.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la descripción. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente puede usarse en la práctica para la prueba de la presente descripción, los materiales y métodos preferentes se describen en la presente descripción. Al describir y reivindicar la presente descripción, se usará la siguiente terminología.

Definiciones

El término “de origen natural” como se usa en la presente descripción se relaciona con una secuencia de origen natural, lo que significa que la totalidad o partes de esta no son sintéticas y existen o se producen en la naturaleza. Con mayor preferencia, el término “de origen natural” tal como se usa en la presente descripción se refiere a

una secuencia de origen natural que significa que la secuencia completa no es sintética y existe o se produce en la naturaleza.

El término “mutado”, “mutación”, “muteína” y “mutante” se usan indistintamente en la presente descripción. Típicamente, y de manera preferente, una mutación es una
5 sustitución de un aminoácido por uno o más aminoácidos, una inserción, una delección o una combinación de estos. Con mayor preferencia, una mutación es una sustitución de un único aminoácido por un único aminoácido diferente.

El término “LIGHT” tiene el significado comúnmente entendido en la técnica y se refiere a una proteína expresada en células T CD4/CD8 activadas, células dendríticas (DC),
10 monocitos, y células asesinas naturales (NK, en inglés). La unión de LIGHT al mediador de entrada del virus del herpes (HVEM) expresado en células T, DC, y monocitos en reposo, o al receptor de linfotóxina beta (LT β R) expresado en las DC y las células estromales promueve la activación, proliferación y producción de citoquinas de las células T. La secuencia de aminoácidos completa de LIGHT se muestra en la
15 sec. con núm. de ident.: 86.

Como se usa en la presente descripción, “muteína LIGHT” significa las muteínas derivadas de la secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 86 con la mutación en uno o más aminoácidos, dicha mutación es una sustitución de un aminoácido por uno o más aminoácidos, una inserción, una delección o una combinación de estos. Con
20 mayor preferencia, dicha mutación es una sustitución de un único aminoácido por un único aminoácido diferente. Las muteínas LIGHT comprenden al menos la secuencia mostrada en la sec. con núm. de ident.: 87 y tienen uno o más aminoácidos sustituidos por un único aminoácido diferente.

Como se usa en la presente descripción, “muteína LIGHT” también incluye “muteína
25 LIGHT en forma truncada”, “muteína LIGHT en forma truncada” se refiere a una LIGHT más corta, en comparación con LIGHT de origen natural en la sec. con núm. de ident.: 86, que cubre una región funcional principal de LIGHT sin dominio transmembrana de LIGHT, como el ejemplo usado en la presente descripción, muteína LIGHT en una

forma truncada que comprende las secuencias de LIGHT 74-240 (sec. con núm. de ident.: 87), LIGHT (87-240) (sec. con núm. de ident.:88) y muteínas LIGHT (sec. con núm. de ident.: 1-85), o la combinación de estas.

“LT β R” significa receptor de linfotóxina beta.

- 5 “mLT β R” significa receptor de linfotóxina beta derivado de ratón, p. ej., Uniport P50284.

“hLT β R” significa receptor de linfotóxina beta procedente del ser humano, p. ej., Uniport P36941.

“Muteína LIGHT de unión a LT β R” significa proteínas de muteína LIGHT que pueden unirse a LT β R.

- 10 “HVEM” significa mediador de entrada del virus del herpes.

“mHVEM” significa mediador de entrada del virus del herpes derivado del ratón, p. ej., Uniport Q80WM9.

“hHVEM” significa mediador de entrada del virus del herpes procedente de seres humanos, p. ej., Uniport Q92956.

- 15 “Muteína LIGHT de unión a LT β R y de unión a mHVEM” significa proteínas de muteína LIGHT que pueden unirse tanto a Lt β R como al HVEM de ratón.

Muteínas LIGHT

- La presente descripción proporciona una muteína LIGHT, que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 86, 87 u 88.
- 20

En algunas modalidades, la muteína LIGHT proporcionada en la presente descripción es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 88.

- 25 La homología a una secuencia es bien conocida por los expertos en la técnica. El método para medir la homología a una secuencia, que incluye, pero no se limita a, BLAST en el sitio web del NCBI.

La muteína LIGHT proporcionada en la presente descripción incluye al menos una mutación de aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 86, 87 u 88.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT incluye las mutaciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 95, 101, 102, 103, 104, 116, 117, 120, 126, 135, 136, 150, 152, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 166, 174, 175, 184, 189, 190, 198, 202, 208, 213, 214, 220, 221, 222, 223, 227, 228, 232, y la combinación de estos, en donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 87.

La posición del primer aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 87 se define como la posición 74.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT incluye una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en A95T, A101D, N102R, S103N, S104P, L105P, T116S, Q117E/Q117N/Q117H/Q117R, L120P/L120Q, L126M, V135I, T136S, G150A/G150S/G150R, V152M, P155R, L156P, G157S, L158Q/L158P/L158M, S160G/S160N/S160T/S160A/S160H/S160R, T161G/T161P/T161S/T161N, L166M, P174L, E175K, Q184R, R189S, A190T/A190V, W198Q, F202Y, H208Y/H208R, E213D, K214E, L220S/L220N/L220T/L220R/L220M/L220Q, D221G, E222K/E222S/E222Q/E222D/E222N, R223H, L227T/L227M, R228L, R232H y la combinación de estos, en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida en la sec. con núm. de ident.: 87.

En la presente descripción, la mutación “A95T” significa que el aminoácido A en la posición 95 está mutado al aminoácido T. La mutación “L120P/L120Q” significa mutación L120P o L120Q. Otras mutaciones descritas en la presente tienen el significado similar.

En la presente descripción, el aminoácido se presenta como código estándar de una única letra de acuerdo con la abreviatura de aminoácidos estándar IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada).

En algunas modalidades, la muteína LIGHT incluye una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de Q117E/Q117N/Q117H, G150A/G150S, S160G/S160N/S160T/S160H/S160A, T161G/T161P/T161S/T161N, W198Q, K214E, L220S/L220N/L220T/L220M/L220R/L220Q, E222K/E222S/E222Q/E222D/E222N, R228L y R232H.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT incluye una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de A95T, A101D, N102R, S103N, S104P, L105P, T116S, Q117E/Q117N/Q117H/Q117R, L126M, V135I, T136S, G150A/G150S/G150R, V152M, P155R, L156P, G157S, L158Q/L158P/L158M, S160G/S160N/S160T/S160A, T161G/T161P/T161S/T161N, L166M, P174L, E175K, Q184R, R189S, A190T/A190V, W198Q, F202Y, H208Y/H208R, E213D, K214E, L220S/L220N/L220T/L220R/L220M, D221G, E222K/E222S/E222Q/E222D/E222N, L227T/L227M, R228L y R232H.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT incluye una cualquiera de las combinaciones de mutaciones: V152M, W198Q y R228L; R189S, W198Q y R228L; G150A y L220S; V152M, T161P y R228L; T161P, R189S, W198Q y R228L; W198Q, L220N y D221G; P155R, L220Q y R232H; G150S, S160G y L220S; G150S, T161G y L220S; G150S, T161P y L220S; G150S y L220S; L158Q y K214E; S104P, G157S, H208Y y L220R; L158Q y L166M; Q117E, E175K, K214E y L227T; Q117H, L158M y E213D; H208Y y Q117N; L158Q, K214E y E222K; L156P, S160G y L220M; S160A, L220S y E222D; S160G, T161P y L220T; S160G, T161S y L220S; S160G y L220S; S160G, A190T y L220S; S160H y L220S; S160H, L220S y E222Q; S160N, T161S, L220S y E222D; S160N, K214E y L227M; S160N y L220S; S160R, T161N y L220S; S160R, T161S y L220S; S160R y L220S; T161P y L220S; T161S y L220S; T161S, L220S y E222N; H208Y; A190T, F202Y y K214E; Q184R y W198Q; L158P, L166M y L220M; L156P y H208Y; G150R, S160G y L220S; G150R y L220S; G150R, S160T y L220S; G150R, L158P y L220S; G150S, S160P, T161S, L220S y R223H; L126M y K214E; L126M, A190V y H208Y; L120P y L220R; L105P, Q117R y L220Q; N102R, L120Q, H208R y K214E; A101D, S160N y L220S; L220S; Q117N, L220S y L227T; Q117E, L220S y L227T; Q117N,

- L220T y L227T; Q117E, L220T y L227T; L220S y L227T; S160G, T161G y L220S; S160G, T161P y L220S; S160G, T161G, L220S y E222S; S160G, T161P, L220S y E222S; S160G, T161G y L220T; T161G, L220S y L227T; T161P, L220S y L227T; S160G, L220S y L227T; S160G, L220T y L227T; T161S, L220S y L227T; S160G, T161G, L220S y L227T; S160G, T161P, L220S y L227T; Q117N, T161G, L220S y L227T; Q117N, T161P, L220S y L227T; Q117N, S160G, L220S y L227T; Q117E, T161G, L220S y L227T; Q117N, S160G, T161G, L220S y L227T; Q117N, S160G, T161P, L220S y L227T; Q117E, S160G, T161P, L220S y L227T; Q117N, S160G, T161S, L220S y L227T; Q117E, S160G, T161S, L220S y L227T; Q117N, S160G, T161G, L220S, E222S y L227T; Q117N, S160G, T161P, L220S, E222S y L227T; Q117E, S160G, T161G, L220S, E222S y L227T; Q117E, S160G, T161P, L220S, E222S y L227T; S160G, T161S, L220S, E222S y L227T; Q117E, S160G, T161S, L220S, E222S y L227T; G150R, S160R y L220S; G150R, S160R, W198Q, L220S y R228L; A95T, G150R, S160R, P174L, W198Q, L220S y R228L; G150R, S160R, P174L, W198Q y R228L; o S160G, T161G, L220T y E222S.
- 15 En algunas modalidades, la muteína LIGHT tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1 a 75, 77 a 85 y las sec. con núms. de ident.: 89 a 93. En algunas modalidades, la muteína LIGHT tiene una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1 a 75, 77 a 85 y las sec. con núms. de ident.: 89 a 93.
- 20 En algunas modalidades, la muteína LIGHT tiene una secuencia de aminoácidos que es diferente de una cualquier secuencia de la sec. con núms. de ident.: 1 a 75, 77 a 85 y la sec. con núms. de ident.: 89 a 93 en no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido.
- 25 Las muteínas LIGHT se unen selectivamente a los receptores LIGHT, LT β R, HVEM o DcR3. En alguna modalidad, las muteínas LIGHT son de unión a LT β R. En alguna modalidad, las muteínas LIGHT son de unión a HVEM. En algunas modalidades, las muteínas LIGHT son de no unión a HVEM.

En alguna modalidad, en comparación con LIGHT silvestre, las muteínas LIGHT se unen a LT β R con afinidad mejorada. En alguna modalidad, en comparación con LIGHT silvestre, las muteínas LIGHT se unen a HVEM con afinidad mejorada. En alguna modalidad, en comparación con LIGHT silvestre, las muteínas LIGHT se unen a DcR3 con afinidad reducida. En alguna modalidad, en comparación con LIGHT silvestre, las muteínas LIGHT se unen a LT β R o HVEM con afinidad mejorada y se unen a DcR3 con afinidad reducida.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT mantienen la reactividad cruzada entre diferentes especies.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a LT β R (p. ej., LT β R humano) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-75, 77-85 y las sec. con núms. de ident.: 89-93.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen a LT β R humano con un valor de EC50 no superior a 1000 ng/ml, 800 ng/ml, 600 ng/ml, 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 80 ng/ml, 70 ng/ml, 60 ng/ml o 50 ng/ml. En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen a LT β R humano con un valor de EC50 no superior a 2 nM, 1,8 nM, 1,5 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM o 0,4 nM.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a LT β R (p. ej., LT β R de ratón) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-75, 77-85 y sec. con núms. de ident.: 89-93.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen a LT β R de ratón con un valor de EC50 no más de 300 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 80 ng/ml, 60 ng/ml, 50 ng/ml, 40 ng/ml o 30 ng/ml. En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen a LT β R de ratón con un valor de EC50 no más de 3 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM o 0,4 nM.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión al HVEM (p. ej., HVEM humano) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 12-75, 77-85 y las sec. con núms. de ident.: 89-93.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen al HVEM humano con un valor de EC50 no más de 200 ng/ml, 150 ng/ml, 100 ng/ml, 80 ng/ml, 70 ng/ml, 60 ng/ml, 50 ng/ml o 40 ng/ml. En algunas modalidades, las muteínas LIGHT se unen al HVEM humano con un valor de EC50 no más de 10 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM,
 5 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, o 0,5 nM.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT no se unen al HVEM humano o sustancialmente no se unen al HVEM humano. En algunas modalidades, la muteína LIGHT de no unión a HVEM (p. ej., HVEM humano) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-11.
 10 En algunas modalidades, la muteína LIGHT de unión a HVEM (p. ej., HVEM de ratón) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 3-52.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT de no unión a HVEM (p. ej., HVEM de ratón) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las
 15 sec. con núms. de ident.: 1-2.

En algunas modalidades, la muteína LIGHT con afinidad reducida a DcR3 (p. ej., DcR3 humano) incluye una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1-2, 52, 58, 61 y 89-93.

En algunas modalidades, las muteínas LIGHT no se unen a DcR3 humano o sustancialmente no se unen a DcR3 humano. En algunas modalidades, las muteínas
 20 LIGHT se unen a DcR3 humano con un valor de EC50 superior a 0,1 nM, 0,2 nM, 0,3 nM o 0,5 nM.

Mejora de la afinidad a los beneficios de LT β R o HVEM para mejorar la eficacia de las muteínas LIGHT al prevenir, tratar o diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección
 25 relacionada con LIGHT. La afinidad reducida a DcR3 ayuda a minimizar la toxicidad causada por la interacción LIGHT- DcR3.

Las muteínas LIGHT proporcionadas en la presente descripción optimizan la eficacia mientras que minimizan la toxicidad potencial.

Polinucleótido aislado

Dentro de la presente descripción se engloba un polinucleótido aislado que codifica las muteínas LIGHT descritas anteriormente. Los aspectos de la presente descripción
5 incluyen variantes de polinucleótido (p. ej., debido a la degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la presente.

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente, pueden obtenerse por “retrotraducción” a partir de las secuencias de aminoácidos. El conocido procedimiento de reacción en cadena de la
10 polimerasa (PCR, en inglés) puede emplearse para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica muteínas LIGHT.

El polinucleótido aislado incluye ADN y ARN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como las secuencias complementarias correspondientes. Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico que se ha separado de las secuencias
15 genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del que se aisló el ácido nucleico, en el caso de los ácidos nucleicos aislados de fuentes de origen natural. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente a partir de una plantilla o químicamente, tales como productos de PCR, moléculas de ADNc, u oligonucleótidos por ejemplo, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de
20 tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico más grande. La molécula de ácido nucleico se ha derivado preferentemente de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o
25 concentración que permita la identificación, manipulación, y recuperación de sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos bioquímicos estándar (tales como los descritos en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la degeneración del código genético, cada muteína LIGHT está codificada por un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, cada uno de los cuales está dentro del alcance de la descripción y puede hacerse usando técnicas estándar. Por lo tanto, habiendo
5 identificado una secuencia de aminoácidos particular, los expertos en la técnica podrían elaborar cualquier número de ácidos nucleicos diferentes, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de una manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

10 Vectores aislados

La descripción también proporciona un vector aislado que incluye el polinucleótido descrito anteriormente, el vector aislado actúa como un sistema de expresión en forma de plásmidos, un fagémido, un fago, un baculovirus, un cósmido o un cromosoma artificial, cartuchos de transcripción o expresión que comprenden al menos un
15 polinucleótido como anteriormente.

En algunas modalidades, el vector aislado también contiene secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias nucleotídicas exógenas, tales como un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación
20 transcripcional, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción polipeptídica, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. La secuencia para el
25 mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias nucleotídicas exógenas podría obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica.

El vector aislado construido puede insertarse en una célula huésped adecuada para amplificación y/o expresión polipeptídica. La transformación de un vector de expresión en una célula huésped seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos que incluyen transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrana, u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que se usará. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 2001, supra.

10

Células huésped

Una célula huésped que contiene el vector aislado proporcionado en la presente descripción puede ser eucariótica o procariótica.

En algunas modalidades, la célula huésped es una línea celular de mamífero. Las líneas celulares de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) y cualquier línea celular usada en un sistema de expresión conocido en la técnica puede usarse para hacer las muteínas LIGHT de la descripción.

Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos adecuadas incluyen la línea COS-7 de células renales de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios libres de suero (Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31), células HeLa, células renales embrionarias humanas tales como 293, 293 EBNA o MSR 293.

25

Composiciones farmacéuticas

La descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de muteína LIGHT junto con un portador farmacéuticamente

aceptable tal como, un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante, y/o adyuvante farmacéuticamente efectivo. Las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen, pero no se limitan a, composiciones líquidas, congeladas, y liofilizadas.

- 5 Preferentemente, el portador farmacéuticamente aceptable, que actúa como un material de formulación, no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, el formato de suministro y la dosificación deseada.

- 10 En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse para suministro parenteral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del experto en la técnica.

- En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o
- 15 lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tal como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); reguladores (tal como borato, bicarbonato, Tris-HCl, cítricos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); contraiones formadores de sal (tales como sodio);
- 20 conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno). El portador farmacéuticamente aceptable mejora la efectividad de la composición farmacéutica y maximiza el período de validez de la composición farmacéutica.

25 Uso de la muteína LIGHT

La descripción proporciona un uso de la muteína LIGHT, el polinucleótido aislado, el vector aislado, la célula huésped o la composición farmacéutica en la elaboración de

un agente terapéutico (p. ej., fármaco) para diagnosticar, prevenir, o tratar una enfermedad, trastorno, o afección.

Como se usa en la presente descripción, el término “tratar” de cualquier enfermedad se refiere a aliviar o mejorar la enfermedad, trastorno, o afección (es decir, ralentizar o detener el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta); o aliviar o mejorar al menos un parámetro físico o biomarcador asociado a la enfermedad, que incluye aquellos que puedan no ser perceptible para el paciente. Para el cáncer, “que trata” puede referirse a amortiguar o ralentizar el crecimiento tumoral o de células malignas, proliferación o metástasis, o alguna combinación de estos. Para los tumores, el “tratamiento” incluye la extirpación de todo o parte del tumor, inhibir o ralentizar el crecimiento tumoral y la metástasis, retrasar el desarrollo de un tumor, o alguna combinación de estos.

Como se usa en la presente descripción, el término “prevenir” de cualquier enfermedad se refiere al tratamiento profiláctico de la enfermedad; o retrasar la aparición o progresión de la enfermedad, trastorno, o afección.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para diagnosticar, prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto que lo necesita, que incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la muteína LIGHT, el polinucleótido aislado, el vector aislado, la célula huésped, o la composición farmacéutica descrita anteriormente.

La cantidad terapéuticamente efectiva de la muteína LIGHT o la composición farmacéutica que contiene la muteína LIGHT, que se empleará dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la cual se está usando la muteína LIGHT, la vía de administración, y el tamaño (peso del cuerpo, superficie del cuerpo o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. En

ciertas modalidades, el médico puede ajustar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

El tema se refiere a mamíferos, primates (p. ej., humanos, macho o hembra), perros, conejos, conejillos de indias, cerdos, ratas y ratones. En ciertas modalidades, el sujeto
5 es un primate. Aún en otras modalidades, el paciente es humano.

En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno, o afección podría estar relacionado con LIGHT, tal como, cáncer. En algunas modalidades, al menos una célula en tumores o microentorno tumoral expresa receptores LIGHT, p. ej., LT β R, HVEM.

10 Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de la presente solicitud descrita en la presente son obvias y pueden hacerse usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la descripción o de las modalidades descritas en la presente.

15 Ejemplos

Los siguientes ejemplos, tanto reales como proféticos, se proporcionan con el propósito de ilustrar modalidades o características específicas de la presente invención y no pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1: diseño y construcción de genotecas de fagos

20 El fagémido pComb3XSS (núm. VPT4013, Creative Biogene) se diseñó genéticamente para mostrar la proteína LIGHT humana (87-240) en las superficies de las partículas del fago M13. La secuencia original que codifica TrxA del vector pComb3XSS se reemplazó por el marco de lectura abierto que codifica LIGHT humana
25 (87-240), un enlazador (G₄S)₃ y el péptido GCN₄. El conjunto de LIGHT como homotrímeros se estabilizó mediante el péptido GCN₄ en la superficie del fago. El constructo modificado sirve como un molde para la construcción de la genoteca.

Se construyeron tres genotecas, denominadas Genoteca-1, Genoteca-2 y Genoteca-3 (Tabla-1). La Genoteca-1 se generó usando el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph II (núm. 200550, Agilent) siguiendo el protocolo del fabricante. El fragmento de ADN que codifica LIGHT humana (87-240) se sometió a tres rondas

5 de PCR propensa a errores usando la polimerasa de ADN de Mutazyme II. Los productos de PCR resultantes se extrajeron en gel, se purificaron y se clonaron en el vector de fago. La Genoteca-2 y la Genoteca-3 se construyeron por separado usando oligonucleótidos mutagénicos, diseñados para introducir diversidades en residuos específicos (Q117, G150, S160, T161, P171, E175, L220, D221, E222,

10 L227) (Tabla-1). Se sintetizaron cebadores degenerados con una mezcla de bases (70-10-10-10) que favorecen secuencias silvestres (Genewiz, China). Los productos de PCR resultantes se insertaron en el vector de visualización de fagos pComb3XSS, y las reacciones se transformaron en la célula XL1-Blue (núm. DL1030, Weidi Bio, China).

15 Las células *E. coli* XL1-Blue que albergaban a los fagémidos se infectaron adicionalmente con fagos de ayuda M13KO7 (New England Biolabs, N0315SVIAL) y se incubaron durante la noche a 30 °C en el medio 2YT complementado con 50 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina. Los fagos se precipitaron del medio de cultivo usando 20 % de PEG y 2,5 M de NaCl y posteriormente se volvieron a suspender en 0,5 ml de PBS

20 complementado con 20 % de glicerol. Se determinó la concentración de fagos usando la siguiente fórmula: concentración de fagos = $(OD_{269} - OD_{320}) \times 5 \times 10^{12}$ cfu/ml (cfu: unidad formadora de colonias).

Tabla-1. Diseño de genotecas de fagos.

Genoteca núm.	Método de construcción	Sitios de mutación de LIGHT humana* (sec. con núm. de ident.:87)
Genoteca-1	PCR propensa a errores	-
Genoteca-2	Aleatorización suave	Q117, P171, E175, L227
Genoteca-3	Aleatorización suave	G150, S160, T161, L220, D221, E222

* En donde las posiciones se definen con referencia a la sec. con núm. de ident.: 87, y la posición del primer aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 87 se define como la posición 74.

5 Ejemplo 2: selección de fagos y análisis ELISA

Se implementaron dos estrategias de selección usando genotecas de fagos. A) El objetivo fue obtener mutantes capaces de unirse a HVEM y LT β R. La selección secuencial de fagos se realizó usando hHVEM, mHVEM, hLT β R y mLT β R como
 10 dianas. B) El objetivo fue identificar muteínas que mantenían la unión de LT β R mientras reducían la unión a HVEM. Para las tres primeras rondas de selección, hLT β R y mLT β R se usaron como dianas. En la cuarta ronda se usaron los fagos no unidos a las placas recubiertas con HVEM humano y de ratón en la subsiguiente selección positiva usando hLT β R y mLT β R.
 15 Para reducir la unión a DcR3, las partículas de fago de las estrategias A y B se sometieron a una ronda extra de selección negativa con placas recubiertas con proteína DcR3 humana.

Selección de fagos

20 Las proteínas HVEM y LT β R, que comprenden el dominio extracelular fusionado con un fragmento Fc en C-terminal, se obtuvieron de SinoBiological (núm. 10567-M03S), Novoprotein (núm. CX78) y Acrobiosystems (núm. HVM -H5258 y núm. LTR -H5251). La proteína DcR3 recombinante se generó mediante la unión de los residuos 33-300 de DcR3 humano a N-terminal de la Fc de conejo. Las proteínas recombinantes se
 25 expresaron en células expi293F (A14527, ThermoFisher) y se purificaron por afinidad usando resinas de proteína A, como se describió previamente.

Para analizar los mutantes deseados, se recubrieron inmunoplaacas de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con antígenos (5 μ g/ml) enumerados en la Tabla 2-1 y la Tabla 2-2. A la mañana siguiente, las placas se bloquearon con 2 % de ASB

(albúmina de suero bovino, Sangon Biotech China) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron soluciones de fagos (1×10^{11} fagos) a las inmunoplacas recubiertas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBST (PBS, 0,5 % Tween 20) y cinco veces con PBS. Los fagos unidos se eluyeron mediante la adicción de 50 μ l/pocillo de 100 mM de glicina (pH 2,2) durante 5 minutos. El eluyente se transfirió a un nuevo tubo y se neutralizó mediante la adicción de 1/10 volumen de 1M regulador Tris (pH 8,5). Los fagos eluidos se amplificaron en *E. coli* XL1-Blue y se usaron para rondas de selección adicionales.

10 Tabla 2-1. Estrategia de selección de fagos A y las proteínas diana en las diferentes rondas.

Rondas	Proteínas diana en la estrategia A
Primera ronda	LT β R de ratón
Segunda ronda	HVEM de ratón
Tercera ronda	LT β R humano
Cuarta ronda	HVEM humana

15 Tabla 2-2. Estrategia de selección de fagos B y las proteínas diana en las diferentes rondas.

Rondas	Proteínas diana en la estrategia B
Primera ronda	LT β R de ratón
Segunda ronda	LT β R de ratón
Tercera ronda	LT β R humano
Cuarta ronda	Depleción de HVEM + LT β R humano

ELISA de fagos

Los clones individuales de la cuarta ronda de selección se cultivaron en bloques de 96 pocillos profundos en 100 μ l de caldo 2YT complementado con 50 μ g/ml de ampicilina a

37 °C y 220 rpm durante 5 horas. Después, se añadieron 5 µl de fagos colaboradores a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos, las células se volvieron a suspender y crecieron durante la noche en 150 µl/pocillo de caldo 2YT complementado con 50 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina. Al día siguiente, el sobrenadante se recogió por centrifugación a 3000 rpm a 4 °C durante 20 minutos y se usó para el ensayo ELISA para analizar muteínas LIGHT exhibidas en fagos que se unían a antígenos pero no a ASB.

Para el análisis ELISA, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con proteínas diana (1 µg/ml en PBS) a 4 °C durante la noche y después se bloquearon con 2 % de ASB durante 2 horas a temperatura ambiente. El sobrenadante que contenía partículas de fago se añadió a las placas y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron cinco veces con PBST. Se añadió a los pocillos anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante) (Sino Biological, China) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de otra ronda de lavado cinco veces con PBST, se añadió 50 µl de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina, núm. 34029, ThermoFisher) a cada pocillo. Después de 5 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución quelante (núm. C1058, Solarbio, China). La absorbancia a 450 nM (OD₄₅₀) se midió usando un lector de placas (SpectraMax M5, Molecule Devices). Los pocillos recubiertos con ASB se usaron como controles negativos. Los clones de fagos con una relación de puntuación ELISA (diana/ASB) > 3 se consideraron clones positivos.

Ejemplo 3: Análisis de secuencia de clones positivos

Se extrajeron fagémidos de las células XL1-Blue que produjeron clones de fagos positivos (BioSune, China) y se secuenciaron. Se identificaron un total de 52 secuencias únicas (sec. con núms. de ident.: 1-52, Tabla 3) con 1-5 mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia LIGHT humana silvestre (sec. con núm. de ident.: 87). Entre estas secuencias, 11 mutantes se derivaron del grupo de depleción de HVEM, y se

encontró que no se unían a la proteína HVEM. Los mutantes restantes exhibieron reactividad cruzada a los receptores HVEM y LT β R humano y de ratón (Tabla 3).

Ejemplo 4: Secuenciación NGS y diseño mutante de LIGHT mediante el aprendizaje automático

5

Para una mayor mejora de la afinidad mediante secuenciación profunda, se aislaron fagémidos de los fagos capaces de unirse a proteínas diana, así como aquellos que exhibían unión inespecífica a ASB. Entonces, el segmento de la proteína LIGHT fue amplificado por PCR y purificado (DC301, Vazyme, China). Los amplicones se prepararon usando el kit de preparación de genoteca universal de ADN VATHS (Vazyme núm. ND607-01), siguiendo el protocolo estándar de preparación de genotecas. Las genotecas ligadas al adaptador se sometieron a un único ciclo de PCR y posteriormente se secuenciaron en el sistema Illumina Miseq usando lecturas de 300 pb de extremos emparejados para cubrir toda la longitud de los amplicones. Los resultados de secuenciación se usaron para predecir clones de alta afinidad a los receptores comparando la frecuencia de una mutación dada en una posición específica en las muestras enriquecidas contra controles negativos. Se expresaron y caracterizaron adicionalmente un total de 33 mutantes de LIGHT que contenían 3-7 sitios de mutación (Tabla 3) (sec. con núms. de ident.: 53-85). Las mutaciones de aminoácidos y posiciones de todas las muteínas LIGHT (sec. con núms. de ident.: 1-85 y 89-93) se resumen en la Tabla 4 (ver las Figuras 4 y 5). Las muteínas LIGHT, LIGHT86-89 (sec. con núms. de ident.: 89-93), se identificaron mediante la selección de fagos de depleción de DcR3.

20

Tabla 3. Muteínas LIGHT de la selección de fagos y aprendizaje automático

25

NOMBRE	SEC. CON NÚM. DE IDENT.	RESULTADOS ELISA DE FAGOS	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS (código de una única letra)	
--------	-------------------------	---------------------------	--	--

			Los aminoácidos mutados de las muteínas LIGHT están en negrita y cursiva.	
LIGHT (1-240)	86	N.A	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGR SHRRQSCSVARVGLGLLLLMGAGL AVQGWFLQLHWRLGEMVTRLPDGP AGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGA NSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLS YHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVG CPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELL VSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLG GVVHLEAGEKVVVRVLDERLVRLRD GTRSYFGAFMV	
LIGHT (74-240)	87	mLTβR+/-, hLTβR+/-, mHVEM+/-, hHVEM+/-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	
LIGHT (87-240)	88	N.A,	RRSHEVNPA AHLTGANSSLTGSGG PLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALV TKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGLAS TITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSP CGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLE AGEKVVVRVLDERLVRLRDGTRSYF GAFMV	
LIGHT-1	1	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM- hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGG M GCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD RLVRL L DGTRSYFGAFMV	V152M W198Q R228L
LIGHT-2	2	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM- hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPC S ATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD RLVRL L DGTRSYFGAFMV	R189S W198Q R228L
LIGHT-3	3	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+ hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL A GVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	G150A L220S
LIGHT-4	4	mLTβR+, hLTβR+,	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV	V152M T161P R228L

		mHVEM+, hHVEM-	QLGG M GCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD ERLVR L DGTRSYFGAFMV	
LIGHT-5	5	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPC S ATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD RLVR L DGTRSYFGAFMV	T161P R189S W198Q R228L
LIGHT-6	6	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV NG ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	W198Q L220N D221G
LIGHT-7	7	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGC R LGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV Q D ERLVR L RDG T H S YFGAFMV	P155R L220Q R232H
LIGHT-8	8	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL S GVGCPLGLAG T ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	G150S S160G L220S
LIGHT-9	9	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL S GVGCPLGLAS G ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	G150S T161G L220S
LIGHT-10	10	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL S GVGCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	G150S T161P L220S
LIGHT-11	11	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM-	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL S GVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW	G150S L220S

			WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	
LIGHT-12	12	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGAN N SLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLG Q ASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGE E VVVVRVLD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	L158Q K214E
LIGHT-13	13	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGAN S PLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPL S LASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVV Y LEAGEKVVVRV R D ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	S104P G157S H208Y L220R
LIGHT-14	14	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLW E SQGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLG Q ASTITHG M YKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVLD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	L158Q L166M
LIGHT-15	15	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET E LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YP K ELELLVSQQSPCGRATSSSRV WWDSSFLGGVVHLEAGE E VVVVRVL DERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117E E175K K214E L227T
LIGHT-16	16	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET H LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLG M ASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAG D KVVVRVLD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	Q117H L158M E213D
LIGHT-17	17	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET N LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVV Y LEAGEKVVVRVLDE RLVRLRDGTRSYFGAFMV	H208Y Q117N
LIGHT-18	18	mLT β R+, hLT β R+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALV I TKAGYYYIYSKVQ LGGVGCPLG Q ASTITHGLYKRTPRY PEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGE E VVVVRVLD K RRLVRLRDGTRSYFGAFMV	L158Q K214E E222K

LIGHT-19	19	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVV SK AGYYYIYSKV QLGGVGC P PGLAGTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV MD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	L156P S160G L220M
LIGHT-20	20	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA A TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD D RLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160A L220S E222D
LIGHT-21	21	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G PITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV TD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G T161P L220T
LIGHT-22	22	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G SITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G T161S L220S
LIGHT-23	23	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G L220S
LIGHT-24	24	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGR T TSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G A190T L220S
LIGHT-25	25	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVT K AGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA H TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160H L220S

LIGHT-26	26	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA H TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD Q RLVRLRDGTRSYFGAFMV	S160H L220S E222Q
LIGHT-27	27	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA N SITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD D RLVRLRDGTRSYFGAFMV	S160N T161S L220S E222D
LIGHT-28	28	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA N TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGE E VVVRVLD ERLVR M RDGTRSYFGAFMV	S160N K214E L227M
LIGHT-29	29	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA N TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	S160N L220S
LIGHT-30	30	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA R NITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	S160R T161N L220S
LIGHT-31	31	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA R SITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	S160R T161S L220S
LIGHT-32	32	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA R TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR L RDGTRSYFGAFMV	S160R L220S
LIGHT-33	33	mLTβR+, hLTβR+,	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF	T161P L220S

		mHVEM+, hHVEM+	LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	
LIGHT-34	34	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS S ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	T161S L220S
LIGHT-35	35	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS S ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD N RLVRLRDGTRSYFGAFMV	T161S L220S E222N
LIGHT-36	36	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS T ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVV Y LEAGEKVVVRV LDE RLVRLRDGTRSYFGAFMV	H208Y
LIGHT-37	37	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS T ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQQSPCGR T TSSSRVW WDSS Y LGGVVHLEAGE E VVVRLD ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	A190T F202Y K214E
LIGHT-38	38	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS T ITHGLYKRTPR YPEELELLVSQ R SPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV LDE RLVRLRDGTRSYFGAFMV	Q184R W198Q
LIGHT-39	39	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGCPLG P ASTITHG M YKRTPR YPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV MD ERLVRLRDGTRSYFGAFMV	L158P L166M L220M
LIGHT-40	40	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKV QLGGVGC P GLASTITHGLYKRTPR	L156P H208Y

			YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVYLEAGEKVVVRVLDE RLVRLRDGTRSYFGAFMV	
LIGHT-41	41	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLGLAG T ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	G150R S160G L220S
LIGHT-42	42	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	G150R L220S
LIGHT-43	43	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLGLA T ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	G150R S160T L220S
LIGHT-44	44	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLG P ASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	G150R L158P L220S
LIGHT-45	45	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL S GVGCPLGLA P SITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD E HLVRRLRDGTRSYFGAFMV	G150S S160P T161S L220S R223H
LIGHT-46	46	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRG M SYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGE E VVVRVLD ERLVRRLRDGTRSYFGAFMV	L126M K214E
LIGHT-47	47	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRG M SYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGR V TSSSRVW	L126M A190V H208Y

			WDSSFLGGVVYLEAGEKVVVRVLDE RLVRLRDGTRSYFGAFMV	
LIGHT-48	48	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLG PAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV RD ERLVRRLDGTRSYFGAFMV	L120P L220R
LIGHT-49	49	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSS PT GSGGPLLWET RL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV QD ERLVRRLDGTRSYFGAFMV	L105P Q117R L220Q
LIGHT-50	50	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGA R SSLTGSGGPLLWETQLG QAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVV R LEAGE E VVVRVLD ERLVRRLDGTRSYFGAFMV	N102R L120Q H208R K214E
LIGHT-51	51	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTG D NSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA N TITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRRLDGTRSYFGAFMV	A101D S160N L220S
LIGHT-52	52	mLTβR+, hLTβR+, mHVEM+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVRRLDGTRSYFGAFMV	L220S
LIGHT-53	53	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET N LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N L220S L227T
LIGHT-54	54	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET E LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117E L220S L227T

LIGHT-55	55	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET N LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV T D ERLVR T RDGTRSYPFGAFMV	Q117N L220T L227T
LIGHT-56	56	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET E LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV T D ERLVR T RDGTRSYPFGAFMV	Q117E L220T L227T
LIGHT-57	57	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET Q LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPFGAFMV	L220S L227T
LIGHT-58	58	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET Q LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G GITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR L RDGTRSYPFGAFMV	S160G T161G L220S
LIGHT-59	59	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET Q LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G PITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR L RDGTRSYPFGAFMV	S160G T161P L220S
LIGHT-60	60	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET Q LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G GITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D S RLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G T161G L220S E222S
LIGHT-61	61	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET Q LGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLA G PITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D S RLVRLRDGTRSYPFGAFMV	S160G T161P L220S E222S

LIGHT-62	62	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV T D ERLVR L RDGTRSYPGAFMV	S160G T161G L220T
LIGHT-63	63	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	T161G L220S L227T
LIGHT-64	64	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	T161P L220S L227T
LIGHT-65	65	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG T ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	S160G L220S L227T
LIGHT-66	66	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG T ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV T D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	S160G L220T L227T
LIGHT-67	67	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS S ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	T161S L220S L227T
LIGHT-68	68	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S D ERLVR T RDGTRSYPGAFMV	S160G T161G L220S L227T

LIGHT-69	69	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	S160G T161P L220S L227T
LIGHT-70	70	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N T161G L220S L227T
LIGHT-71	71	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N T161P L220S L227T
LIGHT-72	72	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG T ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N S160G L220S L227T
LIGHT-73	73	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAS G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117E T161G L220S L227T
LIGHT-74	74	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N S160G T161G L220S L227T
LIGHT-75	75	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVSD ERLVR T RDGTRSYFGAFMV	Q117N S160G T161P L220S L227T

LIGHT-77	77	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117E S160G T161P L220S L227T
LIGHT-78	78	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG S ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117N S160G T161S L220S L227T
LIGHT-79	79	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG S ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117E S160G T161S L220S L227T
LIGHT-80	80	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117N S160G T161G L220S E222S L227T
LIGHT-81	81	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117N S160G T161P L220S E222S L227T
LIGHT-82	82	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117E S160G T161G L220S E222S L227T
LIGHT-83	83	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG P ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR TR DGTRSYFGAFMV	Q117E S160G T161P L220S E222S L227T

LIGHT-84	84	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET ML GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG S ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR T RDGTRSYPFGAFMV	S160G T161S L220S E222S L227T
LIGHT-85	85	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET EL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG S ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD S RLVR T RDGTRSYPFGAFMV	Q117E S160G T161S L220S E222S L227T
LIGHT-86	89	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET QL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLGLA RT ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SD ERLVR L RDGTRSYPFGAFMV	G150R S160R L220S
LIGHT-87	90	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET QL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QL R GVGCPLGLA RT ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV SDE RLVR L DGTRSYPFGAFMV	G150R S160R W198Q L220S R228L
LIGHT-88	91	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVN P TAHL TGANSSLTGSGGPLLWET QL GLAFL RGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV Q L RGVGCPLGLA RT ITHGLYKRTPR YL EELELLVSQQSPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV S DER LVRL L DGTRSYPFGAFMV	A95T G150R S160R P174L W198Q L220S R228L
LIGHT-89	92	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVN P TAHL TGANSSLTGSGGPLLWET QL GLAFL RGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV Q L RGVGCPLGLA RT ITHGLYKRTPR YL EELELLVSQQSPCGRATSSSRVW Q DSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV L DER LVRL L DGTRSYPFGAFMV	G150R S160R P174L W198Q R228L
LIGHT-90	93	mLTβR+, hLTβR+, hHVEM+	DGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAH LTGANSSLTGSGGPLLWET QL GLAF LRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKV QLGGVGCPLGLAG G ITHGLYKRTPR YPEEELELLVSQQSPCGRATSSSRVW WDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRV TD S RLVR L RDGTRSYPFGAFMV	S160G T161G L220T E222S

+: unión fuerte; -: no unión; +/-: unión débil; N.A: no disponible/sin datos

Tabla 4. Mutaciones de aminoácidos y las posiciones a mutar

POSICIÓN	WT	MUTANTE	POSICIÓN	WT	MUTANTE
101	A	D	166	L	M
102	N	R	175	E	K
103	S	N	184	Q	R
104	S	P	189	R	S
105	L	P	190	A	T, V
116	T	S	198	W	Q
117	Q	E, N, H, R	202	F	Y
120	L	P, Q	208	H	Y, R
126	L	M	213	E	D
135	V	I	214	K	E
136	T	S	220	L	S, T, M, R, Q, N
150	G	A, S, R,	221	D	G
152	V	M	222	E	S, K, D, Q, N
156	L	P	223	R	H
158	L	M, Q, P,	227	L	T, M
160	S	T, N, G, H, R, A	228	R	L
161	T	S, N, G, P	232	R	H
95	A	T	174	P	L
155	P	R	157	G	S

Ejemplo 5: Expresión y purificación de muteínas LIGHT

5

10

Los fragmentos de ADN de mutantes de LIGHT humano fueron sintetizados por Genewiz y clonados en el vector pCI (E1731, Promega) con una etiqueta His en N-terminal. Los constructos se transfectaron en células Expi293F (A14527, ThermoFisher) y se cultivaron en cultivo en suspensión durante aproximadamente cinco días. El sobrenadante se cosechó por centrifugación a 7000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Posteriormente, el sobrenadante filtrado se incubó con perlas magnéticas de níquel-NTA (Ni Smart

Beads 6FF, Smart-Lifesciences, China) durante 1 hora. Después de lavar con 10 CV (volumen de columna) de PBS, las muteínas LIGHT se eluyeron usando PBS que contenía 300 mM de imidazol y 0,3 M de NaCl. Finalmente, la proteína eluida se dializó con PBS (pH 6,5) y 5 % de glicerol.

5 Ejemplo 6: Afinidades de las muteínas LIGHT con HVEM y LT β R

Las placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos (Thermofisher) se recubrieron con proteínas diana (1 μ g/ml), y después se bloquearon con 2 % de regulador ASB-PBS durante una hora. Se añadieron diluciones en serie de las muteínas LIGHT con una
10 concentración máxima de 200 ng/ml. Las placas se incubaron durante una hora, se lavaron cuatro veces con PBST, y después se incubaron con anticuerpo anti-etiqueta His de ratón (núm. 105327, Sino Biological) durante 1 hora. Las placas se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (núm. SSA006, Sino Biological) antes de ser lavadas tres veces con PBST y tratadas
15 con sustrato TMB (núm. 34029, ThermoFisher). Las placas se leyeron a 450 nM en un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecule Devices). Los resultados de ELISA se analizaron usando el software GraphPad Prism 9.0 y las EC50 (concentración efectiva media máxima) se resumieron en la Tabla 5-1 y la Tabla 5-2.

20 Tabla 5-1. Resultados de EC50 calculados de las muteínas LIGHT.

	EC50 (ng/ml)		
Nombre	LT β R humano	LT β R de ratón	HVEM humana
LIGHT (74-240) (wt)	220,3	débil (la EC50 es demasiado baja para ajustarse con precisión)	débil (la EC50 es demasiado baja para ajustarse con precisión)
LIGHT-1	49,31	60,5	-
LIGHT-2	76,2	débil (similar a wt)	-
LIGHT-3	43,64	40,06	-

LIGHT-5	53,81	débil (similar a wt)	-
LIGHT-9	28,21	22,37	-
LIGHT-11	39,49	23,33	-
LIGHT-15	74,83	139,4 (similar a wt)	59,73
LIGHT-17	80,48	44,16	51,09
LIGHT-21	71,46	134,1	42,19
LIGHT-22	68,59	62,45	47,07
LIGHT-29	45,21	20,94	42,77
LIGHT-37	43,38	67,83	37,02
LIGHT-46	67,47	Débil (similar a wt)	97,82
LIGHT-52	57,73	27,87	19,01
LIGHT-7	109,4	156,3	-
LIGHT-10	44,07	80,35	46,7
LIGHT-23	89,16	91,6	58,8
LIGHT-26	72,67	48,3	48,4
LIGHT-28	81,1	256,2 (similar a wt)	87,3
LIGHT-31	86,65	74,71	51
LIGHT-32	247,4 (similar a wt)	63,18	Débil (similar a wt)
LIGHT-39	54,18	23,94	49
LIGHT-47	228,3 (similar a wt)	70,58	Débil (similar a wt)
LIGHT-48	755,8 (similar a wt)	419,9 débil (similar a wt)	Débil (similar a wt)
LIGHT-14	débil (similar a wt)	24,92	30,0
LIGHT-16	160 (similar a wt)	débil (similar a wt)	73,8
LIGHT-18	89,41	41,28	44,7
LIGHT-19	débil (similar a wt)	468,2 (similar a wt)	68,1
LIGHT-20	52,14	débil (similar a wt)	49,6
LIGHT-24	débil (similar a wt)	débil (similar a wt)	63,2
LIGHT-25	débil (similar a wt)	32,27	54,2
LIGHT-27	82,71	64,19	50,4
LIGHT-30	-	-	156,7
LIGHT-33	61,15	débil (similar a wt)	25,6
LIGHT-34	58,99	44,64	20,2
LIGHT-35	70,32	38,3	41,6
LIGHT-36	190,1 (similar a wt)	270,3 débil (similar a wt)	136,7
LIGHT-40	95,9	débil (similar a wt)	50,3

LIGHT-41	108,5	31,05	-
LIGHT-42	63,86	24,99	81,4
LIGHT-45	36,19	26,44	-
wt significa LIGHT silvestre (74-240) que se muestra en la sec. con núm. de ident.: 87 “-” significa que no se detectó unión por ELISA de fagos			

La mayoría de las muteínas LIGHT mostraron mayor afinidad a los LT β R (tanto humanos como de ratón) que a LIGHT humano silvestre (74-240). Algunas muteínas LIGHT, tales como LIGHT-1, LIGHT-3, LIGHT-9 y LIGHT-11, tenían una afinidad reducida al HVEM humano en comparación con el silvestre (Figuras 1-3, Figuras 6-8 y Figura 10).

Además de HVEM y LT β R, LIGHT también interactúa con un receptor señuelo, DcR3, que carece de los segmentos transmembrana y citoplásmico. Esta interacción tiene el potencial de interrumpir las vías de señalización al secuestrar LIGHT alejándolo de HVEM y LT β R. Si bien la expresión de DcR3 es típicamente baja en tejidos humanos sanos, frecuentemente está significativamente regulada positivamente en pacientes con cáncer (Wu et al., 2003; Yoo et al., 2022).

Para probar si las muteínas pueden unirse a DcR3, se generó la proteína DcR3 recombinante al unir los residuos 33-300 de DcR3 humano al extremo N-terminal de la Fc de conejo. Las proteínas recombinantes se expresaron en Expi293F y se purificaron por afinidad usando perlas de proteína A, como se describió previamente. Las proteínas DcR3 humanas se inmovilizaron sobre placas ELISA de 96 pocillos MaxiSorp (Thermo Fisher) a una concentración de 0,5 μ g/ml y después se bloquearon con 2 % de regulador ASB-PBS durante una hora. Las variantes LIGHT se añadieron a las placas a diversas diluciones, con una concentración máxima de 10 nM. Las placas se incubaron durante una hora, se lavaron cuatro veces con PBST, y después se incubaron con anticuerpo anti-etiqueta His de ratón (núm. 105327, Sino Biological) durante 1 hora. Las placas se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario de cabra antirratón conjugado con HRP (núm. SSA006, Sino Biological) antes de ser lavadas tres veces con PBST y

tratadas con sustrato TMB (núm. 34029, ThermoFisher). Las placas se leyeron a 450 nM en un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecule Devices). Los resultados de ELISA se analizaron usando el software GraphPad Prism 9.0 y las EC50 (concentración efectiva media máxima) se resumieron en la Tabla 5-2.

5 Tabla 5-2. EC50 (nM) para la unión de LIGHT a LT β R, HVEM y DcR3 humano.

Nombre	LT β R humano	LT β R de ratón	HVEM humana	DcR3 humano
LIGHT-1	0,2616	0,8003	N.D.	N.D.
LIGHT-2	0,3282	2,055	N.D.	N.D.
LIGHT-58	0,3094	0,2727	0,4316	0,1839
LIGHT-60	0,9191	0,6303	0,639	0,3107
LIGHT-61	0,4817	0,4981	0,4598	0,2135
LIGHT (74-240) (wt)	0,3646	0,8854	0,992	0,2469
LIGHT-52	0,3304	2,071	0,5991	0,1904
LIGHT-86	0,3355	0,3266	5,273	25,87
LIGHT-87	0,4132	0,3148	6,683	N.D.
LIGHT-88	0,2641	0,2624	N.D.	N.D.
LIGHT-89	0,625	0,503	N.D.	N.D.
LIGHT-90	1,776	0,978	2,119	0,6924

Como se muestra en la Tabla 5-2 y en la Figura 9, se había observado que se reducía la afinidad de LIGHT-1, LIGHT-2, LIGHT-86, LIGHT-87, LIGHT-88, LIGHT-89 hacia DcR3.

10 Ejemplo 7: Ensayo funcional

La línea celular reportera HeLa-NF- κ B se generó mediante la transfección de las células con el vector pNL3.2.NF- κ B-RE[NlucP/NF- κ B-RE/Hygro] (Promega núm. N1111) usando lipofectamina 3000. Después de tres días, las células se trataron con higromicina B (Sigma) y se cultivaron durante 14 días en 37 °C, 5 % de CO₂. Se usaron las células reporteras HeLa-NF- κ B resultantes para evaluar la señalización descendente de la activación de LT β R mediante el tratamiento de muteínas LIGHT.

Las células reporteras HeLa-NF- κ B se expusieron a diluciones en serie de muteínas LIGHT. Después de 24 horas, las células se lisaron (Promega núm. E397A) y se midió la actividad de luciferasa con un lector de microplacas SpectraMax M5 (Molecule Devices) usando Promega núm. E4500.

- 5 Como se muestra en la Figura 11, la actividad para estimular hLT β R de LIGHT90, LIGHT60 y LIGHT63 fue consistente con la afinidad de unión.

Si bien se han descrito modalidades particulares, pueden surgir alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y equivalentes sustanciales que son o pueden ser actualmente imprevistos para los solicitantes u otros expertos en la técnica. En

- 10 consecuencia, las reivindicaciones anexas como se presentan y como pueden ser modificadas tienen la intención de abarcar todas esas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras, y equivalentes sustanciales.