



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 972**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04754961 .3**  
96 Fecha de presentación : **09.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1639109**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Vectores de ADN.**

30 Prioridad: **09.06.2003 US 477232 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.08.2011**

73 Titular/es: **CORIXA CORPORATION  
CSC, The United States Corporation 2711  
Centerville Road  
Wilmington, Delaware 19808, US**

72 Inventor/es: **Spies, Gregory, A. y  
Misher, Lynda**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 363 972 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

Vectores de ADN.

**Antecedentes de la invención**

5 A pesar de la enorme inversión financiera y de recursos humanos, el cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte. Por ejemplo, los cánceres de mama, pulmón, colon, próstata, vejiga, y riñón, así como múltiples enfermedades malignas hematológicas (p. ej., leucemia mieloide aguda (LMA) en adultos y pediátrica leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia secundaria) producen más seis millones de muertes anuales (véase, p. ej., Wang y col., *Oncogene* 19:1519-1528 (2000)).

10 Los enfoques habituales para curar el cáncer se han centrado alrededor de una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia. Estos enfoques han tenido como resultado algunos éxitos espectaculares en determinadas enfermedades malignas. Sin embargo, el cáncer es a menudo incurable, cuando se diagnostica más allá de una fase determinada. Son necesarios enfoques terapéuticos alternativos.

15 Una característica frecuente de las enfermedades malignas es el crecimiento celular incontrolado. Las células cancerosas parecen sufrir un proceso de transformación desde el fenotipo normal a un fenotipo maligno capaz de crecer de forma autónoma. La amplificación y la sobreexpresión de genes de células somáticas (es decir, antígenos) se consideran acontecimientos primarios habituales que tienen como resultado la transformación de células normales en células malignas. Las características fenotípicas malignas codificadas por los genes oncogénicos se transmiten durante la división celular a la progenie de las células transformadas.

20 Recientemente se han identificado varios antígenos que se sobreexpresan en el cáncer (véase, p. ej., Loeb y col., *Cancer Res.* 61:921-92 (2001); Xu y col., *Cancer Res.* 51:1563-1568 (2001); Gaiger y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 946 (2002); Wang y col., *Oncogene* 19:1519-1528 (2000); Xu y col., *Intl. J. Mol. Med.* 8:S68 (2001); Wang y col., *Oncogene* 20:7699-709 (2001); Jager y col., *Cancer Res.* 61:2055-2061 (2001); Mhashilkar y col., *Mol. Med.* 7:271-282 (2001); Jiang y col., *Amer. J. Surg. Path.* 25:1397-1404 (2001); Fanger y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 574 (2000); Calhoun y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 437-438 (2000); Meagher y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 173 (2000); Xu y col., *Cancer Res.* 60:1677-1682 (2000); Wang y col., *Oncogene* 19:1519-1528 (2000); Villaret y col., *Laryngoscope* 110: de 68.374-381 (2000); Bangur y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 680 (2000); Henderson y col., *Immunol. Invest.* 29:87-91 (2000); Pyle y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 679 (2000); Mayo y col., *EMBO* 18 (14): 3990-4003 (1999)). Algunos de estos antígenos han sido identificados como oncogenes, es decir, genes operativos en células malignas y responsables de la transformación o asociados con ella, e incluyen, por ejemplo, el gen supresor de tumores de Wilms (WT1) y B726P, ambos sobreexpresados en tumores de mama; L523S, sobreexpresado en el carcinoma de pulmón de células escamosas, y P501 S sobreexpresado en tumores de próstata (véase, por ejemplo, Xu y col., *Cancer Res.* 61:1563-68, 2001)). Estos antígenos pueden usarse convenientemente para diagnóstico y tratamiento de cánceres. Por ejemplo, estos antígenos puede usarse convenientemente para generar respuestas inmunitarias específicas contra el cáncer. En particular, los polipéptidos de WT1 se han usado en vacunas basadas en proteínas (véase, por ejemplo, Gaiger y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 42:698 (2001)).

40 La inmunización con ácido nucleico (es decir, inmunización genética) es una tecnología prometedora que puede avanzar en la eficacia y seguridad de las vacunas (véase, por ejemplo, Cui y col., *J. Biotechnol.* 102(2): 105-115 (2003); Robinson y Torres, *Semin. Immunol.* 9:271 (1997); Robinson y col., *Int. J. Mol. Med.* 4:549 (1999); y Hartikka y col., *Hum. Gene Ther.* 7:1205-1217 (1996)). Hay varias ventajas bien caracterizadas de las vacunas de ácido nucleico en comparación con las vacunas basadas en proteínas o virus vivos atenuados. Un rasgo característico de la vacunación con ADN es la inducción de la actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) que es superior a la vacunación con proteínas. La inmunidad celular puede potenciarse debido a que la proteína codificada por el ácido nucleico es procesada y presentada en una forma que es análoga al procesamiento de antígenos virales (véase, por ejemplo, Corr y col., *J. Exp. Med.* 184:1555 (de 1996)). Además, los vectores basados en plásmidos son más fáciles de producir que las vacunas basadas en proteínas u organismos vivos enteros, y se consideran más seguras de usar. Finalmente, se espera que sea más fácil incorporar antígenos nuevos o alterados en vacunas de ADN.

50 La inmunidad protectora después la vacunación con ADN se ha demostrado en varios modelos de ratón (véase, p. ej., Wang y col., *Vaccine*; 21 (15): 1672-80 (2003); Manickan y col., *J. Immunol.* 155:259 (1995); Zinckgraf y col., *Vaccine* 21 (15):1640-9 (2003); Ott y col., *J Control Release* 79 (1-3):1-5 (2002); Fynan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11478 (1993)). Sin embargo, los informes de estudios en seres humanos han sido menos alentadores (véase, p. ej., Denis-Mize y col., *Gen Ther.* 7:2105 (2000)).

55 Por tanto, existe una necesidad de que vectores de expresión expresen secuencias heterólogas de ácido nucleico que puedan usarse como componentes de composiciones y procedimientos para estimular respuestas inmunitarias contra antígenos sobreexpresados en células cancerosas. En particular, existe la necesidad de composiciones que puedan dirigirse a una neoplasia maligna con la que un cáncer en particular está asociado, y de composiciones y procedimientos que puedan desencadenar y potenciar una respuesta inmunitaria al antígeno canceroso concreto. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

**Sumario breve de la invención**

La presente invención proporciona vectores de expresión y procedimientos para la expresión de secuencias heterólogas de ácido nucleico usando tales vectores de expresión. Dentro de una realización, el vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende los siguientes elementos, de 5' a 3': una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia de intrón A de CMV del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia heteróloga de ácido nucleico y un sitio de poliadenilación, en el que el promotor está unido de forma operable a la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la secuencia de intrón A de CMV tiene una delección desde aproximadamente la base 1513 a aproximadamente la base 1736. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno canceroso, tal como, por ejemplo, L523S (SEC ID N°: 6). En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende los nucleótidos 54-3675 de la secuencia establecida anteriormente en SEC ID N°: 3, los nucleótidos 1-1653 de la secuencia establecida anteriormente en la SEC ID N°: 3, o la secuencia de nucleótido establecida anteriormente en la SEC ID N°: 3. La invención también proporciona células huésped que comprenden los vectores de expresión descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la célula huésped es *E. coli* o células de mamífero. La invención proporciona adicionalmente composiciones inmunogénicas que comprenden el vector de expresión descrito anteriormente.

Otra realización de la invención proporciona un procedimiento para expresar una secuencia heteróloga de ácido nucleico. Una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un casete de expresión que comprende de 5' a 3' los siguientes elementos: una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia de intrón A de CMV del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia heteróloga de ácido nucleico y un sitio de poliadenilación, en el que el promotor está unido de forma operable a la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la secuencia del intrón A de CMV tiene una delección desde aproximadamente la base 1513 a aproximadamente la base 1736. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno canceroso, tal como, por ejemplo, L523S (SEC ID N°: 6). En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende los nucleótidos 54-3675 de la secuencia establecida anteriormente en SEC ID N°: 3, los nucleótidos 1-1653 de la secuencia establecida anteriormente en SEC ID N°: 3, o la secuencia de nucleótidos establecida anteriormente en la SEC ID N°: 3. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende los nucleótidos establecidos anteriormente en SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, la célula huésped es *E. coli* o células de mamífero.

Una realización adicional de la invención proporciona un procedimiento para desencadenar una respuesta inmunitaria, comprendiendo el procedimiento los pasos de administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica que comprende un vector que comprende un casete de expresión que comprende de 5' a 3' los siguientes elementos: una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia del intrón A de CMV del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia heteróloga de ácido nucleico y un sitio de poliadenilación, en el que el promotor está unido de forma operable a la secuencia heteróloga de ácido nucleico y en el que la respuesta inmunitaria está dirigida contra un péptido codificado por la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la composición inmunogénica se administra múltiple veces.

**Breve descripción de las secuencias**

- SEC ID N°: 1 es una secuencia de ADN para pUC9.
- SEC ID N°: 2 es una secuencia de ADN para pRSVneo.
- 40 SEC ID N°: 3 es una secuencia de ADN para pCRXA20.
- SEC ID N°: 4 es una secuencia de ADN para el extremo 5' de un gen CMV\_MIE.
- SEC ID N°: 5 es una secuencia de ADN para un vector adenoviral que comprende una secuencia L523S.
- SEC ID N°: 6 es una secuencia de ADN para L523S.
- SEC ID N°: 7 es una secuencia polipeptídica para L523S.
- 45 SEC ID N°: 8 es una secuencia polipeptídica para p13-21 de L523S.

**Descripción detallada de la invención****I. Introducción**

La presente invención proporciona una composición que puede dirigirse a una malignidad con la que está asociado un antígeno canceroso en particular, y composiciones y procedimientos que pueden desencadenar y potenciar una respuesta inmunitaria frente al antígeno canceroso concreto. En particular, la invención proporciona un plásmido de ADN vector de expresión que puede expresar genes cuando se transfecta a células eucariotas. El vector comprende un casete de expresión que comprende de 5' a 3' los siguiente elementos: una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia del intrón A de CMV del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia heteróloga de ácido nucleico, y un sitio de poliadenilación, en la que el promotor está unido de

forma operable a la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En una realización de ejemplo, la secuencia heteróloga de ácido nucleico es un antígeno canceroso. En algunas realizaciones, la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un antígeno canceroso. La invención también proporciona composiciones que comprenden el vector de expresión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además composiciones para expresar la secuencia heteróloga de ácido nucleico y procedimientos para desencadenar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido codificado por la secuencia heteróloga de ácido nucleico mediante la administración de tales composiciones a un sujeto.

## II. Definiciones

Una "composición inmunogénica" es aquella que desencadena o modula una respuesta inmunitaria, preferentemente la composición induce o potencia una respuesta inmunitaria en respuesta a un antígeno particular. Las respuestas inmunitarias incluyen respuestas inmunitarias humorales y respuestas inmunitarias mediadas por células. Una composición inmunogénica puede utilizarse terapéuticamente o profilácticamente para tratar o evitar una enfermedad en cualquier fase.

Como se utiliza en el presente documento, "heterólogo" se define en relación con una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos predeterminada a la que se hace referencia. Por ejemplo, con respecto a la secuencia de un gen estructural, un promotor heterólogo se define como un promotor que no se encuentra de forma natural adyacente al gen estructural al que se hace referencia, sino que se coloca mediante manipulación en el laboratorio. Análogamente, un gen heterólogo o un segmento de ácido nucleico se define como un gen o segmento que no se encuentra de forma natural adyacente al elemento promotor y/o potenciador a los que se hace referencia. Con respecto a secuencias de polipéptidos, es decir, secuencias de polipéptidos que codifican proteínas, un péptido heterólogo es aquel que no se encuentra de forma natural adyacente a la proteína o porción de ella a la que se hace referencia. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo es una proteína, polipéptido o proteína de fusión.

Una "proteína, polipéptido, o proteína de fusión" hace referencia a una proteína que tiene al menos dos polipéptidos unidos covalentemente, en la que un polipéptido procede de una secuencia o dominio proteico y el otro polipéptido procede de otra secuencia o dominio proteico. Los polipéptidos pueden estar unidos directamente o a través de un enlazador covalente, por ejemplo, un enlazador de aminoácido, tal como un enlazador de poliglicina, u otro tipo de enlazador químico, por ejemplo, un enlazador de hidrato de carbono, un enlazador de lípido, un enlazador de ácido, un enlazador de poliéter, por ejemplo, PEG, etc. (véase, p. ej., Hermanson (1996) Bioconjugate techniques). Los polipéptidos que forman las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, están típicamente unidos C-terminal con N-terminal, aunque también pueden estar unidos C-terminal con C-terminal, N-terminal con N-terminal o N-terminal con C-terminal. Los polipéptidos de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden estar en cualquier orden. La expresión "proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión" se refiere también a variantes modificadas de forma conservada, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos interespecies de los polipéptidos que constituyen las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden producirse por unión covalente de una cadena de aminoácidos de una secuencia proteica a una cadena de aminoácidos de otra secuencia proteica, por ejemplo, preparando un polinucleótido recombinante que codifique de forma contigua las proteínas, polipeptidos o proteínas de fusión. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden comprender 2, 3, 4 o más cadenas diferentes de aminoácidos de la misma o de distintas especies. Las distintas cadenas de aminoácidos en una proteína, polipéptido o proteína de fusión, pueden cortarse y unirse directamente o pueden cortarse y unirse indirectamente a través de un grupo enlazador químico o un grupo enlazador de aminoácidos. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden comprender opcionalmente otros componentes, como se describe con mayor detalle en el presente documento.

Un "adyuvante" es un potenciador no específico de la respuesta inmunitaria.

Las "respuestas inmunitarias humorales" están mediadas por componentes de la sangre carentes de células, es decir, plasma o suero; la transferencia de suero o plasma de un individuo a otro transfiere la inmunidad.

Las "respuestas inmunitarias mediadas por células" están mediadas por linfocitos específicos de antígeno; la transferencia de los linfocitos específicos de antígeno de un individuo a otro transfiere la inmunidad.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se administran a un sujeto en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta terapéutica o profiláctica en el sujeto. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como la "cantidad o dosis terapéuticamente efectiva".

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención se administran a un sujeto en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria en el sujeto. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como la "cantidad o dosis terapéuticamente efectiva".

El término "proteína" se utiliza en el presente documento de forma intercambiable con "polipéptido" y "péptido".

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. El término comprende ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de la estructura modificados, que son sintéticos, se encuentran de forma natural o se encuentran de forma no

natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitarse a ellos, fosforotioatos, fosforoamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, ribonucleótidos 2-O-metilados, ácidos péptido-nucleicos (PNA).

- 5 A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico concreta también incluye implícitamente sus variantes modificadas de forma conservadora (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer y col. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka y col. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Rossolini y col. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98). El término ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

- 15 Una secuencia polinucleotídica que comprende proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención híbrida en condiciones estrictas con cada una de las secuencias de nucleótidos que codifican cada polipéptido individual de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos individuales del polipéptido de fusión incluyen por lo tanto variantes modificadas de forma conservadora, variantes polimórficas, alelos, mutantes, subsecuencias y homólogos interespecies.

- 20 El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima en una ventana de comparación, en la que la porción de secuencia la de polinucleótido de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentran la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones de la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

- 30 El término "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos quiere decir que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 25% de identidad de secuencia. Alternativamente, el porcentaje de identidad puede ser un número entero de 25% a 100%. Las realizaciones más preferidas incluyen al menos: 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% o más, en comparación con una secuencia de referencia usando los programas descritos en el presente documento, preferentemente BLAST, usando parámetros estándar, como se describe más adelante. Un experto reconocerá que estos valores pueden ajustarse apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de los codones, la semejanza de aminoácidos, la situación del marco de lectura y similares. La "identidad sustancial" de las secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente quiere decir, normalmente, 35 que un polipéptido comprende una secuencia que tiene, al menos, un 40% de identidad de secuencia con, por ejemplo, la SEC ID N°: 3. El porcentaje de identidad de polipéptidos preferido puede ser un número entero de 40% a 100%. Las realizaciones más preferidas incluyen, al menos, un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%. Los polipéptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencia como se indica anteriormente, excepto porque las posiciones de los residuos que no son idénticas pueden diferir en cambios conservadores de aminoácidos. Las 40 sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo-alifáticas es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es el de asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina e histidina; y un grupo 45 de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el de cisteína y metionina. Los grupos preferidos con sustituciones conservadoras de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutámico, y asparagina-glutamina.

- 50 La alineación óptima de secuencias para su comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) *Add. APL. Math.* 2:482, mediante el algoritmo de alineación de identidad de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante el procedimiento de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85:2444, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de software para genética de Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

- 55 Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402 y Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en el presente documento para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible para el público a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de Estados Unidos 60 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de

nucleótidos, los parámetros M (puntuación positiva asignada a un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización asignada a residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los resultados de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación acumulada de alineación cae una cantidad X a partir de su máximo valor alcanzado; la puntuación acumulada se hace cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que puntúan negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativas (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es que si dos moléculas hibridan entre sí, o con un tercer ácido nucleico, en condiciones moderadamente estrictas, y preferentemente altamente estrictas. Las condiciones estrictas dependen de las secuencias y serán distintas en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una guía en profundidad para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan para que sean 5-10°C inferiores al punto térmico de fusión (T<sub>f</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH determinados. La T<sub>f</sub> es la temperatura (en una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Típicamente, condiciones estrictas serán aquellas en las que la concentración de sales es menor de aproximadamente 1,0 M de ión sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, al menos, de aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos, de aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas pueden alcanzarse también con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es una hibridación de, al menos, dos veces la hibridación de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

Las condiciones estrictas de hibridación pueden ser como se indica a continuación: formamida al 50%, SSC 5X, y SDS al 1%, incubando a 42°C, o SSC 5X, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en SSC 0,2X, y SDS al 1% a 65°C.

Para los fines de la invención, las "condiciones moderadamente estrictas" adecuadas incluyen, por ejemplo, lavar previamente en una disolución de SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), hibridar a 50°C-65°C, SSC 5X durante la noche, seguido de dos lavados a 65°C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X (que contiene SDS al 0,1%). Dichas secuencias de ADN de hibridación están también dentro del ámbito de la presente invención.

La "proliferación de células T" como se describe en el presente documento, incluye la multiplicación de linfocitos T, así como la estimulación de linfocitos T que conduce a la multiplicación, es decir, el comienzo de acontecimientos que conducen a la mitosis y la mitosis en sí. Se describen procedimientos para detectar la proliferación de linfocitos T más adelante.

### III. Vectores de la invención

La presente invención proporciona composiciones que pueden dirigirse a una malignidad con la que se asocia un antígeno canceroso en particular, y composiciones y procedimientos que pueden desencadenar y potenciar una respuesta inmunitaria frente al antígeno canceroso concreto. En particular, la invención proporciona un casete de expresión que comprende de 5' a 3' los siguientes elementos: una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia de intrón A de CMV del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia heteróloga de ácido nucleico y un sitio de poliadenilación, donde el promotor está unido de forma operable a la secuencia heteróloga de ácido nucleico.

Como se divulga en la presente invención, el producto de expresión proteico de un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo es reconocido por los linfocitos T.

#### A. Vectores de expresión

En una realización, los compuestos de la presente invención comprenden vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, que comprenden los polipéptidos heterólogos o las variantes de los polipéptidos heterólogos. En las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención, el componente polipéptido heterólogo puede estar fusionado directamente o a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador de aminoácido u otro tipo de enlazador químico, con otro polipéptido. Otras variantes dentro del ámbito de la invención incluyen proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión en las que la estructura de aminoácidos primaria del péptido heterólogo nativo se modifica formando conjugados covalentes o de agregación con otros péptidos o polipéptidos, o restos químicos tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares.

Pueden prepararse derivados covalentes, por ejemplo, uniendo grupos funcionales concretos a cadenas laterales de aminoácidos o al extremo N o C.

5 La presente invención también incluye casetes de expresión que codifican proteínas de fusión y proteínas de fusión con o sin glicosilación. Las proteínas de fusión expresadas en sistemas de expresión de levaduras o de mamíferos pueden ser similares, o ligeramente diferentes, en cuanto al peso molecular y al patrón de glicosilación de las moléculas nativas, dependiendo del sistema de expresión. La expresión de ADN que codifica polipéptidos en bacterias tales como *E. coli* típicamente proporciona moléculas no glicosiladas. Los sitios de N-glicosilación de proteínas eucariotas se caracterizan por el triplete de aminoácidos Asn-A<sub>1</sub>-Z, en el que A<sub>1</sub> es cualquier aminoácido excepto Pro, y Z es Ser o Thr. Las variantes de proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que tienen sitios de N-glicosilación inactivados, pueden producirse por técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como síntesis y unión de oligonucleótidos o técnicas de mutagénesis específica de sitio, y están dentro del alcance de la invención. Alternativamente, pueden unirse a una proteína, polipéptido o proteína de fusión, sitios de glicosilación N-ligados.

10 Las proteínas, polipéptidos, o proteínas de fusión de la presente invención, que se entenderá que incluyen variantes, incluyen cualquier combinación posible entre polipéptidos humanos y no humanos. Los polipéptidos no humanos comprenden polipéptidos de cualquier mamífero, tal como, por ejemplo, de rata, ratón, cobaya, caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, etc.

15 Cualquier variante de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la presente invención se incluye como forma de realización de la presente invención. En una realización, dichas variantes son sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a la proteína nativa y conservan la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria. El efecto de cualquier modificación de secuencia sobre la capacidad de una proteína para producir una respuesta inmunitaria puede determinarse fácilmente, por ejemplo, analizando la capacidad de la proteína mutada para inducir una respuesta de linfocitos T usando, por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento, o analizando la capacidad de la proteína mutada para producir anticuerpos.

20 En ciertas realizaciones específicas, las proteínas, polipéptidos, o proteínas de fusión de la invención pueden comprender un compañero de fusión, tal como, por ejemplo, un compañero de fusión inmunológico o un potenciador de la expresión. Un compañero de fusión puede, por ejemplo, ayudar a proporcionar epítopos de linfocitos T colaboradores (un compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítopos de linfocitos T colaboradores reconocidos por seres humanos, o pueden ayudar en la expresión de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión (un potenciador de la expresión) con rendimientos más altos que las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión recombinantes. Ciertos compañeros de fusión preferidos son compañeros tanto inmunológicos como potenciadores de la expresión. Otros compañeros de fusión pueden seleccionarse con el objetivo de incrementar la solubilidad de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, o para permitir que las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión sean dirigidas hacia compartimentos intracelulares deseados. Otros compañeros de fusión adicionales incluyen etiquetas de afinidad, que facilitan la purificación de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés.

25 También se proporcionan proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de fusión como se describe en el presente documento junto con una proteína inmunogénica no relacionada. Preferentemente, la proteína inmunogénica es capaz de desencadenar una respuesta de memoria. Ejemplos de tales proteínas incluyen proteínas del tétanos, la tuberculosis y la hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute y col. (1997) *New Engl. J. Med.* 336:86-91).

30 En otras realizaciones, un compañero de fusión inmunológico deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenza* B (documento WO 91/18926). Preferentemente, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (p. ej, los primeros 100-110 aminoácidos de N-terminales), y el derivado de proteína D puede estar lipídizado. En ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 residuos de un compañero de fusión de lipoproteína D están incluidos en el extremo N para proporcionar a las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión epítopos de linfocitos T exógenos adicionales y para incrementar el nivel de expresión en *E. coli* (funcionando así como un potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura una presentación óptima de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión a las células presentadoras de antígeno. Otros compañeros de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la gripe, NS1 (hemaglutinina), o una porción inmunogénica de la misma (véase, por ejemplo, los documentos WO 99/40188 y WO 93/04175). Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden usarse diferentes fragmentos que incluyen epítopos de linfocitos T-colaboradores. En una realización, las proteínas, polipéptidos, o proteínas de fusión de la presente invención comprenden además el compañero de fusión NS1 o uno de sus fragmentos inmunogénicos, preferentemente unido a la región N-terminal de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que comprende el compañero NS1 se expresan preferentemente por recombinación en células BHK, como se describe más adelante.

35 En otra realización, el compañero de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA, o una porción de la misma (preferentemente una porción C-terminal). LYTA deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*, Gene 43:265-292 (1986)). LYTA es una autolisina que degrada específicamente determinados enlaces de la estructura de los péptidoglicanos. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad por la colina o por algunos análogos de la colina, tales como DEAE. Esta propiedad se ha aprovechado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli*

útiles para la expresión de proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA del extremo amino (véase, *Biotechnology* 10:795-798 (1992)). Dentro de una realización preferida, una porción de repetición de LYTA puede incorporarse en proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Una porción de repetición se encuentra en la región C-terminal empezando en el residuo 178. Una porción de repetición particularmente preferida incorpora los residuos 188-305.

Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos compañeros de fusión de la presente invención pueden ser preparados por cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los procedimientos de ejemplo incluyen la donación y la restricción de secuencias adecuadas o la síntesis química directa por procedimientos tales como el procedimiento fosfotriéster de Narang y col. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99; el procedimiento fosfodiéster de Brown y col. (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151; el procedimiento dietilfosforamidita de Beaucage y col. (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859-1862; y el procedimiento de soporte sólido de la patente de EE. UU. N° 4.458.066.

Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican un polipéptido de fusión que comprende un polipéptido compañero de fusión y una proteína, polipéptido o proteína de fusión seleccionada, pueden prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Como se ha descrito anteriormente, los ácidos nucleicos recombinantes están contruidos de forma que, preferentemente, la secuencia del polipéptido compañero de fusión se localiza en 5' de la secuencia del polinucleótido que codifica las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés. Las secuencias de polinucleótidos del compañero de fusión y las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión también pueden modificarse para facilitar su fusión y posterior expresión.

Los ácidos nucleicos recombinantes pueden comprender adicionalmente secuencias de nucleótidos tales como secuencias que codifican etiquetas de afinidad para facilitar los protocolos de purificación de proteínas.

#### **B. Variantes de las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos heterólogos**

En general, se considera que las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> funcionan como colaboradoras o inductoras a través de la liberación de linfocinas cuando son estimuladas por un antígeno específico; sin embargo, un subgrupo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> puede actuar como linfocitos T citotóxicos (CTL). De forma similar, se considera que las linfocitos T CD8<sup>+</sup> funcionan lisando directamente dianas antigénica; sin embargo, bajo diversas circunstancias pueden secretar linfocinas para proporcionar una función colaboradora o DTH. A pesar de la posibilidad de solapamiento de las funciones, los marcadores fenotípicos CD4 y CD8 están ligados al reconocimiento de péptidos unidos a antígenos MHC de clase I o clase II. El reconocimiento de antígenos en el contexto de MHC de clase I o clase II implica que las linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> responden a distintos antígenos o al mismo antígeno presentados. La unión de péptidos inmunogénicos a antígenos MHC de clase II ocurre más frecuentemente para con antígenos captados por las células presentadoras de antígeno.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> generalmente reconocen antígenos que han estado en el exterior de células cancerosas. Por el contrario, en circunstancias normales, la unión de péptidos a MHC de clase I sucede solo con proteínas presentes en el citosol y sintetizadas por la diana en sí, las proteínas del entorno exterior quedan excluidas. Una excepción para esto es la unión de péptidos exógenos con un motivo de unión de clase I concreto que están presentes en el exterior de la célula en concentraciones altas. Así, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tienen funciones ampliamente diferentes y tienden a reconocer distintos antígenos como reflejo de dónde reside el antígeno normalmente.

Otra forma de hacer sustituciones de aminoácidos para producir variantes de la presente invención es identificar un aminoácido de sustitución en motivos de linfocitos T con potencial para unirse a moléculas MHC de clase II (para respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup>) o moléculas MHC de clase I (para respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>). Los segmentos peptídicos con un motivo con potencial teórico para unirse a moléculas MHC de clase I pueden identificarse por análisis computacional. Por ejemplo, puede usarse un paquete de análisis de secuencia de proteínas, *T Sites* que incorpora varios algoritmos computacionales diseñados para distinguir sitios potenciales para reconocimiento de linfocitos T (Feller y col. (1991) *Nature* 349:720-721). Se utilizan dos algoritmos de búsqueda: (1) el algoritmo AMPHI descrito por Margalit (Feller y col. (1991) *Nature* 349:720-721; Margalit y col. (1987) *J. Immunol.* 138:2213-2229) identifica epítomos según la periodicidad de la hélice alfa y la anfipaticidad; (2) el algoritmo de Rothbard y Taylor identifica epítomos según la carga y (1988) *EMBO J.* 7:93-100). Los segmentos con ambos motivos son los más apropiados para unirse a moléculas MHC de clase II. La linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen péptidos unidos a moléculas MHC de clase I. Parker y col. (1994) *J. Immunol.* 152:163 han determinada que los péptidos unidos a moléculas MHC concretas comparten motivos de secuencias discernibles. Se ha definido un motivo peptídico para unión en el surco de HLA-A2.1 por degradación de Edman de péptidos sacados de moléculas HLA-A2.1 de una línea celular cultivada (Tabla 1, de Falk y col. (1991) *Nature* 351:290-296). El procedimiento identificó el típico o el habitual péptido de unión a HLA-A2.1 como de 9 aminoácidos de longitud con residuos ancla dominantes en las posiciones 2 (L) y 9 (L). Se han identificado residuos de unión fuerte que aparecen frecuentemente en las posiciones 2 (M), 4 (E, K) y 8 (K). El motivo identificado representa la media de muchos péptidos de unión.

**Tabla 1: El motivo restringido a HLA-A2.1**

	Posición del aminoácido									Punto asignado
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Unión dominante Residuo ancla		I							V	+3
Unión fuerte Residuo		M		E K		V		K		+2
Unión débil Residuo	I L F K M Y		A Y F P M S	G P D T	I K Y N G V H	I L T	A Y H	E S	I	+1

5 El motivo peptídico derivado como se define actualmente no es particularmente estricto. Algunos péptidos de unión a HLA-A2.1 no contienen ambos residuos ancla dominantes y los aminoácidos que flanquean los residuos ancla dominantes juegan papeles clave permitiendo o no permitiendo la unión. No todos los péptidos con el motivo de unión actualmente descrito se unirán, y algunos péptidos sin el motivo, se unirán. Sin embargo, el motivo actual es suficientemente válido para permitir la identificación de algunos péptidos capaces de unirse. Cabe apuntar que todas las moléculas MHC y sus motivos respectivos sitúan 6 aminoácidos entre los aminoácidos ancla dominantes en los residuos 2 y 9.

10 Después de la identificación de motivos peptídicos en proteínas, las sustituciones de aminoácidos puede hacerse de forma conservadora o no conservadora. El último tipo de sustituciones pretende producir una proteína mejorada que es más potente y/o tiene una reactividad cruzada más amplia. Un ejemplo de una proteína o péptido más potente es uno que se une con mayor afinidad a la misma molécula MHC que la proteína o el polipéptido natural, sin afectar al reconocimiento por linfocitos T específicos para proteínas o polipéptidos naturales. Un ejemplo de un polipéptido con una reactividad cruzada más amplia es uno que induce respuestas inmunitarias de reactividad cruzada más amplias (es decir, se une a un abanico de moléculas MHC más amplio) que un polipéptido natural. De forma similar, uno o más aminoácidos localizados entre motivos peptídicos y que tenga una función espaciadora (por ejemplo, no interaccionan con un receptor de moléculas MHC o de linfocitos T) pueden ser sustituidos de forma conservadora o no conservadora. Resultará evidente para un experto en la técnica que los polipéptidos que contengan una o más sustituciones de aminoácidos pueden ensayarse para evaluar sus interacciones inmunológicas beneficiosas o adversas mediante diversos ensayos, incluidos los descritos en el presente documento para la capacidad de estimular el reconocimiento por linfocitos T.

25 Las variantes dentro del alcance de la presente invención pueden también, o de forma alternativa, contener otras modificaciones, incluida la delección o la adición de aminoácidos, que tienen una influencia mínima en las propiedades inmunológicas deseadas del polipéptido, como se describe anteriormente. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar formas truncadas o formas extendidas no nativas de una proteína, siempre que las propiedades inmunológicas deseadas sean la menos aproximadamente equivalentes a las de la proteína nativa de longitud total. Los residuos de cisteína pueden eliminarse o sustituirse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos tras la renaturalización. Otras aproximaciones a la mutagénesis implican la modificación de residuos de aminoácido dibásicos adyacentes para potenciar la expresión en sistemas de levaduras en las que está presente la actividad proteasa KEX2.

**IV. Preparación de polinucleótidos de la invención**

**A. Polinucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión**

35 De acuerdo con la invención, cualquier secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia de aminoácidos de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés puede utilizarse para generar moléculas recombinantes que

dirigen la expresión de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión.

Con el fin de clonar secuencias codificantes de longitud completa o variantes homólogas para generar los polinucleótidos de fusión, pueden usarse sondas de ADN marcadas diseñadas a partir de cualquier porción de una secuencia de nucleótidos o sus complementos para analizar una biblioteca genómica o de ADNc, para identificar la secuencia codificante de cada componente individual de las proteínas, polipeptidos o proteínas de fusión. Las secuencias de nucleótidos pueden ser de cualquier mamífero adecuado, por ejemplo, ser humano, rata, ratón, caballo, vaca, oveja, perro, etc.

Dichos clones pueden aislarse analizando una biblioteca de expresión adecuada para clones que expresan una proteína de longitud total de interés, tal como un antígeno canceroso. La preparación y el análisis de la biblioteca pueden realizarse generalmente usando procedimiento conocidos por los expertos en la técnica, tales como los procedimientos descritos en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1989). Brevemente, una biblioteca de expresión de bacteriófagos puede disponerse en placas y transferirse a filtros. Los filtros pueden incubarse después con un reactivo de detección. En el contexto de la presente invención, un "reactivo de detección" es cualquier compuesto capaz de unirse a la proteína, y que entonces puede detectarse por diversos medios conocidos por los expertos en la técnica. Los agente de detección típicos contienen un "agente de unión", tal como proteína A, proteína G, IgG o una lectina, unido a un grupo indicador. Los grupos reporteros preferidos incluyen enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, tinte, radionúclidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes y biotina. Más preferentemente, el grupo indicador es peroxidasa de rábano, que puede detectarse mediante incubación con un sustrato como tetrametilbencidina o ácido sulfónico de 2,2'-azino-di-3-etilbenzo-tiazolina. Por ejemplo, las placas que contienen secuencias genómicas o de ADNc que expresan un antígeno canceroso se aíslan y purifican por técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los procedimientos puede encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y col., *supra*.

El aislamiento de secuencias codificantes también puede llevarse a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando dos conjuntos de cebadores oligonucleótidos degenerados designados sobre la base de las secuencias codificantes divulgadas en el presente documento. Los ácidos nucleicos deseados también pueden clonarse usando otras técnicas de amplificación bien conocidas. Ejemplos de protocolos suficientes para guiar a expertos a través de procedimientos de amplificación in vitro, incluyendo PCR, reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de la replicasa Q $\beta$  y otras técnicas mediadas por ARN polimerasas se encuentran en Sambrook y col., *supra*, y Ausubel y col. *Current Protocols in Molecular Biology* (1994), así como en la patente de EE. UU. N° 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis y col. eds. 1990); Arnheim & Levinson C&EN págs. 36-47 (1 de octubre de 1990); The Journal of NIH Research 3:81-94 (1991); Kwoh y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:1173; Guatelli y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874; Lomell y col. (1989) J. Clin. Chem. 35:1826; Landegren y col. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8:291-294; Wu y col. (1989) Gene 4:560; y Barringer y col. (1990) Gene 89:117. Procedimiento de clonaje de ácidos nucleicos amplificados in vitro se describen en la patente de EE. UU. N° 5.426.039. Los cebadores adecuados para su uso en la amplificación de los ácidos nucleicos de la invención pueden diseñarse en base a las secuencias que se proporcionan en el presente documento.

De acuerdo con a invención, un polinucleótido de la invención que codifica proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, unos de sus fragmentos o uno de sus equivalentes funcionales puede usarse para generar moléculas de ácido nucleico recombinantes que dirigen la expresión de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, uno de sus fragmentos, o unos de sus equivalentes funcionales, en células huésped adecuadas. Los productos de polipéptidos de fusión codificados por dichos polipéptidos pueden modificarse por manipulación molecular de la secuencia codificante.

Debido a la degeneración inherente al código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente, puede usarse en la puesta en práctica de la invención para la expresión de los polipéptidos de fusión. Dichas secuencia de ADN incluyen aquellas capaces de hibridar con las secuencias codificantes de sus complementos divulgadas en el presente documentos bajo condiciones poco, moderadamente o altamente estrictas como se describe en el presente documento.

Las secuencias de nucleótidos alteradas que pueden usarse según la invención incluyen deleciones, adiciones o sustituciones de diferentes residuos de nucleótidos que tienen como resultado una secuencia que codifica el mismo o un producto génico funcionalmente equivalente. El producto génico en sí puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de residuos de aminoácido, que tienen como resultado un cambio silencioso, produciendo así un epítipo antigénico funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina, histidina y arginina; los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargada que tienen valores de hidrofiliicidad similares incluyen los siguientes: glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, y tirosina, y los aminoácidos con grupos de cabeza no polares incluyen alanina, valina, isoleucina, fenilalanina, prolina, metionina y triptófano.

Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden modificarse para alterar la secuencia codificantes de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión con diversos fines, incluyendo, pero sin limitarse a ello, alteraciones que

modifican el procesamiento y la expresión del producto génico. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones usando técnicas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, insertar o eliminar sitios de restricción, alterar patrones de glicosilación, fosforilación, crear y/o destruir secuencias de translación, iniciación y/o terminación, o crear variaciones en las regiones codificantes, para facilitar la modificación adicional *in vitro*, etc. Los expertos en la técnica  
 5 reconocerán muchas formas de generar alteraciones en un constructo de ácido nucleico dado. Dichos procedimientos bien conocidos incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio, amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados, exposición de células que contienen el ácido nucleico a agentes mutagénicos o radiación, síntesis química de un oligonucleótido deseado (por ejemplo, en conjunto con ligación y/o clonación para generar ácido nucleicos grandes) y otras técnicas bien conocidas (ver, por ejemplo, Gilman y col. (1979) *Gene* 8:81-97; Hutchinson y col. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:6551; Roberts y col. (1987) *Nature* 328: 731-734). Preferentemente, las manipulaciones  
 10 no destruyen la inmunogenicidad de los polipéptidos de fusión.

En una realización de la invención, la secuencia codificante de una proteína, polipéptido o proteína de fusión puede sintetizarse total o parcialmente, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Caruthers y col. (1980) *Nuc. Acids Res. Symp. Ser.* 7:215-233; Crea y col. (1980) *Nuc. Acids Res.* 9(10):2331; Matteucci y col. (1980) *Tetrahedron Letter* 21:719 (1980); y Chow y col. (1981) *Nuc. Acids Res.* 9(12):2807-2817).

### B. Modificaciones de secuencia

Las variantes de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención que mantienen la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria pueden generalmente ser identificadas modificando la secuencia en uno o más de los aspectos descritos anteriormente y ensayando las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión resultantes para  
 20 evaluar su capacidad de estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T o una respuesta de anticuerpos. Por ejemplo, dichos ensayos pueden realizarse generalmente poniendo en contacto linfocitos T con las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión modificados y ensayando la respuesta. Las variantes que aparecen de forma natural de los componentes polipeptídicos individuales de las proteínas, polipéptidos o  
 25 proteínas de fusión pueden aislarse también, por ejemplo, analizando una biblioteca de ADNc o genómica adecuada que codifique cada polipéptido individual o una variante del mismo.

Las modificaciones de secuencia descritas anteriormente pueden introducirse usando técnicas de recombinación estándar o por síntesis automatizada de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión modificados. Por ejemplo, las mutaciones pueden introducirse en un loci particular sintetizando oligonucleótidos que contengan una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permitan la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de  
 30 la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción o la delección de aminoácidos deseada.

Alternativamente, los procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida a oligonucleótidos puede usarse para proporcionar un gen en se alteren codones concretos según la sustitución, delección o inserción que se requiera. Procedimientos ejemplares para realizar las alteraciones mencionadas anteriormente están descritos por Walder y col. (1986) *Gene* 42:133; Bauer y col. (1985) *Gene* 37: 73; Craik (1985) *BioTechniques* January: 12-19; Smith y col. (1981) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press; y las patentes de EE. UU. Nº 4.518.584 y 4.737.462.

Las mutaciones en secuencias de nucleótidos construidas para la expresión de dichas proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión deben, por supuesto, conservar el marco de lectura de las secuencias codificantes y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían hibridar para producir estructuras secundarias en el ARNm, tales como lazos u horquillas, que afectarían negativamente a la traducción del ARNm. Aunque un sitio de mutación puede estar predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación esté predeterminada per se. Por ejemplo, con el fin de seleccionar los mutantes con características óptimas en un sitio dado, puede llevarse a cabo una mutagénesis en el codón diana y analizarse la proteínas mutantes que se expresen para evaluar la actividad deseada. No todas las mutaciones en una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína se expresarán en el producto final. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos pueden hacerse para potenciar la expresión, principalmente para evitar lazos en la estructura secundaria en el transcrito de ARN (ver, por ejemplo, la solicitud de patente europea 75444A), o para proporcionar codones que son traducidos más fácilmente por el huésped elegido, tales como los bien conocidos codones de preferencia de *E. coli* para la expresión de *E. coli*.

### C. Vectores de expresión

Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, y sus variantes, de la presente invención, se producen, preferentemente, por procedimientos de ADN recombinante. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, la inserción de una secuencia de ADN que codifica una proteína, un polipéptido o una proteína de fusión antigénicos cancerosos en el vector de expresión recombinante descrito anteriormente y la expresión de la secuencia de ADN en un sistema de expresión recombinante de célula microbiana, mamífera, fúngica o de insecto bajo condiciones que  
 50 promuevan la expresión y, preferentemente, la secreción de proteínas, polipéptidos, o proteínas de fusión. Las secuencias de ADN que codifican las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión proporcionados por la presente invención pueden conformarse a partir de fragmentos de ADNc y oligonucleótidos de unión cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que es capaz de insertarse en un vector de expresión recombinante y expresarse en una unidad transcripcional recombinante.

Los vectores de expresión recombinantes contienen una secuencia de ADN que codifica una proteína unida operativamente a elementos reguladores de la transcripción o de la traducción adecuados derivados de genes mamíferos, fúngicos, microbianos, víricos o de insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión de ARNm a ribosomas, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Puede incorporarse adicionalmente un origen de replicación y un marcador seleccionable para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

Las regiones de ADN están "unidas de forma operable" cuando están relacionadas de forma funcional unas con otras. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (director de la secreción) está unido de forma operativa a ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está "unido de forma operativa" a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está "unido de forma operativa" a una secuencia codificante si está situada de formas que permita la traducción. Generalmente, "unido de forma operativa" quiere decir contiguo y, en el caso de directores de la secreción, en el marco de lectura. Las secuencias de ADN que codifican proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que se han de expresar en un microorganismo preferentemente no contendrán intrones que pudieran terminar prematuramente la transcripción del ADN a ARNm.

Los vectores de expresión para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable, y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos de vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Dichos vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET28b (Novagen) y pPDM (un pET28b modificado, Corixa). Estas secciones de "estructuras" de pBR322 se combinan con un promotor adecuado y la secuencia estructural que se va a expresar. *E. coli* suele transformarse usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Bolívar y col. (1977) Gene 2:95). pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por lo tanto, proporciona medios sencillos para identificar las linfocitos Transformadas.

Los vectores de levaduras preferidos pueden construirse usando secuencias de ADN de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen Amp<sup>r</sup> y origen de replicación) y ADN de levaduras. El líder factor  $\alpha$  de levaduras, que dirige la secreción de proteínas heterólogas, puede insertarse entre el promotor y el gen estructural para expresarse (ver, por ejemplo, Kurjan y col. (1982) Cell 30:933; y Bitter y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330. La secuencia líder puede modificarse para que contenga, cerca de su extremo 3', uno o más sitios de restricción útiles para facilitar la fusión de la secuencia líder con genes exógenos.

Además de las secuencias de control transcripcionales y traduccionales, algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan la amplificación de genes, tales como neomicina, timidina cinasa, higromicina B fosfotransferasa y dihidrofolatorreductasa.

Una línea celular que permite la replicación episomal de vectores de expresión es CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). La línea celular CV-1/EBNA se derivó por transfección de la línea celular CV-1 con un gen que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1) y que expresa de forma constitutiva EBNA-1 dirigido por el potenciado/promotor inmediato-temprano de CMV humano.

Los vectores preferidos para la expresión en células de mamíferos cultivadas incluyen pFLAGCMV-1 (Kodak), pcDNA3.1/hyg (Invitrogen), pEE14-GS (CellTech), pBIB y VR1012 (Hartikka y col. (1996) Hum. Gene Ther. 7(10):1205-1217).

Cualquiera de los bien conocidos procedimientos para introducir secuencias de nucleótidos exógenas en células huésped pueden usarse para introducir el vector de expresión. Éstos incluyen el uso de reactivos tales como Superfect (Qiagen), liposomas, transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión con protoplastos, electroporación, microinyección, vectores plasmídicos, vectores víricos, aceleración biolística de partículas (pistola génica), o cualesquiera otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ANDc, ADN sintético u otro material genético exógeno en una célula huésped (ver, por ejemplo, Sambrook y col., supra).

#### D. Células Huésped

Las células huésped transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores de expresión contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que contienen secuencias que codifican proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés. Las células huésped transformadas pueden expresar las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés deseados, pero las células huésped transformadas con fines de clonación o amplificación de un ADN no necesitan expresar las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés. La proteína, polipéptidos o proteínas de fusión expresadas serán secretadas preferentemente al medio de cultivo o al sobrenadante, dependiendo del ADN seleccionado. Los expertos en la técnica apreciarán que si las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión se secretan al sobrenadante del cultivo, entonces también son solubles en el sobrenadante del cultivo.

Cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótido exógenas en células

huésped pueden utilizarse para inducir el vector de expresión. Éstos incluyen el uso de reactivos tales como Superfect (Qiagen), liposomas, transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión con protoplastos, electroporación, microinyección, vectores plasmídicos, vectores víricos, aceleración biolística de partículas (pistola génica), o cualesquiera otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ANDc, ADN sintético u otro material genético exógeno en una célula huésped (ver, por ejemplo, Sambrook y col., supra).

Las células huésped adecuadas para la expresión de proteínas recombinantes incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores bajo el control de promotores adecuados. Los ejemplos de líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (1981) Cell 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado incluidas, por ejemplo, líneas celulares de CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478), células L, C127, 3T3, ovario de hámster chino (CHO), COS, NS-1, HeLa, fibroblastos de riñón humano embrionarios (HEK 293), BHK y HEK293. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender elementos no transcritos (por ejemplo, un origen de replicación, un promotor y/o potenciador adecuado unido al gen que se va a expresar, y otras secuencias flanqueantes de 5' o 3' no transcritas) y secuencias 5' o 3' no traducidas (por ejemplo, sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de ajuste, y secuencias de terminación de la transcripción). Los sistemas de expresión de mamíferos preferidos son las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), HEK293 y BHK. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión expresados en CHO se secretan al sobrenadante como una proteína glicosilada.

Los procariotas incluyen organismos gram negativo o gram positivo, por ejemplo *E. coli* o *Bacilli*. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas originadas en insectos o mamíferos como se describe más adelante. Los sistemas de traducción sin linfocitos También podrían utilizarse para producir proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión usando ARN derivados de constructos de ADN. Vectores de clonación apropiados para su uso en huéspedes celulares bacteriano, fúngicos, de levaduras y mamíferos se describen, por ejemplo, en Pouwels y col., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, NY (1985).

Los huéspedes de expresión procariotas pueden utilizarse para la expresión de proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que no requieren procesamiento proteolítico y de disulfuración extensivo. Los vectores de expresión procariotas generalmente comprenden uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia antibiótica o que suministra un requisito autótrofo, y un origen de replicación reconocido por el huésped para asegurar la amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procariotas adecuados incluyen *E. coli* (por ejemplo, *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y varias especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden utilizarse otros huéspedes.

También pueden usarse sistemas de cultivo celular de insectos (por ejemplo, *Spodoptera* o *Trichoplusia*) para expresar polipéptidos recombinantes. Los sistemas de baculovirus para producir polipéptidos heterólogos en células de insectos se revisan, por ejemplo, en Luckow y col. (1988) BioTechnology 6:47.

### 35 E. Purificación de las proteínas de interés

Los expertos en la técnica entenderán que las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés pueden prepararse cultivando sistemas huésped/vector adecuados para expresar los productos de traducción recombinantes de los ADN de la presente invención, que se purifican después a partir del medio de cultivo o los extractos celulares. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan polipéptidos recombinantes al medio de cultivo puede concentrarse primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Tras la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una proteína de estructura opuesta (es decir, una proteína a la que una proteína, polipéptido o proteína de fusión de interés se une con una interacción específica basada en la estructura) o una molécula de lectina o anticuerpo unida a un soporte adecuado.

Como alternativa, puede usarse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tenga grupos dietilaminoetil (DEAE) unidos. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa, poliestireno, sefarosa u otros tipos usado habitualmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio de cationes. Los intercambiadores de cationes adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo, preferentemente sulfopropilo. La cromatografía de filtración en gel también proporciona un medio para purificar proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención se purifican preferentemente por cromatografía de intercambio aniónico usando, por ejemplo, columnas monoQ o cromatografía de alto rendimiento en sefarosa Q.

La cromatografía de afinidad es otro procedimiento preferido para purificar proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden ser útiles en la purificación por cromatografía de afinidad, usando procedimientos bien conocido en la técnica.

Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) usando medio de RP-HPLC hidrofóbico (por ejemplo, gel de sílice con grupos metilo u otros grupos alifáticos) para purificar adicionalmente proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés. Algunas o todas de las etapas de

purificación anteriores, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína o polipéptido homogéneo recombinante.

- 5 Las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión recombinantes producidas en cultivos bacterianos pueden purificarse mediante una extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguida de una o más etapas de concentración, eliminación de sales o cromatografía acuosa de intercambio iónico o de exclusión por tamaño. Puede utilizarse la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas utilizadas en la expresión de proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión recombinantes pueden romperse por cualquier procedimiento adecuado, incluidos ciclos de congelación-fusión, sonicación, rotura mecánica o el uso de agentes de lisis celular.
- 10 La fermentación de las células de levadura que expresan proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión como una proteína secretada simplifica enormemente la purificación. Las proteínas recombinantes secretadas resultantes de una fermentación a gran escala pueden purificarse por procedimientos análogos a los divulgados en Urdal y col. (1984) J. Chromatog. 296:171. Esta referencia describe dos etapas secuenciales de HPLC en fase reversa para la purificación de GM-CSF humana recombinante en una columna de HPLC preparativa.
- 15 La preparación de proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión sintetizados en cultivos recombinantes puede contener componentes celulares que no son proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, incluidas proteínas en cantidades y de características que dependen de las etapas de purificación llevadas a cabo para recuperar las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión del cultivo. Estos componentes suelen tener su origen en levaduras, procariotas o eucariotas no humanos. Dichas preparaciones suelen estar libres de otras proteínas que normalmente están asociadas con las proteínas de interés como se encuentra en la naturaleza en su especie de origen.
- 20

- La síntesis automatizada proporciona un procedimiento alternativo para preparar proteínas y polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, puede usarse cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el mercado, tal como, por ejemplo, el procedimiento de síntesis de Merrifield en fase sólida, en el que se añaden aminoácidos secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento (*ver*, Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146). Los equipos para la síntesis automatizada de polipéptidos están disponibles en el mercado de fabricantes tales como Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) y pueden manejarse habitualmente según las instrucciones del fabricante.
- 25

#### V. Composiciones de la invención

- 30 Los vectores de ADN de la invención y los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico heterólogas de la misma pueden incorporarse de forma conveniente en composiciones farmacéuticas o composiciones inmunogénicas (es decir, vacunas). Las composiciones farmacéuticas comprenden los vectores y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas pueden comprender uno o más de dichos compuestos o células y un inmunoestimulador, tal como un adyuvante o un liposoma (en el que se incorpora el compuesto). Un inmunoestimulador puede ser cualquier sustancia que intensifica o potencia una respuesta inmunitaria (mediada por anticuerpos y/o células) a un antígeno exógeno. Los ejemplo de inmunoestimuladores incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) y liposomas (en cuyo interior se incorpora el compuesto) (patente de EE. UU. N° 4.235.877). La preparación de vacunas de describe generalmente, por ejemplo, en Powell y Newman (1995). Las composiciones farmacéuticas y las vacunas dentro del alcance de la presente invención pueden contener también otros compuestos, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, una o más porciones inmunogénicas u otros antígenos de tumores pueden estar presentes, bien incorporados en un péptidos de fusión o como un compuesto separado, dentro de la composición de vacuna.
- 35
- 40

- Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y las vacunas se diseñan para desencadenar respuestas de linfocitos T específicas para un péptido relacionado con una malignidad hematológica en un paciente, tal como un humano. En general, las respuestas de linfocitos T pueden favorecerse mediante el uso de ácidos nucleicos heterólogos que codifican péptidos relativamente cortos (por ejemplo, que comprenden menos de 23 residuos de aminoácido consecutivos de un péptido relacionado con una malignidad hematológica nativo, preferentemente 4-16 residuos consecutivos, más preferentemente 8-16 residuos consecutivos y aún más preferentemente 8-10 residuos consecutivos). Como alternativa, o adicionalmente, una vacuna puede comprender un inmunoestimulador que preferencialmente potencia una respuesta inmunitaria de linfocitos T. En otras palabras, el inmunoestimulador puede potenciar el nivel de una respuesta de linfocitos T a un péptido relacionado con una malignidad hematológica en una cantidad que es proporcionalmente mayor que la cantidad en la que se potencia una respuesta de anticuerpo. Por ejemplo, cuando se compara con un adyuvante de base oleaginosa estándar, tal como CFA, un inmunoestimulador que preferencialmente potencia una respuesta de linfocitos T puede potenciar una respuesta proliferativa de linfocitos T al menos doblándola, una respuesta lítica de la menos el 10%, y/o una activación de de linfocitos T de al menos el doble comparada con la de las líneas celulares de control negativo relacionadas con malignidades hematológicas, mientras que no potencia de forma detectable una respuesta de anticuerpos. La cantidad en la que se potencia una respuesta de linfocitos T o anticuerpos a un polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo puede determinarse generalmente usando cualquier técnica representativa conocida en la técnica, tales como las técnicas que aquí se proporcionan.
- 45
- 50
- 55

- 60 Una composición farmacéutica o vacuna puede contener secuencia de ácido nucleico que codifican uno o más de

los antígenos cancerosos como se describe anteriormente, de modo que dicho polipéptido se genera in situ. Como se señala anteriormente, el ADN puede estar presente en diversos sistemas de suministro conocidos por los expertos en la técnica, incluidos sistemas de expresión de ácidos nucleicos, sistemas de expresión bacterianos o víricos y sistemas de expresión de mamíferos. Numerosas técnicas de suministro de genes son bien conocidas en la técnica (Rolland, 1998, y referencias que ahí se citan). Los sistemas de expresión de ácidos nucleicos adecuados contiene las secuencias de ADN, ADNc o ARN necesarias para la expresión en el paciente (tales como señales promotoras y de terminación adecuadas). Los sistemas de suministro bacterianos implican la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que exprese una porción inmunogénica del péptido en su superficie celular o que secrete dicho epítipo. En una realización preferida, el ADN puede introducirse usando un sistema de expresión vírico (*por ejemplo*, virus vaccinia u otros poxvirus, retrovirus o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus replicativamente competente no patogénico (defectivo) (Fisher-Hoch y col., 1989; Flexner y col., 1989; Flexner y col., 1990; patente de EE. UU. N° 4.603.112, patente de EE. UU. N° 4.769.330, patente de EE. UU. N° 5.017.487; publicación de solicitud de patente internacional N° WO 89/01973; patente de EE. UU. N° 4.777.127; patente de Gran Bretaña N° GB 2.200.651; patente europea N° EP 0.345.242; publicación de solicitud de patente internacional N° WO 91/02805; Berkner, 1988; Rosenfeld y col., 1991; Kolls y col., 1994; Kass-Eisler y col., 1993; Guzman y col., 1993a; y Guzman y col., 1993). Las técnicas para incorporar ADN en dichos sistemas de expresión son bien conocidas por los expertos en la técnica. Resultará evidente que una vacuna puede comprender tanto un componente de polinucleótido como uno péptido. Dichas vacunas pueden proporcionar una respuesta inmunitaria potenciada.

Resultará evidente para los expertos en la técnica que se benefician de las presentes enseñanzas que una vacuna puede contener vehículos farmacéuticamente aceptables. Las expresiones "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial significativa cuando se administran a un animal o a un humano, según convenga. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto, en la medida de lo posible, cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en la composición terapéutica está contemplado. Para la administración en humanos, las preparaciones deberían cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales requeridos por el departamento de estándares biológicos de la Administración para alimentos y fármacos de los Estados Unidos. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

Mientras que cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica se puede emplear en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones de la presente invención se pueden formular para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo por ejemplo, administración oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo preferentemente comprende agua, salino, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, puede emplearse cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato poliglicolato) pueden emplearse también como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Microesferas biodegradables adecuadas se divulgan, por ejemplo, en las patentes de EE. U. N° 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344 y 5.942.252. Para determinadas aplicaciones tópicas, se prefieren formulaciones en forma de crema o lociones, usando componentes bien conocidos.

Dichas composiciones pueden comprender también tampones (por ejemplo, salino tamponado neutro o salino tamponado con fosfato), hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, péptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidante, bacterioestáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hacen a la disolución isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica respecto de la sangre del receptor, agentes de suspensión, agentes espesante y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado, o formularse con uno o más liposomas, microesferas, nanopartículas o sistemas de administración micronizados usando tecnología bien conocida.

Cualquiera de una variedad de inmunoestimuladores, tales como adyuvantes, puede emplearse en la preparación de composiciones de vacuna de la presente invención. La mayoría de adyuvantes contiene una sustancia encargada de proteger al antígeno de un catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de respuestas inmunitarias, tal como lípido A o proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Adyuvantes adecuados están disponibles en el mercado como, por ejemplo, adyuvantes basados en aluminio (por ejemplo, Alhydrogel, Rehydrogel, fosfato de aluminio, Algammulin, hidróxido de aluminio), adyuvantes basado en aceite (adyuvante incompleto e incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Specol, RIBI, Titer-Max, Montanide ISA50 o Seppic MONTANIDE ISA 720), adyuvantes no iónicos basados en copolímeros de bloque, citocinas (por ejemplo, GM-CSF o ligando Flat3), adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA), sales de calcio, hierro o zinc, una suspensión insoluble de tirosina acetilada, azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados, polifosfacenos, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A y Quil A. Citocinas tales como GM-CSF o interleucina-2, -7 o -12 también pueden

usarse como adyuvantes.

- 5 Hemocianinas y hemoeritrinas también pueden usarse en la invención. El uso de hemocianina de lapa californiana (KLH) se prefiere particularmente, aunque pueden emplearse otras hemocianinas y hemoeritrinas de moluscos y artrópodos. Varios adyuvantes polisacáridos pueden usarse también. Las variedades poliamina de polisacáridos se prefieren particularmente, tales como quitina y quitosano, incluida quitina desacetilada.
- Otro grupo preferido de adyuvantes son los grupos muramil dipéptidos (MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) de peptidoglicanos bacterianos. Los derivados de muramil dipéptidos, tales como el derivado de aminoácido treonil-MDP, y el derivado de ácido graso MTPPE, también se contemplan.
- 10 La patente de EE. UU. N° 4.950.645 describe un derivado disacárido tripéptido lipofílico de muramil dipéptido que se propone para su uso en liposomas artificiales formados a partir de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol. Se dice que es efectivo para activar monocitos humanos y destruir linfocitos Tumorales, pero no es tóxico en dosis generalmente altas. Los compuestos de la patente de EE. UU. N° 4.950.645 y de la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 91/16347 también se proponen para su uso para lograr aspectos particulares de la presente invención.
- 15 El BCG y el esqueleto de la pared celular del BCG (CWS) pueden usarse también como adyuvantes en la invención, con o son dimicolato de trehalosa. El dimicolato de trehalosa puede usarse por sí mismo. Azuma y col. (1988) muestra que la administración de dimicolato de trehalosa se corresponde con una resistencia aumentada a la infección por virus de la gripas en ratones. El dimicolato de trehalosa puede prepararse como se describe en la patente de EE. UU. N° 4.579.945.
- 20 Los agentes anfipáticos y activos de superficie, por ejemplo, saponina y derivados tales como QS21 (Cambridge Biotech) constituyen otro grupo más de adyuvantes preferidos para su uso con los inmunógenos de la presente invención. Tensioactivos no iónicos de copolímeros de bloque (Rabinovich y col., 1994, Hunter y col., 1991) también pueden emplearse. Los oligonucleótidos, como se describen en Yamamoto y col., (1988) son otro grupo de adyuvantes útiles. Quil A y lentilla también son adyuvantes preferidos.
- 25 Los superantígenos también se contemplan para su uso como adyuvantes en la presente invención. Los "superantígenos" son generalmente productos bacterianos que estimulan una mayor proporción de linfocitos T que de antígenos peptídicos sin la necesidad de procesamiento antigénico (Money y col., 1994). Los superantígenos incluyen exoproteínas de *Staphylococcus* tales como las enterotoxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de *S. aureus* y *S. epidermidis*, y las exotoxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de *E. coli*.
- 30 Las enterotoxinas comunes de *Staphylococcus* son conocidas como enterotoxina A de estafilococo (SEA) y enterotoxina B de estafilococo (SEB), estando descritas las enterotoxinas a través de E (SEE) (Rott y col., 1992). *Streptococcus pyogenes* B (SEB), la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Bowness y col., 1992), la proteínas citoplasmática asociada a membrana (CSP) de *S. pyogenes* (Sato y col., 1994) y la toxina 1 de síndrome de choque tóxico (TSST-1) de *S. aureus* (Schwab y col., 1993) son otros superantígenos útiles.
- 35 Un grupo de adyuvantes particularmente preferido para su uso en la invención son las endotoxinas desintoxicadas, tales como la toxina desintoxicada refinada de la patente de EE. UU. N° 4.866.034. Estas endotoxinas desintoxicadas refinadas son efectivas para la producción de respuestas adyuvantes en mamíferos.
- 40 Las endotoxinas desintoxicadas pueden combinarse con otros adyuvantes. La combinación de endotoxinas desintoxicadas con dimicolato de trehalosa se contempla, como se describe en la patente de EE. UU. N° 4.435.386. Las combinaciones de endotoxinas desintoxicadas con dimicolato de trehalosa y glicolípidos endotóxicos también se contempla (patente de EE. UU. N° 4.505.899), así como la combinación de endotoxinas desintoxicadas con esqueleto de pared celular (CWS) o CWS y dimicolato de trehalosa, como se describe en las patentes de EE. UU. N° 4.436.727, 4.436.728 y 4.505.900. También se prevé que sean útiles las combinaciones de solo CWS y dimicolato de trehalosa, sin endotoxinas desintoxicadas, como se describe en la patente de EE. UU. N° 4.520.019.
- 45 El MPL es actualmente un agente inmunopotenciador preferido para su uso aquí. Referencias que tratan los usos de MPL incluyen Tomai y col., (1987), Chen y col. (1991) y Garg y Subbarao (1992), cada una de las cuales tratan ciertas funciones de MPL en las reacciones de ratones que envejecen; Elliott y col. (1991), que se trata del ratón cargado con D-galactosamina y su sensibilidad potenciada a lipopolisacárido y a MLP; Chase y col. (1986), que se refiere a infecciones bacterianas; y Masih y col. (1988), que describe los efectos de MPL y endotoxinas en la resistencia de ratones a *Toxoplasma gondii*. Fitzgerald (1991) también informó del uso de MPL para regular al alza la
- 50 inmunogenicidad de una vacuna contra la sífilis y para conferir una protección significativa contra infecciones a las que se exponga a conejos.
- 55 Baker y col. (1992) analizó además las características estructurales que influyen en la capacidad de un lípido A y sus análogos para anular la expresión de la actividad supresora de las linfocitos T. Informaron de que reducir el número de grupos fosfato en el lípido A de dos a uno (es decir, crear monofosforil lípido A, MPL), así como reducir el contenido en ácidos grasos, principalmente eliminando el residuo de la posición 3, tenía como resultado una reducción progresiva de la toxicidad; sin embargo, estas modificaciones estructurales no tuvieron influencia en su capacidad para anular la función de expresión de los T (Baker y col., 1992). Estos tipos de MPL son ideales para su uso en la

presente invención.

En una línea de trabajo generalmente relacionada, Tanamoto y col. (1994a; b; 1995) describieron la disociación de actividades endotóxicas en un precursor de lípido A químicamente sintetizado después de la acetilación o la succinilación. Así, compuestos tales como "acetilo 406" y "succinilo 516" (Tanamoto y col., 1.994a; b; 1995) también se contemplan para su uso en la presente invención.

Los MPL sintéticos forman un grupo particularmente preferido de adyuvantes. Por ejemplo, Brade y col. (1993) describieron un glicoconjugado artificial que contenía el esqueleto de disacáridos de glucosamina bisfosforilada del lípido A que se une a AcM anti-lípido A. Este es un candidato para su uso en ciertos aspectos de la invención.

Los derivados de MPL descritos en la patente de EE. UU. N° 4.987.237 se contemplan particularmente para su uso en la presente invención. La patente de EE. UU. N° 4.987.237 describe derivados de MPL que contienen uno o más grupos libres, tales como aminas, en una cadena lateral unida a los grupos hidroxilo primarios del núcleo del monofosforil lípido A a través de un grupo éster. Los derivados proporcionan un procedimiento adecuado para acoplar el lípido A a través del acoplamiento de agentes a diversos materiales biológicamente activos. Las propiedades inmunoestimuladores del lípido a se mantienen. Se prevé el uso de todos los derivados de MPL según la patente de EE. UU. N° 4.987.237 en las células con adyuvante MPL incorporado de la presente invención.

Diversos adyuvantes, incluso los que no se usan comúnmente en humanos, pueden emplearse aun así en animales, donde, por ejemplo, se desee elevar aumentar los anticuerpos u obtener posteriormente linfocitos T activadas. Las toxicidad u otros efectos adversos que pudieran resultar tanto del adyuvante como de las células, por ejemplo, como puede ocurrir al usar linfocitos Tumoraes no irradiadas, es relevante en tales circunstancias.

Dentro de las vacunas que aquí se proporcionan, la composición del adyuvante se diseña preferentemente para inducir una respuesta inmunitaria predominantemente de tipo Th1. Niveles altos de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 a IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células a un antígeno administrado. En contraste, niveles altos de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales. Después de la aplicación de una vacuna como se dispone en el presente documento, un paciente soportará una respuesta inmunitaria que incluye respuestas de tipo Th1 y de tipo Th2. Dentro de una realización preferida, en la que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de las citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden evaluarse fácilmente usando ensayos estándar. Para una revisión sobre las familias de citocinas, ver por ejemplo, Mosmann y Coffman (1989).

Los adyuvantes preferidos para su uso en el desencadenamiento de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Adyuvantes de MPL están disponibles de Corixa Corporation (Seattle, WA, ser por ejemplo, patentes de EE. UU. N° 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094, cada una de las cuales se incorpora al presente documento específicamente por referencia en su totalidad). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente The. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 96/02555 y en la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 99/33488. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras se describen también, por ejemplo, en Sato y col. (1996). Otro adyuvante preferido es una saponina, preferentemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que puede usarse sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema mejorado implica la combinación de un derivado de monofosforil lípido A y saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 94/00153) o una composición menos reactiva en la que la QS21 está apagada con colesterol (ver por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO96/33739). Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Una formulación de adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se ha descrito también (ver por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 95/17210).

Otros adyuvantes preferidos incluyen Montanida ISA 720 (Seppic), SAF (Chiron), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), Detox (Corixa Corporation), RC-529 (Corixa Corporation) y aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP).

Cualquier vacuna que aquí se proporcione puede prepararse usando procedimientos bien conocidos que tiene como resultado la combinación de uno o más antígenos, uno o más inmunoestimuladores o adyuvantes y uno o más vehículos, excipientes o tampones farmacéuticamente aceptables adecuados. Las composiciones aquí descritas pueden administrarse como parte de una formulación de liberación mantenida (es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja o gel [compuesto por polisacáridos, por ejemplo] que efectúa una liberación lenta del compuesto tras la administración). Dichas formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología bien conocida (Coombes y col., 1996) y administrarse, por ejemplo, por implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación mantenida pueden contener un péptido, polinucleótido o anticuerpo dispersado en una matriz de vehículo y/o contenido en un reservorio rodeado por una membrana que controla la velocidad.

Los vehículos para su uso dentro de dichas formulaciones son preferentemente biocompatibles, y pueden ser también biodegradables, preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. Dichos vehículos incluyen micropartículas de poli(lactido-co-glicólido), así como poliacrilato, látex, almidón, celulosa y dextrano. Otros vehículos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrofílico no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (patente de EE. UU. N° 5.151.254, publicación de solicitud de patente internacional N° WO 94/20078, publicación de solicitud de patente internacional N° WO94/23701; y publicación de solicitud de patente internacional N° WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido en una formulación de liberación sostenida depende del sitio de implantación, la velocidad y duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección que se va a tratar o evitar.

También se contemplan las terapias combinadas, y el mismo tipo de composiciones farmacéuticas de base pueden emplearse tanto para los medicamentos sencillos como para los combinados. Las vacunas y las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en contenedores de dosis unitarias o multidosis, tales como ampollas o viales sellados. Dichos contenedores están preferentemente herméticamente sellados, para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones pueden almacenarse como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos. Alternativamente, una composición de vacuna o farmacéutica se puede almacenar en condiciones de liofilización requiriendo sólo la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de usar.

#### VI. Administración de composiciones farmacéuticas que comprenden el vector de expresión

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores de expresión aquí divulgados pueden administrarse a un individuo con cáncer, típicamente un mamífero por ejemplo, un humano, un chimpancé, un cánido o un felino.

##### A. Administración oral

En algunas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas que comprende los vectores de expresión aquí divulgados pueden administrarse mediante administración oral al individuo. Como tal, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o pueden incluirse en cápsula de gelatina de gelatina dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente en la comida de la dieta.

Los compuestos activos pueden incluso incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucodispersables, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares (Mathiowitz y col., 1997; Hwang y col., 1998; patente de EE. UU. N° 5.641.515, patente de EE. UU. N° 5.580.579 y patente de EE. UU. N° 5.792.451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, goma arábica, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina pueden añadirse, o un agente aromatizante, tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosis unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como revestimiento o para modificar de otro modo la forma física de la dosis unitaria. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden estar revestidas con goma shellac, azúcar, o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un tinte y un aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosis unitaria debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades en que se emplea. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Típicamente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente un 0,1% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del(de los) ingrediente(s) activo(s) puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 o 2% y aproximadamente el 60 o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. De forma natural, la cantidad del(de los) compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar en una forma tal que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, tiempo de vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por alguien experto en la técnica de preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una diversidad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Para administración oral las composiciones de la presente invención pueden incorporarse alternativamente con uno o más excipientes en forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucodispersable, aerosol oral, o una formulación sublingual administrada oralmente. Por ejemplo, un enjuague bucal puede prepararse incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una solución de borato de sodio (solución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse en una solución oral, tal como una que contenga borato sódico, glicerina y bicarbonato de sodio, o dispersarse en un dentífrico, o añadirse en una cantidad terapéuticamente efectiva a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes,

agentes espumantes y humectantes. Alternativamente, puede darse a las composiciones forma de comprimido o solución que puede colocarse debajo de la lengua o disolverse de otro modo en la boca.

## B. Administración por inyección

5 En determinadas circunstancias será deseable administrar las composiciones farmacéuticas aquí divulgadas parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal como se describe en la patente de EE. UU. 5.543.158, en la patente de EE. UU. 5.641.515 y en la patente de EE. UU. 5.399.363. Las soluciones de los compuestos activos como sales de base libre o farmacéuticamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de EE.UU. 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en el grado en que exista inyectabilidad fácil. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como una lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y/o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede facilitar por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido debería hacerse isotónico en primer lugar con suficiente salino o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, un medio acuoso estéril que se puede emplear se conocerá por aquellos expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y, o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª edición, págs. 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deberían cumplir con la esterilidad, pirogenicidad, y los estándares de seguridad y pureza generales que requiere el departamento de estándares biológicos de la FDA.

40 Las soluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de filtración esterilizada. Generalmente, las dispersiones se prepararan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente filtrada en esterilización.

45 Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trietilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán en una manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en diversidad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

55 Como se usa en el presente documento, "vehículo" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones de transporte, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto, en la medida de lo posible, cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en la composición - terapéutica está contemplado. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

60

La expresión "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción perjudicial alérgica o similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o como suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolverse o suspenderse en un líquido antes de ser inyectadas también pueden prepararse. La preparación también puede emulsionarse.

### C. Administración nasal

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante aerosoles intranasales, inhalación y/o otros vehículos de administración por aerosoles. Procedimientos para administrar genes, ácidos nucleico y composiciones peptídicas directamente a los pulmones mediante aerosoles nasales se han descrito por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.756.353 y en la patente de EE. UU. 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga y col., 1998) y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de EE. UU. 5.725.871) también son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. De forma similar, la administración de fármacos transmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de EE. UU. 5.780.045.

### D. Administración mediada por liposomas, nanocápsulas y micropartículas

En determinadas realizaciones, los inventores contemplan el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para administración encapsuladas bien en una partícula lipídica, bien en un liposoma, bien en una vesícula, bien en una nanosfera, o bien en una nanopartícula o similar.

Dichas formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o constructos aquí divulgados. La formación y el uso de liposomas se conocen generalmente por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Couvreur y col., 1977; Couvreur, 1988, Lasic, 1998; que describe el uso de liposomas y nanocápsulas en la terapia dirigida con antibióticos para infecciones y enfermedades bacterianas intracelulares). Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad en suero y semivida en circulación mejoradas (Gabizon y Papahadjopoulos, 1988; Allen y Choun, 1987; patente de EE. UU. 5.741.516). Además, se han revisado diversos procedimientos de preparaciones de liposomas y de tipo liposoma como potenciales vehículos para fármacos (Takakura, 1998; Chadran y col., 1997; Margalit, 1995; patente de EE. UU. 5.567.434; patente de EE. UU. 5.552.157, patente de EE. UU. 5.565.213, patente de EE. UU. 5.738.868 y patente de EE. UU. 5.795.587).

Se empleado con éxito liposomas con varios tipos de células que normalmente son resistentes a transfección por otros procedimientos incluyendo suspensiones de linfocitos T, cultivos de hepatocitos primarios y células PC 12 (Renneisen y col., 1990; Muller y col., 1990). Además, los liposomas están libres de las restricciones de la longitud del ADN que son típicas de los sistemas de administración basados en virus. Los liposomas se han utilizado de forma efectiva para introducir genes, fármacos (Heath y Martin, 1986; Heath y col., 1986; Balazsovits y col., 1989; Fresta y Puglisi, 1996) agentes radioterapéuticos (Pikul y col., 1987), enzimas (Imaizumi y col., 1990a; Imaizumi y col., 1990b), virus (Faller y Baltimore, 1984), factores de transcripción y efectores alostéricos (Nicolau y Gersonde, 1979) en diversidad de líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han completado varios ensayos clínicos exitosos que examinaban la efectividad de la administración de fármacos mediada por liposomas (Lopez-Berestein y col., 1.985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier y col., 1988). Además, varios estudios sugieren que el uso de liposomas no se asocia con respuestas autoinmunes, toxicidad o localización gonadal tras administración sistémica (Mori y Fukatsu, 1992).

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y que forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tiene diámetros de desde 25 nm a 4 µm. La sonicación de MVL tiene como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å que contiene una solución acuosa en el núcleo.

Los liposomas guardan un parecido con las membranas celulares y se contempla su uso en relación con la presente invención como vehículos para las composiciones peptídicas. Son ampliamente adecuados, ya que pueden incluirse en ellos sustancias tanto solubles en agua como en lípidos, es decir, en los espacios acuosos y dentro de la bicapa misma, respectivamente. Es posible que los liposomas que contienen fármacos puedan emplearse incluso para administración en sitios específicos de agentes activos modificando selectivamente la formulación liposomal.

Además de la enseñanza de Couvreur y col. (1977; 1988), la siguiente información puede utilizarse para generar formulaciones liposomales. Los fosfolípidos pueden formar diversidad de estructuras distintas de los liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido y agua. A relaciones bajas, el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas sufren una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase conlleva un cambio de una estructura ordenada, con empaquetamiento estrecho, conocida como el estado gel, a una estructura menos ordenada, con un empaquetamiento menos apretado, conocida como el estado fluido. Esto ocurre a

una temperatura de transición de fase característica y tiene como resultado un aumento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

5 Además de la temperatura, la exposición a proteínas puede alterar la permeabilidad de los liposomas. Ciertas proteínas solubles, tales como el citocromo c, se unen, deforman y atraviesan la bicapa, provocando así cambios en la permeabilidad. El colesterol impide esta penetración de las proteínas, aparentemente empaquetando los fosfolípidos más estrechamente. Se contempla que las formaciones de liposomas más útiles para la administración de antibióticos e inhibidores contendrán colesterol.

10 La capacidad para atrapar solutos varía entre los distintos tipos de liposomas. Por ejemplo, las MVL son moderadamente eficaces atrapando solutos, pero las SUV son extremadamente ineficaces. Sin embargo, las SUV ofrecen la ventaja de la homogeneidad y reproducibilidad en la distribución de tamaños, y las vesículas unilamelares gigantes (LUV) ofrecen un compromiso entre el tamaño y la eficacia de atrapamiento. Éstas se preparan por evaporación de éter y son tres o cuatro veces más eficaces en el atrapamiento de solutos que las MLV.

15 Además de las características de los liposomas, un determinante importante en el atrapamiento de compuestos son las propiedades fisicoquímicas del compuesto en sí. Los compuestos quedan atrapados en los espacios acuosos y los compuestos apolares se unen a la bicapa lipídica de la vesícula. Los compuestos polares se liberan mediante permeación o cuando se rompe la bicapa, pero los compuestos apolares permanecen unidos a la bicapa a no se que se rompa por temperatura o exposición a lipoproteínas. Ambos tipos muestran velocidades de flujo máximas a la temperatura de transición de fase.

20 Los liposomas interactúan con las células a través de cuatro mecanismos diferentes: endocitosis por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, tanto por fuerzas débiles inespecíficas hidrófobas como electrostáticas, o por interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana plasmática celular por inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de contenidos liposomales al citoplasma; y por transferencia de lípidos liposomales a membranas celulares o subcelulares, o viceversa, sin asociación alguna de los contenidos liposomales. Frecuentemente es difícil determinar qué mecanismo está operativo y puede operar más de uno al mismo tiempo.

30 El destino y la disposición de los liposomas inyectados por vía intravenosa depende de sus propiedades físicas, tales como el tamaño, la fluidez, y la carga de superficie. Pueden permanecer en tejidos durante horas o días, dependiendo de su composición, y las semividas en la sangre van de minutos a varias horas. Los liposomas más grandes, tales como MLV y LUV, son rápidamente absorbidos por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, pero la fisiología del sistema circulatorio impide la salida de dichas especies grandes en la mayoría de los sitios. Solo pueden salir en sitios donde existen grandes aberturas o poros en el endotelio capilar, tales como los sinusoides del hígado o el bazo. Así, estos órganos son el sitio de absorción predominante. Por otro lado, las SUV muestran una distribución en tejidos más amplia, pero aun así quedan secuestradas en gran medida en el hígado y el bazo. En general, este comportamiento in vivo limita la potencial dirección de liposomas solo hacia aquellos órganos y tejidos accesibles para su gran tamaño. Éstos incluyen la sangre, el hígado, el bazo, la médula ósea y los órganos linfoides.

40 La dirección no es generalmente una limitación en términos de la presente invención. Sin embargo, si se deseara una dirección específica, hay procedimientos disponibles para lograrlo. Pueden usarse autoanticuerpos para unirlos a la superficie del liposoma y para dirigir el anticuerpo y su contenido en fármacos hacia receptores de antígeno específicos situados en la superficie de un tipo de célula específico. Los determinantes de hidratos de carbono (componentes de superficie de glicoproteínas o glicolípidos que juegan un papel en el reconocimiento, la interacción y la adhesión celular) pueden usarse también como sitios de reconocimiento, ya que tienen potencial para dirigir liposomas a tipos de células concretos. Principalmente, se contempla el uso de la inyección intravenosa de preparaciones de liposomas, pero otras rutas de administración también se conciben.

45 Alternativamente, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de forma estable y reproducible (Henry-Michelland y col., 1987; Quintanar-Guerrero y col., 1998; Douglas y col., 1987). Para evitar efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$ ) deberían diseñarse usando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención. Dichas partículas pueden ser se fabrican fácilmente, como se describe (Couvreur y col., 1980; 1988; en Muhlen y cols, 1998; Zambaux y col. 1998; Pinto-Alphandry y col., 1995 y en la patente de EE. UU. 5.145.684).

## VII. Agentes de unión

55 La presente invención proporciona además agentes, tales como anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno, que se unen específicamente a un antígeno canceroso o a un oncogén codificado por el ácido nucleico heterólogo del vector de expresión de la invención. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de unión a antígeno, se dice que "se une específicamente" a una proteína si reacciona a un nivel detectable, es decir, al menos dos veces por encima de la señal de fondo (por ejemplo, en un ELISA) con la proteína (es decir, antígeno canceroso u oncogén), y no reacciona de forma detectable con proteína no relacionadas bajo condiciones similares.

Como se usa en el presente documento, "que se une" se refiere a una asociación no covalente entre dos moléculas distintas de forma que se forma un complejo. La capacidad de unión puede evaluarse, por ejemplo, determinando una constante de unión para la formación del complejo. La constante de unión es el valor obtenido cuando la concentración del complejo se divide entre el producto de las concentraciones de los componentes. En general, se dice que dos compuestos "se unen" en el contexto de la presente invención, cuando la constante de unión para la formación del complejo excede de aproximadamente  $10^3$  l/mol. La constante de unión puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los agentes de unión pueden además ser capaces de diferenciar entre pacientes con y sin cáncer, tal como cáncer de mama, ovárico, de colon, pulmón o próstata, usando los ensayos representativos que aquí se proporcionan. En otras palabras, los anticuerpos u otros agentes de unión que se unen a una proteína concreta (es decir, antígeno canceroso) generarán una señal que indique la presencia de un cáncer en al menos aproximadamente el 20% de los pacientes con la enfermedad, y generarán una señal negativa que indique la ausencia de la enfermedad en al menos aproximadamente el 90% de individuos sin el cáncer. Para determinar si un agente de unión satisface este requisito, pueden ensayarse muestras biológicas (por ejemplo, sangre, plasma, orina y/o biopsias de tumores) de pacientes con y sin cáncer (determinado usando pruebas clínicas estándar) como aquí se describe para evaluar la presencia de polipéptidos que se unen al agente de unión. Resultará evidente que una cantidad estadísticamente significativa de muestras con y sin la enfermedad deberían ensayarse. Cada agente de unión debería satisfacer los criterios anteriores; sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que los agentes de unión pueden usarse en combinación para mejorar la sensibilidad.

Cualquier agente que satisfaga los requisitos anteriores puede ser un agente de unión. Por ejemplo, un agente de unión puede ser un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. En una realización preferida, un agente de unión es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión a antígeno. Los anticuerpos pueden prepararse mediante diversas técnicas Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). En general, los anticuerpos puede producirse mediante técnicas de cultivo celular, incluida la generación de anticuerpos monoclonales como aquí se describe, o mediante transfección de genes de anticuerpos a células huésped bacterianas o de mamíferos adecuadas, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, un inmunógeno que comprende, por ejemplo, un polipéptido de fusión de la secuencia correspondiente a la unión entre los polipéptidos individuales de una proteína, polipéptido o proteína de fusión de interés (denominada "región de unión", se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta etapa, las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés de la región de unión de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención pueden servir como el inmunógeno sin modificación. Alternativamente, particularmente para secuencias relativamente cortas, puede desencadenarse una respuesta inmunitaria superior si la secuencia está unida a una proteína transportadora, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. Los inmunógenos se inyectan dentro del huésped animal, preferentemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido de fusión pueden purificarse entonces a partir de dichos antisueros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad usando el polipéptido de fusión acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos policlonales creados para las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la invención pueden seleccionarse para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés y no con los componentes polipeptídicos individuales de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Esta selección puede lograrse eliminando anticuerpos que tienen reacciones cruzadas con los componentes polipeptídicos individuales de las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés.

Alternativamente, los anticuerpos que reconocen cada uno o todos los componentes polipeptídicos a las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden ser útiles en el contexto de la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de fusión inmunogénico de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein (1976 Eur. J. Immunol. 6:511-59, y Brevemente, estos procedimientos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tengan la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Tales líneas celulares se pueden producir, por ejemplo, a partir de células del bazo obtenidas de un animal inmunizado como se describe anteriormente. Las células del bazo se immortalizan después mediante, por ejemplo, fusión con un compañero de fusión de células de mieloma, preferentemente uno que es singénico con el animal inmunizado. Se puede emplear una diversidad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células del bazo y las células de mieloma se pueden combinar con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y disponerse después en placas a baja densidad en un medio selectivo que da soporte al crecimiento de las células híbridas, pero no a las células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, usualmente aproximadamente 1 o 2 semanas, se observaron las colonias de híbridos. Se seleccionan colonias sueltas y se ensayan sus sobrenadantes de cultivo para evaluar la actividad de unión contra el polipéptido de fusión. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar a partir de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, diversas técnicas se pueden emplear para mejorar el rendimiento, tales como inyección de la

5 línea celular de hibridoma dentro de la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales se pueden recoger después del fluido de ascitis o de la sangre. Se pueden eliminar los contaminantes de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación, y extracción. Los polipéptidos de fusión de la presente invención pueden usarse en el procedimiento de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía de afinidad.

10 En determinadas realizaciones, el uso de fragmentos de unión de antígeno de anticuerpos puede preferirse. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas estándar. Brevemente, las inmunoglobulinas pueden purificarse a partir de suero de conejo por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A (Harlow y Lane, supra) y digerirse con papaína para dar fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A.

15 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden acoplarse a uno o más agentes terapéuticos. Los agentes adecuados en este aspecto incluyen radionúclidos, inductores de diferenciación, fármacos, toxinas y sus derivados. Los radionúclidos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ , y  $^{212}\text{Bi}$ . Los fármacos preferidos incluyen metotrexato y análogos de pirimidina y purina. Los inductores de diferenciación preferidos incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Las toxinas preferidas incluyen ricino, abrina, toxina de la Difteria, toxina del cólera, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella*, y proteína antiviral de ombú.

20 Un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, por enlace covalente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directo o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo de enlace). Es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o un grupo sulfhidrilo, sobre uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contenga carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

25 Alternativamente, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo a través de un grupo de enlace. Un grupo de enlace puede funcionar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente con el fin de evitar la interferencia con las capacidades de unión. Un grupo de enlace también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente o un agente o un anticuerpo, y así aumentar la eficacia del acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales en agente, que de otro modo no sería posible.

30 Resultará evidente para los expertos en la técnica que diversos reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL), pueden emplearse como grupo de enlace. El acoplamiento puede realizarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos hidrocarbonados oxidados. Hay numerosas referencias que describen dicha metodología, incluidas, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.671.958.

35 Donde un agente terapéutico sea más potente cuando esté libre de la porción de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo de enlace que sea escindible durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito una serie de grupos de enlace escindibles diferentes. El mecanismo para la liberación intracelular de un agente de estos grupos de enlace incluye la escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.489.710), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.625.014), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivadas (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.638.045), por hidrólisis sérica mediada por el complemento (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.671.958), y por hidrólisis catalizada por ácidos (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.569.789).

45 Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, múltiples moléculas de un agente se acoplan a una molécula de anticuerpo. En otra realización, más de un tipo de agente puede acoplarse a un anticuerpo. Independientemente de la realización concreta, los inmunoconjugados con más de un agente puede prepararse de diversas maneras. Por ejemplo, puede acoplarse más de un agente a una moléculas de anticuerpo directamente, o enlazadores que proporcionan múltiples sitios de unión pueden emplearse. Alternativamente, puede utilizarse un transportador.

50 Un transportador puede llevar los agentes de diversas maneras, incluyendo el enlace covalente directo o a través de un grupo de enlace. Los transportadores adecuados incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.507.234), péptidos y polisacáridos tales como, por ejemplo, aminodextrano (por ejemplo, patente de EE. UU. N° 4.699.784). Un transportador también puede llevar un agente por enlace no covalente o por encapsulación, tal como dentro de una vesícula de liposoma (por ejemplo, patentes de EE. UU. N° 4.429.008 y 4.873.088). Los transportadores específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.735.792 divulga moléculas pequeñas radiohalogenadas representativas y sus síntesis. Un quelato radionúclido puede formarse quelando compuestos que incluyen aquellos que contienen átomos de nitrógeno y azufre como átomos donadores para unirse al radionúclido metálico o de óxido metálico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.673.562 divulga compuestos quelantes representativos y sus síntesis.

Puede usarse una variedad de rutas de administración para los anticuerpos e inmunoconjugados. Típicamente, las

administración será intravenosa, intramuscular, subcutánea o en el lecho de un tumor reseccionado. Será evidente que la dosis precisa del anticuerpo/inmunoconjugado variará dependiendo del anticuerpo empleado, la densidad de antígeno en el tumor, y la velocidad de eliminación del anticuerpo.

### VIII. Linfocitos T

- 5 Las composiciones inmunoterapéuticas pueden comprender también, o alternativamente, linfocitos T específicas para proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de la presente invención. Dichas células pueden prepararse generalmente in vitro o ex vivo, usando procedimientos estándar. Por ejemplo, las linfocitos T pueden aislarse a partir de médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un paciente, usando un sistema de separación de células comercialmente disponible (ver también, patente de EE. UU. N° 5.240.856 y 5.215.926; 10 WO89/06280; WO 91/16116 y WO 92/07243). Alternativamente, las linfocitos T pueden derivar de líneas celulares o cultivos humano relacionados o no relacionados o de mamíferos no humanos.

- 15 Las linfocitos T pueden estimularse con un antígeno canceroso u oncogén, un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso u oncogén y/o una células presentadora de antígeno (APC) que expresa dicho polipéptido. Dicha estimulación se lleva a cabo bajo condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la generación de linfocitos T que son específicas para el polipéptido de fusión. Preferentemente, el polipéptido o polinucleótido está presente dentro de un vehículo de administración, tal como una microesfera, para facilitar la generación de linfocitos T específicas.

- 20 Las linfocitos T se consideran específicas para un polipéptido en particular si las linfocitos T se dirigen a células revestidas con el polipéptido o que expresan un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión. La especificidad de la linfocitos T puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de técnicas estándar. Por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o un ensayo de proliferación, un índice de estimulación de un aumento de más del doble en lisis y/o proliferación, en comparación con controles negativos, indica la especificidad de las linfocitos T. Tales ensayos pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Chen y col. (1994) Cancer Res. 54:1065-1070. Alternativamente, la 25 detección de la proliferación de linfocitos T puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, las proliferación de linfocitos T puede detectarse midiendo una velocidad aumentada de síntesis de ADN (por ejemplo, marcaje por pulsos de cultivos de linfocitos T con timidina tritiada y medida de la cantidad de timidina tritiada incorporada al ADN). El contacto con un polipéptido (100 ng/ml-100 µg/ml, preferentemente 200 ng/ml-25 µg/ml) durante 3-7 días debería tener como resultado un aumento de al menos dos veces la proliferación de la linfocitos T. El contacto como se describe anteriormente durante 2-3 horas debería tener como resultado la activación de las 30 linfocitos T, medido usando ensayo de citocinas estándar en los que un aumento de dos veces en el nivel de liberación de citocinas (por ejemplo, TNF o IFN-γ) es indicativo de activación de linfocitos T (ver, Coligan y col., Current Protocols in Immunology, vol. 1, Wiley Interscience, Greene (1998)). Las linfocitos T que se han activado en respuesta a un polipéptido, polinucleótido o APC que expresa un polipéptido pueden ser CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>. Las linfocitos T específicas de antígeno canceroso pueden expandirse usando técnicas estándar. En realizaciones preferidas, las linfocitos T derivan de un paciente o de un donante relacionado o no relacionado, y se administran al paciente después de la estimulación y la expansión.

- 40 Con fines terapéuticos, pueden expandirse en número linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que proliferan en respuesta a un polipéptido, polinucleótido o APC, tanto in vitro como in vivo. La proliferación de dichas linfocitos T in vitro puede lograrse de diversas formas. Por ejemplo, las linfocitos T pueden reexponerse a un polipéptido con o sin la adición de factores de crecimiento de linfocitos T, tales como interleucina-2, y/o células estimuladoras que sintetizan un polipéptido. Alternativamente, una o más linfocitos T que proliferan en presencia de un polipéptido pueden expandirse en número por clonación. Los procedimientos para clonar células son bien conocidos en la técnica, e incluyen dilución limitante. Después de la expansión, las células pueden administrarse de vuelta al paciente como se describe, por 45 ejemplo, en Chang y col. (1996) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 22:213.

### 45 IX. Respuesta inmunitaria codificada por el ácido nucleico heterólogo

#### A. Detección de una respuesta inmunitaria

- 50 En un aspecto de la invención, se usan proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión (o polinucleótidos que codifican proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión) para generar una respuesta inmunitaria al polipéptido heterólogo, incluido el expresado en una malignidad a la que el polipéptido heterólogo está asociado. Ejemplos representativos de tales malignidades incluyen cánceres de mama, ovárico, de colon, pulmón y próstata. Una respuesta inmunitaria a la proteína, una vez generada por proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, puede tener una vida larga y puede detectarse tiempo después de la inmunización, independientemente de si la proteína está presente o ausente en el cuerpo en el momento de realizar la prueba. Una respuesta inmunitaria a la proteína generada por reacción a las 55 proteínas, polipéptidos o péptidos de fusión puede detectarse examinando la presencia o ausencia, o potenciación, de la activación específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> o por anticuerpos. Por ejemplo, las linfocitos T aisladas a partir de un individuo inmunizado por técnicas rutinarias (por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica) se incuban con una proteína, polipéptido o proteína de fusión. Por ejemplo, las linfocitos T pueden incubarse in vitro durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37°C con una proteína, polipéptido o proteína de fusión (típicamente 5 µg/ml de proteína total o número de células que sintetizan la proteína 60 graduado). Puede ser deseable incubar otra alícuota de una muestra de linfocitos T en ausencia de la proteína,

polipéptido o péptido de fusión para servir como control.

La activación específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> puede detectarse de diversas maneras. Los procedimientos para detectar la activación específica de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a ello, detectar la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas (por ejemplo, linfocinas), o la generación de actividad citolítica (por ejemplo, generación de linfocitos T citotóxicas específicas para una proteína, polipéptido o proteína de fusión que sea un antígeno canceroso). Para las linfocitos T CD4<sup>+</sup>, un método preferido para detectar la activación específica de linfocitos T es la detección de la proliferación de linfocitos T. Para las linfocitos T CD8<sup>+</sup>, un método preferido para detectar la activación específica de linfocitos T es la detección de la generación de actividad citolítica.

La detección de la proliferación de linfocitos T puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de linfocitos T puede detectarse midiendo la velocidad de síntesis de ADN. Las linfocitos T que han sido estimuladas para que proliferen muestran una velocidad de síntesis de ADN aumentada. Una forma típica de medir la velocidad de síntesis de ADN es, por ejemplo, por marcaje con pulsos de cultivos de linfocitos T con timidina tritiada, un precursor de nucleósido que se incorpora en el ADN de nueva síntesis. La cantidad de timidina tritiada incorporada puede determinarse usando un espectrofotómetro de centelleo líquido. Otras formas de detectar la proliferación de linfocitos T incluyen medir los incrementos en la producción de interleucina-2 (IL-2), el flujo de Ca<sup>2+</sup>, o la absorción de un tinte tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Alternativamente, puede medirse la síntesis de linfocinas (por ejemplo, interferón-gamma), o puede cuantificarse el número relativo de linfocitos T que pueden responder a proteína intacta.

#### **B. Detección de producción de anticuerpos.**

La presente invención también se dirige a proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión que, además de ser inmunogénicas para linfocitos T, parecen estimular a la células B para que produzcan anticuerpos capaces de reconocer proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. La detección de dichos anticuerpos proporciona otra forma de diagnosticar una malignidad en la que un antígeno canceroso u oncogén en particular se asocia con la malignidad. Pueden encontrarse anticuerpos específicos (es decir, que muestran una afinidad de unión de aproximadamente 10<sup>7</sup> l/mol o mejor) para proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión en diversidad de fluidos corporales, incluido suero y ascitis. Brevemente, una muestra de fluido corporal se aísla de un animal de sangre caliente, tal como un humano, para el que se desea determinar si los anticuerpos específicos para las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión están presentes. El fluido corporal se incuba con proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión bajo condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se formen inmunocomplejos entre las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión y los anticuerpos específicos para las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. Por ejemplo, un fluido corporal y las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden incubarse a 46°C durante 24-48 horas. Después de la incubación, la mezcla de reacción se ensaya para evaluar la presencia de inmunocomplejos. La detección de uno o más inmunocomplejos formados entre una proteína y anticuerpos específicos para la proteína puede lograrse por diversidad de técnicas conocidas, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA).

Los inmunoensayos adecuados incluyen la técnica de inmunoensayo sándwich de doble anticuerpo monoclonal de David y col. (patente de EE. UU. N° 4.376.110); ensayos sándwich de anticuerpo monoclonal-policlonal (Wide y col., en Kirkham y Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. y S. Livingstone, Edimburgo (1970)); el procedimiento de transferencia de tipo "western" de Gordon y col. (patente de EE. UU. N° 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brow y col. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-4983); ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzima (ELISA) como se describe, por ejemplo, en Raines y col. (1982) J. Biol. Chem. 257: 5154-5160; técnicas inmunocitoquímicas, incluido el uso de fluorocromos (Brooks y col. (1980) Clin. Exp. Immunol. 39:477); y neutralización de actividad (Bowen-Pope y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2396-2400). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, están disponibles una serie de ensayos distintos, incluidos los descritos en las patentes de EE. UU. N° 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Con fines de detección, las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión (es decir, los antígenos) pueden estar marcados o no marcados. Cuando no están marcados, las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión se usan en ensayos de aglutinación. Además, las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión no marcados pueden utilizarse en combinación con moléculas marcadas que son reactivas con inmunocomplejos, o en combinación con anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios) que son reactivos con el anticuerpo dirigido contra las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, tales como anticuerpos específicos para inmunoglobulinas. Alternativamente, las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden estar marcados directamente. Donde esté marcado, el grupo indicador puede incluir, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, enzimas, luminiscentes, partículas de tinte y similares. Estos y otros marcadores son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. N° 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; 3.996.345; y 4.233.402

Típicamente en un ELISA, la proteína, polipéptido o proteína de fusión de interés está adsorbido a la superficie de un pocillo de microtitulación. Los sitios de unión a proteína residuales de la superficie se bloquean entonces con un agente adecuado, tal como albúmina de suero bovino (BSA), suero de cabra normal inactivado por calor (NGS) o BLOTTO (solución tamponada de leche desnatada en polvo que también contiene un conservante, sales y un agente antiespumante). Se incuba entonces el pocillo con una muestra que se sospecha que contiene anticuerpo específico. La muestra puede aplicarse pura o, más habitualmente, puede diluirse, normalmente en una solución

tamponada que contiene una cantidad pequeña (0,1%-5,0% en peso) de proteína, tal como BSA, NGS o BLOTTO. Después de la incubación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de uniones específicas, se lava el pocillo para eliminar la proteína que no se ha unido y se incuba después con anticuerpo inmunoglobulina específica anti-especie marcado con un grupo indicador. El grupo indicador puede escogerse de una variedad de

5 enzimas, incluidas, por ejemplo, peroxidas de rábano, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, y glucosa oxidasa. Se deja que pase tiempo suficiente para que tenga lugar la unión específica, después se lava el pocillo de nuevo para eliminar el conjugado no unido, y se añade el sustrato para la enzima. Se deja que se desarrolle el color y la densidad óptica de los contenidos del pocillo se determina visualmente o instrumentalmente.

10 En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, un grupo indicador de une a la proteínas, polipéptido o proteína de fusión de interés. La etapa de detección de inmunocomplejos implica eliminar sustancialmente toda la proteína, polipéptido o proteína de fusión no unido y detectar después la presencia o ausencia del grupo indicador.

15 En otra realización específica, un grupo indicador se une a un anticuerpo secundario capaz de unirse a los anticuerpos específicos para proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión. La etapa de detección de inmunocomplejos implica (a) eliminar sustancialmente todo el anticuerpo no unido, (b) añadir el anticuerpo secundario, (c) eliminar sustancialmente todo el anticuerpo secundario y después (d) detectar la presencia o ausencia del grupo indicador. Donde el anticuerpo específico para las proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión de interés deriven de un humano, el anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-humano.

20 En una tercera realización preferida para detectar inmunocomplejos, un grupo indicador está unido a una molécula capaz de unirse a los inmunocomplejos. La etapa de detección implica (a) añadir la molécula, (b) eliminar sustancialmente todas las moléculas no unidas, y después (c) detectar la presencia o ausencia del grupo indicador. Un ejemplo de una molécula capaz de unirse a los inmunocomplejos es la proteína A.

25 Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden usarse diversidad de procedimientos para detectar los inmunocomplejos dentro de la presente invención. Los grupos reporteros adecuados para su uso en cualquiera de los procedimientos incluyen, por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, enzimas, luminiscentes y partículas de tinte.

30 En un aspecto relacionado de la presente invención, la detección de inmunocomplejos formados entre proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión, y anticuerpos en fluido corporal que son específicos para proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión pueden usarse para monitorizar la eficacia de la terapia contra el cáncer, que implica un antígeno canceroso u oncogen concreto, para una malignidad a la que el antígeno canceroso u oncogen se asocia. Las muestras de fluido corporal tomadas de un individuo antes y después del inicio del tratamiento pueden analizarse para evaluar los inmunocomplejos por los procedimientos descritos anteriormente. Brevemente, el número de inmunocomplejos detectados en ambas muestras se compara. Un cambio sustancial en el número de inmunocomplejos en la segunda muestra (después del inicio de la terapia) en relación con la primera muestra (antes del tratamiento) refleja un tratamiento exitoso.

### 35 X. Terapia contra el cáncer

40 Un aspecto de la presente invención implica utilizar las composiciones inmunogénicas aquí descritas para desencadenar una respuesta inmunitaria específica de un sujeto con un cáncer asociado a oncogen, tal como, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, o cáncer de próstata. Las composiciones inmunogénicas pueden usarse para tratar en cualquier estadio de la enfermedad, es decir, en los estadios de pre-cáncer, cáncer o metástasis, o para evitar la enfermedad.

45 En aspectos adicionales de la presente invención, las composiciones aquí descritas pueden usarse para inmunoterapia del cáncer, tal como cáncer de mama, ovárico, de colon, pulmón y próstata. Dentro de tales procedimientos, composiciones farmacéuticas y vacunas se administran típicamente a un paciente. Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferentemente un humano. Un paciente puede estar o no estar afectado por cáncer. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas y vacunas anteriores pueden usarse para evitar el desarrollo de un cáncer o para tratar a un paciente afectado por un cáncer. Un cáncer puede diagnosticarse usando criterios generalmente aceptados en la técnica, incluyendo la presencia de un tumor maligno. Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse antes o después de la eliminación quirúrgica de tumores primarios y/o tratamiento tal como la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. La administración puede ser por cualquier procedimiento adecuado, incluida la administración por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutáneas, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica, sublingual y oral.

55 Dentro de determinadas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación in vivo del sistema inmune endógeno del huésped para que reacciones contra tumores con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmunitaria (tales como polipéptidos y polinucleótidos de fusión, como aquí se dispone).

Dentro de otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica la administración de agentes con reactividad inmune a tumores establecida (tales como células efectoras o

anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente efectos antitumorales y no dependen necesariamente de un sistema inmune intacto en el huésped. Los ejemplos de células efectoras incluyen linfocitos T como se describe anteriormente, linfocitos T (tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores infiltradores de tumores), células asesinas (tales como células asesinas naturales y células asesinas activadas por linfocinas),  
 5 células B y células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas y macrófagos) que expresan una proteína, polipéptido o proteína de fusión que aquí se proporcione. Los receptores de linfocitos T y los receptores de anticuerpos específicos para los polipéptidos de fusión que aquí se mencionan pueden clonarse, expresarse y transferirse en otros vectores o células efectoras para inmunoterapia adoptiva. Los polipéptidos de fusión aquí proporcionados también pueden usarse para generar anticuerpos o anticuerpos anti-idiotípicos (como se describe  
 10 anteriormente y en la patente de EE. UU. N° 4.918.164) para inmunoterapia pasiva.

Las células efectoras pueden obtenerse generalmente en cantidades suficiente para inmunoterapia adoptiva por crecimiento in vitro, como aquí se describe. Las condiciones de cultivo para expandir células efectoras específicas para un solo antígeno a una cantidad de varios miles de millones manteniendo el reconocimiento de antígeno in vivo son bien conocidas en la técnica. Tales condiciones de cultivo in vitro típicamente utilizan estimulación intermitente  
 15 con antígeno, frecuentemente en presencia de citocinas (tales como IL-2) y células alimentadoras que no se dividen. Como se apunta anteriormente, los polipéptidos de fusión inmunorreactivos según se proporcionan aquí pueden usarse para expandir fácilmente cultivos de linfocitos T específicas de antígeno con el fin de generar una cantidad suficiente de células para inmunoterapia. En particular, las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, macrófagos o células B, pueden pulsarse con polipéptidos de fusión inmunorreactivos o transfeccionarse con uno o  
 20 más polinucleótidos usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno pueden transfeccionarse con un polinucleótido que tiene un promotor apropiado para aumentar la expresión en un virus recombinante u otro sistema de expresión recombinante. Las células efectoras cultivadas para su uso en terapia deben ser capaces de crecer y distribuirse ampliamente y de sobrevivir a largo plazo in vivo. Estudios han mostrado que en las células efectoras cultivadas puede inducirse el crecimiento in vivo y la supervivencia a largo plazo  
 25 mediante estimulación repetida con antígeno suplementado con IL-2 (ver, por ejemplo, Cheever y col. (1997) Immunological Reviews 157:177).

Alternativamente, un vector que expresa un polipéptido de fusión aquí mencionado puede introducirse en células presentadoras de antígeno de un paciente y propagarse por clonación ex vivo para trasplantarlo de vuelta en el mismo paciente. Las linfocitos Transfeccionarse pueden reintroducirse en el paciente usando cualquier medio  
 30 conocido en la técnica, preferentemente en forma estéril por administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

Las rutas y la frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas aquí descritas, así como la dosificación, variarán de individuo a individuo, y pueden establecerse fácilmente usando técnicas estándar.

En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse por inyección (por ejemplo intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), intranasalmente (por ejemplo, por aspiración) u oralmente. Preferentemente pueden administrarse entre 1 y 10 dosis durante un periodo de 52 semanas. Preferentemente, 6 dosis se administran, a intervalos de 1 mes y pueden administrarse vacunaciones de refuerzo periódicamente a partir de  
 35 entonces. Protocolos alternativos pueden ser apropiados para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra como se describe anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmunitaria antitumoral, y está al menos un 10-50% por encima del nivel basal (es decir, sin tratamiento). Dicha respuesta puede monitorizarse midiendo los anticuerpos antitumorales en un paciente o por la generación dependiente de vacuna de células efectoras citolíticas capaces de matar a las linfocitos Tumorales del paciente in vitro. Dichas vacunas deberían ser capaces también de provocar una respuesta inmunitaria que conduzca a unos resultados clínicos mejorados (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia libre de enfermedad total, parcial o más prolongada) en pacientes vacunados en comparación con pacientes no vacunados. En general, para -  
 40 composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos de fusión, la cantidad de cada proteína, polipéptido o proteína de fusión presente en una dosis varía desde aproximadamente 1 µg a 5 mg, preferentemente de 100 µg a 5 mg, y lo más preferentemente, de 5 µg a 250 µg por kilo de huésped. Las dosis adecuadas variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente irán desde aproximadamente 0,1 ml a  
 50 aproximadamente 5 ml.

Preferentemente la dosis es 8 mg o menos de los vectores de expresión aquí descritos por sujeto. Las dosis de administran cuatro veces en intervalos de dos semanas y dos veces más en intervalos de cuatro semanas. Las últimas dos administraciones están pensadas como inmunizaciones de refuerzo.

En general, una dosis y régimen de tratamiento apropiados proporcionan el/los compuesto(s) activo(s) en una  
 55 cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Una respuesta de ese tipo puede monitorizarse estableciendo unos resultados clínicos mejorados (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia libre de enfermedad total, parcial o más prolongada) en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Los incrementos en respuestas inmunitarias preexistentes a un antígeno canceroso u oncogen generalmente se corresponden con unos resultados clínicos mejorados. Dichas respuestas inmunitarias puede evaluarse  
 60 generalmente usando ensayos estándar de proliferación, citotoxicidad o citocinas, que pueden realizarse usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

## XI. Detección del cáncer

### A. Procedimientos de detección del cáncer

En general, un cáncer puede detectarse en un paciente basándose en la presencia de antígenos cancerosos o proteínas de oncogenes y/o polinucleótidos que codifican tales proteínas en una muestra biológica (tal como sangre, suero, plasma, orina y/o biopsias tumorales) obtenida del paciente. En otras palabras, dichas proteínas pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia de un cáncer tal como, por ejemplo, cáncer de mama, ovario, colon, pulmón, próstata, etc. Los agentes de unión que aquí se proporcionan generalmente permiten la detección del nivel el antígeno canceroso u oncogen que se une al agente en la muestra biológica. Pueden usarse cebadores y sondas de polinucleótidos para detectar el nivel que ARNm que codifica un antígeno canceroso u oncogen, que también es indicativo de la presencia o ausencia de un cáncer. En general, una secuencia de un antígeno canceroso u oncogen debería estar presente en un nivel que es al menos tres veces más alto en tejido tumoral que en tejido normal.

Hay diversidad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica para utilizar un agente de unión para detectar marcadores polipeptídicos en una muestra (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, supra). En general, la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente, puede determinarse (a) poniendo en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un agente de unión; (b) detectando en la muestra un nivel de polipéptido que se une al agente de unión; y (c) comparando el nivel de polipéptido con un valor de corte predeterminado.

En una realización preferida, el ensayo implica el uso de un agente de unión inmovilizado en un soporte sólido para que unir y eliminar el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido puede entonces detectarse usando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y se une específicamente al complejo agente de unión/polipéptido. Dichos reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente de unión que se una específicamente al polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se una específicamente al agente de unión, tal como una anti-inmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo competitivo, en el que un polipéptido se marca con un grupo indicador y se deja que se una al agente de unión inmovilizado después de incubar el agente de unión con la muestra. El punto hasta el que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al agente de unión es indicativo de la reactividad de la muestra con el agente de unión inmovilizado. Los polipéptidos útiles para su uso en tales ensayos incluyen antígenos cancerosos u oncogenes de longitud completa y porciones de ellos a los que el agente de unión se une, y proteínas, polipéptidos o proteínas de fusión y porciones de ellas a las que se une el agente de unión, como se describe anteriormente.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la técnica al que la proteína tumoral pueda unirse. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o un disco, tal como cristal, fibra de vidrio, látex o material plástico tal como poliestireno o polivinilcloruro. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tales como los divulgados, por ejemplo, en la patente de EE: UU. N° 5.359.681. El agente de unión puede inmovilizarse sobre el soporte sólido usando diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la patente y la bibliografía específica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere a asociación tanto covalente como no covalente, tal como adsorción, y unión covalente (que puede ser una unión directa ente el agente y los grupos funcionales del soporte o puede ser una unión mediante un agente de reticulación). Se prefiere la inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede lograrse poniendo en contacto el agente de unión, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante un periodo de tiempo adecuado. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero típicamente está entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, poner en contacto un pocillo de plástico de una placa de microtitulación (tal como poliestireno o polivinilcloruro) con una cantidad de agente de unión que varía desde aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 µg, y preferentemente de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 µg, es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de agente de unión.

La unión covalente de un agente de unión a un soporte sólido puede lograrse generalmente haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con el grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, del agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión puede unirse covalentemente a soportes que tengan un revestimiento polimérico adecuado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído del soporte con una amina y un hidrógeno activa del compañero de unión (ver, por ejemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, en A12-A13).

En algunas realizaciones, el ensayo es un ensayo sándwich con dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto primero un anticuerpo que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de forma que se permite que los polipéptidos de la muestra se unan al anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se elimina después de los complejos inmovilizados polipéptido-anticuerpo y se añade un reactivo de detección (preferentemente un anticuerpo secundario capaz de unirse a diferentes sitios del polipéptido) que contiene un grupo indicador. La cantidad de reactivo de detección que permanece unido al soporte sólido se determina después usando el procedimiento adecuado para el grupo indicador específico.

Más específicamente, una vez que el anticuerpo se ha inmovilizado sobre el soporte como se describe anteriormente,

los sitios de unión a proteína que quedan en el soporte suelen bloquearse. Cualquier agente bloqueante conocido por los expertos en la técnica, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El anticuerpo inmovilizado se incuba después con la muestra, y se deja que el polipéptido se una al anticuerpo. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como un salino tamponado con fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, tiempo de incubación) es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de polipéptido en una muestra obtenido de un individuo con cáncer de mama, ovario, colon, pulmón o próstata. Preferentemente, el tiempo de contacto es suficiente para alcanzar un nivel de unión que es al menos el 95% del alcanzado en el equilibrio entre polipéptido unido y no unido. Los expertos en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede determinarse fácilmente ensayando el nivel de unión que se produce durante un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos es generalmente suficiente.

La muestra no unida puede eliminarse entonces lavando el soporte sólido con un tampón adecuado, tal como PBS que contenga un 0,1% de Tween 20™. El anticuerpo secundario, que contiene un grupo indicador, puede añadirse después al soporte sólido. Los grupos reporteros preferidos incluyen los grupos citado anteriormente.

El reactivo de detección se incuba después con el complejo inmovilizado anticuerpo-polipéptido durante un periodo de tiempo suficiente para detectar el polipéptido unido. Una cantidad apropiada de tiempo puede determinarse generalmente ensayando el nivel de unión que se produce durante un periodo de tiempo. El reactivo de detección no unido se elimina entonces y el reactivo de detección unido se detecta usando el grupo indicador. El procedimiento empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para grupos radioactivos, la cuenta por centelleo o los procedimientos autorradiográficos suelen ser apropiados. Los procedimientos espectroscópicos pueden utilizarse para detectar tintes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse usando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos reporteros enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición de un sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguida de análisis espectroscópico o de otro tipo de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como cáncer de mama, ovario, colon, pulmón o próstata, la señal detectada del grupo indicador que permanece unido al soporte sólido se compara generalmente con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización preferida, el valor de corte para la detección de un cáncer es la media de las señales medias obtenidas cuando el anticuerpo inmovilizado se incuba con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, una muestra que genera una señal que está tres desviaciones estándar por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva para cáncer. En una realización alternativa preferida, el valor de corte se determina usando una curva operativa del receptor, según el procedimiento de Sackett y col., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, págs. 106-107. Brevemente, en esta realización, el valor de corte puede determinarse a partir de una gráfica de pares de tasas reales positivas (es decir, sensibilidad) y tasas falsas positivas (100%-especificidad) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado de la prueba diagnóstica. El valor de corte de la gráfica que está más próximo a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que comprende el área mayor) es el valor de corte más exacto, y una muestra que genere una señal que sea mayor que el valor de corte determinado por este procedimiento puede considerarse positiva. Alternativamente, el valor de corte puede desplazarse hacia la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar la tasa de falsos positivos, o hacia la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos. En general, una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este procedimiento se considera positiva para cáncer.

En una realización relacionada, el ensayo se lleva a cabo en un formato de flujo a través o de tira reactiva, en el que el agente de unión se inmoviliza en una membrana, tal como nitrocelulosa. En el ensayo de flujo a través, los polipéptidos de la muestra se unen al agente de unión inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Un agente de unión secundario marcado se une después al complejo agente de unión-polipéptido a medida que una solución que contiene el agente de unión secundario fluye a través de la membrana. La detección de la unión del agente de unión secundario puede realizarse entonces como se describe anteriormente. En el formato de tira reactiva, un extremo de la membrana a la que el agente de unión está unido se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene un agente de unión secundario y hacia el área del agente de unión inmovilizado. La concentración de agente de unión secundario en el área del anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. Típicamente, la concentración de agente de unión secundario en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que puede leerse visualmente. La ausencia de dicho patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado en la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de polipéptido que sería suficiente para generar una señal positiva en el ensayo sándwich de dos anticuerpos, en el formato descrito anteriormente. Los agentes de unión preferidos para su uso en tales ensayos son anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno. Preferentemente, la cantidad de anticuerpo inmovilizado en la membrana varía desde aproximadamente 25 ng a aproximadamente 1 µg, y más preferentemente desde aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Tales ensayos pueden realizarse típicamente con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Por supuesto, existen numerosos protocolos de ensayo distintos que son adecuados para su uso con las proteínas

tumorales o los agentes de unión de la presente invención. Las descripciones anteriores tiene la intención de servir como ejemplo únicamente. Por ejemplo, será evidente para los expertos en la técnica que los protocolos anteriores pueden modificarse fácilmente para utilizar polipéptidos de antígenos cancerosos o de oncogenes para detectar anticuerpos que se unen a dichos polipéptidos en muestras biológicas. La detección de tales anticuerpos específicos de proteína puede corresponderse con la presencia de un cáncer.

Un cáncer puede detectarse también, o alternativamente, basándose en la presencia de linfocitos T que reaccionan específicamente con una proteína o polipéptido en una muestra biológica. En ciertos procedimientos, una muestra biológica que comprende linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> aislada de un paciente se incuba con un polipéptido, un polinucleótido que codifica dicho polipéptido y/o una APC que expresa tal polipéptido, y se detecta la presencia o ausencia de activación específica de las linfocitos T. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ello, linfocitos T aisladas. Por ejemplo, las linfocitos T pueden aislarse a partir de un paciente por técnicas rutinarias (tales como centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica). Las linfocitos T pueden incubarse in vitro durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37°C con un polipéptido (por ejemplo, 5-25 µg/ml). Puede ser deseable incubar otra alícuota de una muestra de linfocitos T en ausencia del polipéptido para servir como control. Para las linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la activación se detecta preferentemente evaluando la proliferación de las linfocitos T. Para las linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la activación se detecta preferentemente evaluando la actividad citotóxica. Un nivel de proliferación que es al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que el al menos un 20% mayor que en pacientes sin la enfermedad indica la presencia de un cáncer en el paciente.

Como se indica anteriormente, un cáncer puede detectarse también, o alternativamente, basándose en el nivel de ARNm que codifica un antígeno canceroso u oncogen en una muestra biológica. Por ejemplo, al menos dos cebadores de oligonucleótido pueden emplearse en un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una porción de un ADNc de un antígeno canceroso u oncogen derivado de una muestra biológica, en la que al menos uno de los cebadores de oligonucleótido es específico para (es decir, hibrida con) un polinucleótido que codifica el antígeno canceroso o la proteína de oncogen. El ADNc amplificado se separa después y se detecta usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como electroforesis en gel. De forma similar, las sondas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso o una proteínas de oncogen pueden utilizarse en un ensayo de hibridación para detectar la presencia de un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso o una proteína de oncogen en una muestra biológica.

Para permitir la hibridación bajo las condiciones del ensayo, los cebadores y sondas de oligonucleótidos deberían comprender una secuencia de oligonucleótidos que tenga al menos aproximadamente un 60%, preferentemente al menos aproximadamente un 75% y más preferentemente al menos aproximadamente un 90%, de identidad con una porción de un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso u oncogen, que tenga al menos 10 nucleótidos, y preferentemente al menos 20 nucleótidos, de longitud. Preferentemente, los cebadores y/o sondas de oligonucleótidos hibridan con un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso o proteína, polipéptido o proteína de fusión de oncogen aquí descritos bajo condiciones moderadamente estrictas, como se define anteriormente. Los cebadores y/o sondas de oligonucleótidos que pueden empleados de forma útil en los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento Preferentemente tienen al menos 10-40 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, los cebadores de oligonucleótidos comprende al menos 10 nucleótidos contiguos, más preferentemente al menos 15 nucleótidos contiguos. Las técnicas tanto para ensayos basados en PCR como de hibridación son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Mullis y col. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY (1989)).

Un ensayo preferido emplea RT-PCR, en el que se aplica la PCR junto con la transcripción inversa. Típicamente, el ARN se extrae de una muestra biológica tal como una biopsia de tejido y se somete a transcripción inversa para producir moléculas de ADNc. La amplificación por PCR usando al menos un cebador específico genera una molécula de ADNc, que puede separarse y visualizarse usando, por ejemplo, electroforesis en gel. Las amplificación puede realizarse en muestras biológicas tomadas de un paciente de prueba y de un individuo que no está afectado por un cáncer. La reacción de amplificación puede llevarse a cabo en varias diluciones de ADNc que abarcan dos órdenes de magnitud. Un aumento de dos veces o más en la expresión en varias diluciones de la muestra del paciente de prueba en comparación con las mismas diluciones de la muestra no cancerosa se considera típicamente positiva.

En otra realización, el antígeno canceroso o la proteína, polipéptido de oncogen y los polinucleótidos que codifican dichas proteínas o polipéptidos pueden usarse como marcadores para monitorizar la progresión del cáncer. En esta realización, pueden realizarse ensayos como se describen anteriormente para el diagnóstico de un cáncer a lo largo del tiempo, y evaluarse el cambio en el nivel de polipéptido(s) reactivo(s). Por ejemplo, los ensayos pueden realizarse cada 24-72 horas durante un periodo de 6 meses a 1 año, y a partir de entonces realizarse cuando sea necesario. En general, un cáncer está progresando en aquellos pacientes en los que el nivel de polipéptido detectado por el agente de unión aumente con el tiempo. Por el contrario, el cáncer no está progresando cuando el nivel de polipéptido reactivo bien permanece constante o disminuye con el tiempo.

Determinados ensayos diagnósticos in vivo pueden realizarse directamente en el tumor. Un ensayo de ese tipo implica poner en contacto linfocitos Tumorales con un agente de unión. El agente de unión unido puede detectarse entonces directa o indirectamente mediante un grupo indicador. Dichos agentes de unión pueden usarse también en aplicaciones histológicas. Alternativamente, pueden utilizarse sondas de polinucleótidos en tales aplicaciones.

Como se apunta anteriormente, para aumentar la sensibilidad, pueden ensayarse múltiples marcadores de antígenos cancerosos u oncogenes dentro de una muestra dada. Resultará evidente que los agentes de unión para distintas proteínas aquí proporcionados pueden combinarse dentro de un solo ensayo. Además, pueden usarse múltiples cebadores o sondas simultáneamente. La selección de marcadores de proteínas tumorales puede basarse en experimentos rutinarios para determinar qué combinación tiene como resultado una sensibilidad óptima. Además, o alternativamente, pueden combinarse los ensayos para proteínas tumorales aquí proporcionados con ensayos para otros antígenos tumorales conocidos.

## XII. Kit

La presente invención proporciona además kit para su uso en cualquiera de los procedimientos de diagnóstico anteriores. Dichos kit típicamente comprenden dos o más componentes necesarios para realizar un ensayo diagnóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, contenedores y/o equipos. Por ejemplo, un contenedor de un kit puede contener un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que se une específicamente a un antígeno canceroso u oncogen. Tales anticuerpos o fragmentos pueden proporcionarse unidos a un material de soporte, como se ha descrito anteriormente. Uno o más contenedores adicionales pueden incluir elementos, tales como reactivos o tampones, para su uso en el ensayo. Dichos kit pueden contener también, o alternativamente, un reactivo de detección como se ha descrito anteriormente que contiene un grupo indicador adecuado para detección directa o indirecta de la unión de anticuerpo.

Los kit también pueden suministrarse para usos terapéuticos. Por tanto, la composición objeto de la presente invención puede proporcionarse, normalmente en forma liofilizada, en un contenedor. Los vectores descritos en el presente documento se incluyen en los kit con instrucciones de uso y, opcionalmente, con tampones, estabilizadores, biocidas y proteínas inertes. Generalmente, estos materiales opcionales estarán presentes en menos de aproximadamente el 5% en peso, en base a la cantidad de vector, y usualmente estarán presentes en una cantidad total de al menos el 0,001% en peso, en base a la concentración de vector. Puede ser deseable incluir un diluyente o excipiente inerte para diluir los ingredientes activos, en el que el excipiente puede estar presente desde aproximadamente el 1 al 99% en peso de la composición total.

Como alternativa, se puede diseñar un kit para detectar el nivel de ARNm que codifica un antígeno canceroso u oncogen en una muestra biológica. Tales kit, comprenden, generalmente, al menos una sonda o cebador de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente, que hibrida con un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso u oncogen. Tal oligonucleótido puede usarse, por ejemplo, en un ensayo de PCR o de hibridación. Componentes adicionales que pueden estar presentes en tales kit incluyen un segundo oligonucleótido y/o un reactivo o contenedor de diagnóstico para facilitar la detección de un polinucleótido que codifica un antígeno canceroso u oncogen.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Construcción de pCRXA-20

El plásmido pCRXA20 se construyó usando (1) un origen de replicación plasmídico derivado de pUC9; (2) un gen de resistencia a kanamicina y un promotor bacteriano clonados de pRSVneo; (3) una secuencia de poliadenilación de SV40 clonada a partir de pRSVneo; (4) un promotor de CMV y (5) una secuencia 5 prime no traducida de la región MIE que contiene una porción de intrón A, exón A y parte del exón B clonados a partir de citomegalovirus humano.

El pCRXA20 (SEC ID N°: 3) tiene 3584 bases y comprende 5 regiones. La primera región (bases 1-1368) se clonó a partir de ADN viral del CMV humano, cepa Towne ( número ATTC: VR-977). La primera región contiene el promotor, el potenciador y el intrón A virales, que corresponden a las bases 512-1513 y 1736-2094 del gen temprano inmediato principal del CMV (N° de registro en Genbank M60321) y dirige la transcripción del ARNm de un gen clonado. La segunda región (bases 1369-1416) contiene sitios de reconocimiento para 6 enzimas de restricción y se obtuvo de oligonucleótidos hibridados. Esta región permite clonar un gen en el vector. La tercera región (bases 1417-1651) se clonó a partir de las bases 3407-3634 del plásmido pRSVneo (n° ATTC 37198). Esta tercera región contiene las señales de poliadenilación temprana y tardía del virus SV40 y proporciona los sitios poliA necesarios para el transcrito de ARNm de un gen clonado. La cuarta región (bases 1652-2581) contiene un promotor bacteriano y el gen de resistencia a la kanamicina. El promotor se clonó a partir de las bases 2463-2600 del plásmido pUC9 (n° ATTC 37252) y las bases 4589-5383 del gen de pRSVneo. Esta cuarta región permite el crecimiento selectivo de bacterias que contienen el vector. La quinta región (bases 2582-3584) contiene un origen de replicación, clonado de las bases 605-1600 de pUC9 y permite la propagación del vector en bacterias.

### Ejemplo 2: Inducción de la respuesta inmunitaria usando pCRXA-20

Usando técnicas de biología molecular estándar (AdEasy System, Johns Hopkins University, Baltimore, MD) se generó un vector de serotipo 5 de adenovirus humano con delección de E1 y E3, defectivo en la replicación, que expresa L523S humana bajo el control del promotor de CMV. La secuencia de ADN del vector adenovirus-L523S se expone en la SEC ID N°: 5. La secuencia del ADNc que codifica la proteína L523s de longitud completa se expone en la SEC ID N°: 6 con la correspondiente secuencia de aminoácidos que se expone en la SEC ID N°: 7.

El gen que codifica la proteína L523S de longitud completa (SEC ID N°: 6) se insertó en pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y pCRXA-20 usando técnicas estándar para crear vectores de expresión de ADN-L523.

5 Se inmunizaron tres grupos de ratones C57b1/6 (4 ratones/grupo) una vez con 100 µg de vector de expresión de ADN-L523 (pVax o pCRXA) o no recibieron nada de ADN. Tres semanas después, todos los ratones fueron inmunizados con  $10^8$  upf de adenovirus L523. Se recogieron células de bazo dos semanas después de la inmunización con adenovirus. Se evaluaron las respuestas de los linfocitos T a L523S usando interferón gamma (IFN  $\gamma$ ) en tinción intracelular de citocinas (ICC) con INF $\gamma$ , o ELISPOT con IFN $\gamma$  o mediante un ensayo de liberación de cromo.

10 Células de bazo inmunitarias y sin tratamientos previos se sometieron a ensayo para evaluar la secreción de IFN $\gamma$  mediante ELISPOT después de la estimulación *in vitro* con el péptido p13-21 de L523 (SEC ID N°: 8). Células de bazo inmunitarias ( $4 \times 10^5$ ) se cultivaron con p13-21 (5 µg/ml) durante dos días, en pocillos duplicados de placas de ELISPOT revestidas con anti-IFN $\gamma$ . Después de dos días no se detectaron ELISPOT de IFN $\gamma$  de las células de bazo no tratadas previamente. Las células de ratones que se habían inmunizado con adenovirus solo (sin inmunización con ADN) tenían aproximadamente 50 manchas por pocillo, mientras que las células de ratones inmunizados con el plásmido pVAX/L523A mostraban 100 pocillos por pocillo, mientras que las células de ratones inmunizados con el plásmido pCRXA-20 produjeron más de 1000 manchas por pocillo. Los resultados indican que la respuesta inmunitaria desencadenada con pCRXA es mucho más fuerte que la desencadenada con pVax.

20 La respuesta inmunitaria específica de L523 se midió también usando ICC IFN $\gamma$ . Se estimularon células de bazo recién preparadas con el p13-21 de L523S (SEC ID N°: 8) durante 6 horas y después se tiñeron para observar la expresión de CD4, CD8 e IFN $\gamma$ . Los resultados del ensayo de ICC fueron coherentes con los obtenidos en el ensayo de ELISPOT. El grupo inmunizado con pCRXA/L523A presentaba una media de un 1,3% de linfocitos T específicos para el antígeno L523S, mientras que el cebado con pVAX/L523S no mostró respuestas de linfocito T CD8 sobre el componente de adenovirus de la vacuna administrado solo. Esto demostró la necesidad de inmunización con ADN para desencadenar respuestas de linfocitos T CD8 óptimas y confirmó que pCRXA desencadena una respuesta inmunitaria fuerte.

### 25 **Ejemplo 3: Actividad lítica de las líneas CTL usando pCRXA-20**

30 Células de bazo inmunitarias de ratones C57b1/6 inmunizados se cultivaron durante 6 días con células EL4 irradiadas pulsadas con p13-21 de L523S (SEC ID N°: 8). El sexto día, las líneas de linfocitos T se sometieron a ensayo para evaluar su actividad lítica en un ensayo estándar de 4 horas de liberación de cromo contra células diana F45 que no estaban tratadas o que estaban tratadas con pulsos de p13-21 de L523S (SEC ID N°: 8). Los resultados son coherentes con los obtenidos en los ensayos de ELISPOT con IFN  $\gamma$  e ICC, aunque las diferencias en la actividad funcional de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> fueron menos evidentes después de una estimulación de 6 días *in vitro*. Los resultados muestran una actividad CTL más débil en ratones inmunizados con pVax que en ratones inmunizados de forma similar con pCRXA. La inmunización con adenovirus solo también desencadena actividad CTL, aunque como se observó en los otros ensayos, la inmunización con ADN parece potenciar esta actividad.

35 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y entendimiento, a la luz de las enseñanzas de la presente invención resultará fácilmente evidente para el experto en la técnica que realizarse determinados cambios y modificaciones en ella sin alejarse del espíritu o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

#### LISTADO DE SECUENCIAS OFICIOSO

40	<210>	1
	<211>	2665
	<212>	ADN
	<213>	pUC9
	<400>	1

ggcaccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcggtggccg attcattaat gcagctggca 60  
 cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120  
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgettecg gctcgtatgt tgtgtggaat 180  
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagcttgg 240  
 ctgcaggtcg acggatcccc ggaattcac tggccgtcgt ttacaacgt cgtgactggg 300  
 aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc 360  
 gtaatagcga agaggcccgcc accgatcgcc ctcccccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 420  
 aatggcgctt gatgcggtat tttctcctta cgcactctgt cggtatctca caccgcatac 480  
 ggtgcactct cagtacaatc tgetctgat cgcatagtt aagccagccc cgacacccgc 540  
 caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgtctcc ggcatccgct tacagacaag 600  
 ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgttc agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg 660  
 cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg 720  
 tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaaccct atttgtttat 780  
 tttcttaaat acattcaaat atgtatcgcg tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc 840  
 aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct 900  
 tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg ctcaaccaga aacgctggtg aaagtaaaaag 960  
 atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta 1020  
 agatecctga gagttttcgc ccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc 1080  
 tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgcccggca agagcaactc ggtcgcgcga 1140  
 tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg 1200  
 atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg 1260  
 ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca 1320  
 tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaaccgga gctgaatgaa gccataccaa 1380  
 acgacgagcg tgacaccacg atgectgtag caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa 1440  
 ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata 1500  
 aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat 1560  
 ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc 1620  
 cctcccgat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcagc aactatggat gaacgaaata 1680  
 gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt 1740  
 actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTA atttaaaagg atctagggtga 1800  
 agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag 1860  
 cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 1920  
 tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgttt cggatcaag 1980

```

agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 2040
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 2100
acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 2160
ccgggttggg ctcaagaaga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 2220
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 2280
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggccggacagg tatccggtaa 2340
gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaaac gcctgggtatc 2400
tttatagtcc tgtcggggtt cggccacctc gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 2460
cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct 2520
tttcttggcc ttttctcac atgttcttcc ctgcggtatc ccttgattct gtggataacc 2580
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaaacgacc gagcgcagcg 2640
agtcagtgag cgaggaagcg gaaga                                     2665

```

```

<210> 2
<211> 5736
<212> DNA
<213> pRSVneo
<400> 2

```

```

cttgagggtg cacaccaatg tggatgaatg tcaaatggcg tttattgtat cgagctaggc 60
acttaaatac aattatctct gcaatgcgga attcagtggt tcgtccaatc catgtcagac 120
ctgtctgttg ccttccta ataggcagat cgtaccacct tacttccacc aatcggcatg 180
cacgggtgct tttctctct tgtaaggcat gttgctaact catcgttacc atgttgcaag 240
actacaagtg tattgcataa gactacattt cccctcctc atgcaaaaagc gaaactacta 300
tatcctgagg ggactcctaa ccgcgtacaa ccgaagcccc gcttttcgcc taaacacacc 360
ctagtcacct cagatacgcg tataatctggc ccgtacatcg cgaagcagcg caaaaacgct 420
aacccctaagc agattcttca tgcaattgtc ggtcaagcct tgccctgttg tagcttaaat 480
tttctctcgc cactactcag cgacctcaa cacacaagca gggagcagat actggcttaa 540
ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgoggtgtg aaataccgca 600
cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc 660
gctgcgctcg gtctgtcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg oggtaatacg 720
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa 780
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttget ggcgttttcc cataggctcc gccccctga 840
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagc gactataaag 900
ataccaggcg ttccccctg gaagctcctc cgtgcgctct cctgttcoga cctgcgct 960
tacgggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaaagcgtg gcgctttctc atagctcacg 1020
ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 1080
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 1140
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcggaggta 1200
tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggtaca ctagaaggac 1260
agtatttggg atctgcgctc tgcgtgaagc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 1320

```

t	ttgatccggc	aaacaaaacca	cegetggtag	eggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	1380
t	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgate	ttttctacgg	ggctctgacgc	1440
t	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	1500
c	cacctagatc	cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	1560
a	aacttggctc	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	1620
a	atttcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgctgtgtag	ataactaoga	tacggggagg	1680
c	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	1740
t	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	1800
a	atccgctccc	atccagtcta	ttaattggtg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	1860
t	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tgcaggcacc	gtggtgtcac	gctcgtcgtt	1920
t	tggataggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatccccat	1980
g	gttgtgcaaa	aaagcggtta	gctccttcgg	tctccgatac	gttgtcagaa	gtaagttggc	2040
c	cgcagtgtta	tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccacc	2100
c	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	2160
g	ggggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgtc	aacacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	2220
a	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaaag	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	2280
a	accgctgttg	agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcacc	2340
t	ttttactttc	accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaatg	ccgcaaaaaa	2400
g	gggaataagg	gagacacgga	aatggtgaat	actcatactc	ttccttttct	aatattattg	2460
a	aagcatttat	cagggttatt	gtctcatgag	eggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	2520
t	taaacaata	ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tctaagaaac	2580
c	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtcttca	2640
a	agaattcctt	tgcctaattt	aatgaggac	ttaacctgtg	gaaatatttt	gatgtgggaa	2700
g	gctgttactg	ttaaaactga	ggttattggg	gtaactgcta	tgttaaactt	gcattcaggg	2760
a	acacaaaaaa	ctcatgaaaa	tgggtgctgga	aaaccatctc	aagggtcaaa	ttttcatttt	2820
t	tttgctgttg	gtggggaacc	tttggagctg	caggggtgtg	tagcaaaacta	caggacaaaa	2880
t	tatectgctc	aaactgtaac	ccccaaaaat	gctacagttg	acagtcagca	gatgaacact	2940
g	gaccacaagg	ctgtttttgga	taaggataat	gcttatccag	tggagtgtctg	ggttccctgat	3000
c	ccaagtaaaa	atgaaaacac	tagatatttt	ggaaectaca	caggtggggga	aaatgtgoc	3060
c	cctgtttttg	acattactaa	cacagcaacc	acagtgtctc	ttgatgagca	gggtgttggg	3120
c	ccctgtgca	aagetgacag	cttgtatggt	tctgtgtgtg	acatttgttg	gctgtttacc	3180
a	aacacttctg	gaacacagca	gtggaaggga	cttcccagat	attttaaaat	tacccttaga	3240
a	aagcggctctg	tgaaaaacc	ctacccaatt	tcctttttgt	taagtgaacct	aattaacagg	3300
a	aggacacaga	gggtggatgg	gcagcctatg	attggaatgt	cctctcaagt	agaggagggt	3360
a	agggtttatg	aggacacaga	ggagcttcc	ggggatccag	acatgataag	atacattgat	3420
g	gagtttggac	aaaccacaac	tagaatgcag	tgaaaaaaat	gctttatttg	tgaaatttgt	3480
g	gatgctattg	ctttatttgt	aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	caacaacaat	3540
t	tgeattcatt	ttatgtttca	gggtccaggg	gaggtgtggg	aggtttttta	aagcaagtaa	3600
a	aacctctaca	aatgtgggat	ggctgattat	gatctctagt	caaggeacta	tacatcaaat	3660
a	attccttatt	aacccttta	caaattaaaa	agctaaagg	acacaatttt	tgagcatagt	3720
t	tattaatagc	agacacteta	tgectgtgtg	gagtaagaaa	aaacagtatg	ttatgattat	3780

```

aactggtatg cctacttata aaggttacag aatatttttc cataattttc ttgtatagca 3840
gtgcagcttt ttcctttgtg gtgtaaatag caaagcaagc aagagttcta ttactaaaca 3900
cagcatgact caaaaaactt agcaattctg aaggaaagtc cttgggggtct tctaccttc 3960
tcttcttttt tggaggagta gaatggtgag agtcagcagt agcctcatca tctactagatg 4020
gcatttcttc tgagcaaaac aggttttctt cattaaaggc attccaccac tgctcccatt 4080
catcagttcc ataggttgga atctaaaata cacaaacaat tagaatcagt agtttaacac 4140
attatacact taaaaatttt atatttacct tagagcttta aatctctgta ggtagtttgt 4200
ccaattatgt cacaccacag aagtaagggt ccttcacaaa gatccgggac caaagcggcc 4260
atcgtgectc cccactcctg cagttcgggg gcattggatgc ggggatagcc gctgctgggt 4320
tcttggatgc cgacggattt gcactgccgg tagaactccg cgaggctgtc cagcctcagg 4380
cagcagctga accaactcgc gaggggatcg agcccgggggt gggcgaagaa ctccagcatg 4440
agatccccgc gctggaggat catocagccg gcgtcccgga aaacgattcc gaagcccaac 4500
ctttcataga agggggcggt ggaatcgaaa tctcgtgatg gcaggttggg cgtcgtctgg 4560
tcggtcattt cgaaccccag agtcccgcctc agaagaactc gtcaagaagg cgatagaagg 4620
cgatgcgctg cgaatcggga gcggcgatac cgtaaagcac gaggaagcgg tcagcccatt 4680
cgccgccaaq ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc tatgtcctga tagcggctccg 4740
ccacaccagc ccggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg gccattttcc accatgatat 4800
tcggcaagca ggcacgcaca tgggtcacga cgagatcctc gccgtcgggc atgcgcgct 4860
tgagcctggc gaacagttcg gctggcgcga gccctgatg ctcttcgtcc agatcactc 4920
gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgtc gatgcgatgt ttcgcttggg 4980
ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg ccgcattgca tcagccatga 5040
tggatacttt ctccggcagga gcaagggtgag atgacaggag atcctgcccc ggcaactcgc 5100
ccaatagcag ccagtccctt cccgcttcag tgacaacgtc gagcacagct gcgcaaggaa 5160
cgcccgtcgt ggccagccac gatagcccgcg ctgcctcgtc ctgcagttca ttcagggcac 5220
cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg cgctgacagc cggaacacgg 5280
cggcatcaga gcagccgatt gtctgttgtg cccagtcata gccgaatagc ctctccacc 5340
aagcggccgg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat catgcgaaac gatcctcacc 5400
ctgtctcttg atcagatctt gatcccctgc gccatcagat ccttggcggc aagaaagcca 5460
tccagtttac tttgcagggc ttcccaacct taccagaggg cgcgccagct ggcaattccg 5520
gttcgcttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg ccatgtaagc ccaactgcaag 5580
ctacctgctt tctctttgog cttgcgtttt cccttgtcca gatagcccag tagctgacat 5640
tcatccgggg tcagcacctg ttctgcggac tggctttcta cgtgttcgcg ttccttttagc 5700
agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgaag 5736

```

```

<210> 3
<211> 3584
<212> DNA
<213> pCRXA20
<400> 3

```

```

gatatcatat tggctcatgt ccaacattac cgccatggtg acattgatta ttgactagtt 60
attaatagta atcaattacg gggtcattag tteatagccc atatatggag ttccgcggtta 120

```

cataacttac ggtaaatggc cgcctggct gaccgcecaa egacccccgc ccattgacgt 180  
caataatgac gtatgttccc atagtagegc caatagggac tttccattga cgtcaatggg 240  
tggagtattt acggtaaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagtc 300  
cgccccctat tgaegteaat gaeggtaaat ggcgcgcctg gcattatgoc cagtacatga 360  
ccttacggga ctttccctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatogct attaccatgg 420  
tggatgcggg tttggcagta caccaatggg cgtggatage ggtttgactc acggggattt 480  
ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttg ggcacaaaaa tcaacgggac 540  
tttccaaaat gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg 600  
tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctcg gagacgccat 660  
ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa 720  
cggtgcattg gaacgcggat tccccgtgc aagagtgcag taagtaccgc ctatagactc 780  
tataggcaca cccctttggc tcttatgcat gctatactgt ttttggettg gggcctatac 840  
acccccgctt ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag cctataggtg tgggttattg 900  
accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc attactaate cataacatgg 960  
ctttttgcca caactatctc tattggctat atgccaatac actgtccttt cgtcggcag 1020  
ctccttgctc ctaacagtgg aggcagact taggcacagc acaatgccc ccaccaccag 1080  
tgtgccacac aaggccgwg cggtagggtg tgtgtctgaa aatgagctcg gagattgggc 1140  
tgcaccgct gaacgcagatg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg caggcagctg 1200  
agttgttgta ttctgataag agtcagaggt aactcccgctt gcggtgctgt taacggtgga 1260  
gggcagtgtg gtctgagcag tactcgttgc tgcgcgcgc gccaccagac ataatagctg 1320  
acagactaac agactgttcc tttccatggg tttttctgc agtcaccggt cgaccgaagc 1380  
ttgcccccgg cgggatcccc gcggccgcgc gaattctgat cataatcagc cataccacat 1440  
ttgtagaggt tttacttgc ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata 1500  
aatgaatgc aattgttgtt gtttaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa 1560  
gcaatagcat cacaaaattc acaataaag catttttttc actgcattct agttgttggt 1620  
tgtccaaact catcaatgta tcttaggtac cagctcaggt ggcacttttc ggggaaatgt 1680  
gcgcgggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgtcatgag 1740  
acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga ttgaacaaga 1800  
tggattgeac gcaggttctc eggcgcctt ggtggagagg ctattcggt atgactgggc 1860  
acaacagaca atcggtgct ctgatgcgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgcc 1920  
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1980  
gcggtatcg tggctggcca cgacggcgt tecttgcgc gctgtgctcg acgttgtcac 2040  
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg ggcaggatc tctgtcate 2100  
teaccttget cctgcgaga aagtatecat catggtgat gcaatgcgce ggtgtcatac 2160  
gcttgatccg gctacctgcc cattegacca ccaagcgaaa catcgcctcg agcagcaacg 2220  
tacteggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gaagaagagc atcaggggct 2280  
cgccccagcc gaactgttcc ccaggtcaa ggcgcgcctg cccgacggcg aggatctcgt 2340  
cgtgacctat ggcgatgctt gcttgcgaa tctcctggtg gaaaatggcc gcttttctgg 2400  
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2460  
cgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgttccctcg tcttttacgg 2520  
tategecget cccgattege agcgcategc cttctatege cttcttgac agttctctg 2580

```

actcgaggcc agctgcatta atgaattggc ccaecgcggg ggagaggcgg attgogtatt 2640
gggcgctett ccgcttecto gctcaetgta ctcgctgegc tgggtcgttc ggctgcggcg 2700
agcggtatca gctcaactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 2760
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt 2820
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgaogagcat cacaaaaatc gacgctcaag 2880
tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 2940
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacogga taectgtccg cctttctccc 3000
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg 3060
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcaoga acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt 3120
atccggtaac tategtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 3180
agccactggc aacaggatta gcagagcgag gtatgtagge ggtgctacag agttcttgaa 3240
gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtatth ggtatctgog ctctgctgaa 3300
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 3360
tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattaecgcg agaaaaaaag gatctcaaga 3420
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgcctcagtg aacgaaaact cacgttaagg 3480
gattttggtc atgagattat caaaaaggat ettcacctag atccttttaa attaaaaatg 3540
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctg 3584

```

<210> 4

<211> 2361

<212> DNA

<213> CMV\_MIE\_gene\_5'end-1

<400> 4

```

gatatcatat tggctcatgt ccaacattac cggcatgttg acattgatta ttgactagtt 60
attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta 120

```

ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60  
gactaaatc atgtcgcgcg atagtgggtgt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120  
aaatcgatat ttgaaaatat ggcataattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180  
tgatategcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg cgatacggct 240  
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggcga cttgggcgat tctgtgtgtc 300  
gcaaatacgc cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatateg ccgatagagg 360  
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaate aatattggca 420  
attagccata ttagtcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480  
tacgttgat ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgacgcc 540  
atggtgacat tgattattga ctagtatta atagtaatca attacggggc cattagttca 600  
tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttaecgta aatggccgc ctcgtgaccg 660  
cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata 720  
gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttaeggt aaactgcca cttggcagta 780  
catcaagtgt atcatatgcc aagtcggcc ccctattgac gtcaatgac gtaaattggc 840  
cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta 900  
cgtattagtc atcctatta ccattggtgat ggggttttgg cagtacacca atgggcgtgg 960  
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1020  
gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aataaccocg ccccgttgac 1080

```

gcaaattgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa 1140
cogtcagatc gectggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga 1200
cogateccagc ctccggggcc gggaaacggtg cattggaaacg eggatteccc gtgccaagag 1260
tgacgtaagt accgcctata gactctatag gcacacccct ttggctctta tgcattgctat 1320
actgtttttg gcttggggcc tatacacccc cgctccttat gctataggtg atggtatagc 1380
ttagectata ggtgtggggtt attgaccatt attgaccact cccctattgg tgacgatact 1440
ttccattact aatccataac atggctcttt gccacaacta tctctattgg ctatatgcca 1500
atactctgtc cttcagagac tgacaeggac tetgtatttt tacaggatgg ggtcccattt 1560
attattttaca aattcacata tacaacaacg cogtcccccg tgcocgcagt ttttattaaa 1620
catagcgtgg gatctccacg cgaatctcgg gtacgtgttc cggacatggg ctctttctccg 1680
gtagcggggg agcttccaca tccgagccct ggtcccctgc ctccagcggc tcatggctgc 1740
tggcagctc cttgctccta acagtggagg ccagacttag gcacagcaca atgcccacca 1800
ccaccagtgt gccgcacaag gccgtggcgg tagggtatgt gtctgaaaat gagctcggag 1860
attgggctcg caccgtgacg cagatggaag acttaaggca ggggcagaag aagatgcagg 1920
cagctgagtt gttgtattct gataagagtc agaggtaact ccgctgcgg tgctgttaac 1980
gggtggagggc agtgtagtct gacagctact cgttgcctgc gcgcgcgcca ccagacataa 2040
tagctgacag actaacagac tgttcctttc catgggtctt ttctgcagtc accgtccttg 2100
acacgatgga gtccctctgc aagagaaaga tggacctga taatcctgac gagggccctt 2160
cctccaaggt gccacggtae gtgtcggggt ttgtgcccc cctttttttt ataaaattgt 2220
attaatgta tatacatatc tctgtatgt gacctatgt cttatgactc tattttctcat 2280
gtgttttaggc ccgagacacc cgtgaccaag gccacgaagt tctgcagac tatgttgagg 2340
aaggaggta acagtcagct g

```

2361

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt;

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; L523S-Adenovirus vector

&lt;400&gt; 5

ttaattaacatcatcaataatataccttattttggattgaagccaatatgataatgaggggggtggagtttgtgac  
gtggcgcgggggcgtgggaacggggcggtgacgtagtagtgtggcggaagtgtgatgttgcaagtgtggcggaac  
acatgtaagcgacggatgtggcaaaagtgacgtttttgggtgtgcgcgggtgtacacaggaagtgacaattttcgc  
gcggttttaggcggatgtttagtaaaattggggcgtaaccgagtaagatttggccattttcgcgggaaaactgaa  
taagaggaagtgaaatctgaataattttgtgttactcatagcgcgtaatactgtaatagtaatcaattacgggggt  
cattagttcatagcccatatatggagttccgcggttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccc  
acgacccccgcccattgaogtcaataatgaogtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgaogt  
aatgggtggagttttacggtaaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtaogccccct  
ttgaogtcaatgaogttaaattggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttccctacttggc  
agtacatctacgtattagtcacogctattaacatgggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcggtggatagc  
ggtttgactcaoggggatttccaagtcctcaccaccattgaogtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaac  
gggactttccaaaatgtcgtaacaactccgcccattgaogcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtct  
atataagcagagctgggttagtgaaccgtcagatccgctagagatctggtaccgtcogacggggcgcctcogagcct

aagcttctagagccgccaccatgaacaaaactgtatatcggaaacctcagcagagaacgcgcgccccctcggacctag  
aaagtatcttcaaggacgcccaagatccccggtgtcgggacctctcctgggtgaagactggctacgcgcttcgtggact  
gcccggacgagagctgggcccctcaaggccatcgaggcgcttccaggtaaaatagaactgcacgggaaacccatag  
aagttgagcactcggccccaaaaaggcaaggattcggaaaacttcagatacgaatatcccgccctcatttacagt  
gggaggtgctggatagtttactagtcacgtatggagtggtggagagctgtgagcaagtgaacactgactcggaaa  
ctgcagttgtaaatgtaacctattccagtaaggaccaagctagacaagcactagacaaaactgaatggatttcagt  
tagagaatttcaccttgaagtagcctatatccctgatgaaaacggcgcgcccagcaaaaccccttgcagcagcccc  
gaggtcgccgggggcttgggcagaggggctcctcaaggcaggggtctccaggatccgtatccaagcagaaacccat  
gtgatttgccctctgcgctgctgggtcccccacccatattgttggagccatcatagggaaaagaaggtgccaccattc  
ggaacatcaccaaacagaccagtcataaaatcgatgtccaccgtaaaagaaaatgcgggggctgctgagaagtoga  
ttactatcctctctactcctgaaggcacctctgcggcttgaagtctattctggagattatgcataaggaagctc  
aagatataaaaattcacagaagagatccccctgaagatttttagctcataataactttgttggagctctatttggt  
aagaaggaagaaatcttaaaaaaattgagcaagacacagacactaaaatcacgatatctccattgcaggaattga  
cgctgtataatccagaacgcactattacagttaaaggcaatggtgagacatgtgccaaagctgaggaggagatca  
tgaagaaaatcagggagctttatgaaaatgatattgcttctatgaatcttcaagcacatttaattcctggattaa  
atctgaacgccttgggtctgttcccaccacttcagggatgccacctcccacctcagggcccccttcagccatga  
ctcctccctaccgcagtttgagcaatcagaaacggagactgttcatctgtttatcccagctctatcagtcgggtg  
ccatcatcggcaagcagggccagcacatcaagcagctttctcgcttctgctggagcttcaattaagattgctccag  
cggaaacaccagatgctaaagtgaggatggtgattatcactggaccaccagaggctcagttcaaggctcagggaa  
gaatztatggaaaaatataaagaagaaaactttgttagtcctaaagaagaggtgaaacttgaagctcatatcagag  
tgccatcctttgctgctggcagagttattggaaaaggaggcaaaaacgggtgaatgaacttcagaatttgtcaagt  
cagaagttgttgcctcctgtagaccagacacctgatgagaatgaccaagtggttgtcaaaaataactggctcactct  
atgcttgccaggttgcccagagaaaaatcaggaaatctgactcaggtaaagcagcaccaacaacagaaggctc  
tgcaaaagtggaccacctcagtcagaacggaagtaatctagagccgccaccatgaacaaaactgtatatcggaaaac  
tcagcagagaacgcgcgccccctcggacctagaagatcttcaaggacgcccaagatcccgggtgcgggaccttcc  
tggtgaagactggctacgcgcttcgtggactgcccggacgagagctgggcccctcaaggccatcgaggcgcttccag  
gtaaaatagaactgcacgggaaacccatagaagttgagcactcgggtcccaaaaaggcaaggattcggaaacttc  
agatacgaatatcccgccctcatttacagtgaggaggtgctggatagtttactagtcacgtatggagtggtggaga  
gctgtgagcaagtgaacactgactcggaaaactgcagttgtaaatgtaacctattccagtaaggaccaagctagac  
aagcactagacaaaactgaatggatttcagttagagaatttcaccttgaagtagcctatatccctgatgaaaacgg  
ccgcccagcaaaaccccttgcagcagccccgaggtgcgggggcttgggcagaggggctcctcaaggcaggggt  
ctccaggatccgtatccaagcagaaaccatgtgatttgccctctgcgctgctggttcccacccaatttgttggag  
ccatcatagggaaaagaaggtgccaccattcggaacatcaccaaacagaccagctctaaaatcgatgtccacogta  
aagaaaatgcgggggctgctgagaagtcgattactatcctctctactcctgaaggcacctctgcggcttgaagt  
ctattctggagattatgcataaggaagctcaagatataaaaattcacagaagagatcccttgaagattttagctc  
ataataactttgttggagctcttattggttaagaaggaaagaaatcttaaaaaaattgagcaagacacagacacta  
aaatcacgatatctccattgcaggaattgacgctgtataatccagaacgcactattacagttaaaggcaatgttg  
agacatgtgccaaagctgaggaggatcatgaagaaaatcagggagctttatgaaaatgatattgcttctatga  
atcttcaagcacatttaattcctggattaaatctgaacgcttgggtctgttcccaccacttcagggatgccac  
ctcccacctcagggcccccttcagccatgactcctcctaccogcagtttgagcaatcagaaaacggagactgttc  
atctgtttatcccagctctatcagtcgggtgccatcatcggcaagcagggccagcacatcaagcagctttctcgct

ttgctggagcttcaattaagattgctccagcgggaagcaccagatgctaaagtgaggatggtgattatcactggac  
 caccagaggctcagttcaaggctcagggagaatattatggaaaaattaaagaagaaaactttgttagtcctaaag  
 aagagggtgaaacttgaagctcatatcagagtgccatcctttgctgctggcagagttattggaaaaggaggcaaaa  
 cggatgaatgaaactcagaatttgtcaagtgcagaagttggtgctccctcgtgaccagacacctgatgagaatgacc  
 aagtgggtgtcaaaaactggctcacttctatgcttgccaggttgcccagagaaaaattcaggaaattctgactc  
 aggtaaagcagcaccaacaacagaaggctctgcaaaagtggaccacctcagtcgaagacggaagtaatctagataag  
 atatccgatcccacggatctagataaactgatcataatcagccataccacatttgttagaggttttacttgccttaa  
 aaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaaatgcaattggtgtgtaacttgtttattgcag  
 ctataatgggtacaaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaaataaagcatttttttactgcattctagt  
 gtgggttgcctcaaaactcatcaatgtatcttaacgoggatctggggcgtgggttaagggtgggaaagaatataaagg  
 tgggggtcttatgtagtttgtatctgtttgcagcagccgcgcgcgatgagcaccactcgtttgatggaag  
 cattgtgagctcatatttgacaacgcgcgatgccccatgggcccggggtgctcagaatgtgatgggctccagcat  
 tgatggctgccccgctcctgccccaaaactctactaccttgacctacgagaccgtgtctggaacgccttggagac  
 tgcagcctccgcccgccttcagccgctgcagccaccgcccggggattgtgactgactttgctttcctgagccc  
 gcttgcaagcagtgagcttcccgctcatccgcccgcgatgacaagttgacggctcttttggcacaattggatctc  
 tttgaccgggaaacttaatgtcgtttctcagcagctgttggtctgcgcccagcaggtttctgcccgaaggcttc  
 ctccccctcccaatgcgggttaaaaacataaaataaaaaaccagactctggttggatttggatcaagcaagtgtctg  
 ctgctttatttaggggttttgcgcccgcggtagggcccgggaccagcggctctcggctcgttggggctctgtgtat  
 ttttccaggacgtggtaagggtgactctggatggtcagatacatgggcataagcccgtctctgggggtggaggtg  
 gcaccactgcagagcttcatgctgcccgggtgggtgttagatgatccagtcgtagcaggagcgtgggctggtg  
 cctaaaaatgtcttccagtagcaagctgatggccaggggcagcccttgggtgtaagtgttcaaaagcggtaag  
 ctgggatgggtgcatacgtggggatagagatgcactctggactgtatttttaggttggctatgttcccagccat  
 atccccccggggatcatgttgtgcagaaccaccagcacagtgatccgggtgcaacttgggaaatttgtcatgtag  
 cttagaaggaaaatgcgtggaagaacttggagacgccttctgacctccaagatttccatgcattcgtccataat  
 gatggcaatgggcccacgggcccggcctgggccaagatatttctgggatcactaacgtcatagttgtgttccag  
 gatgagatcgtcataggccatttttcaaaagcgcgggcccgggggtgcccagactgcggtataatgggtccatccgg  
 cccaggggctagttaccctcacagatttgcatttcccacgctttgagttcagatggggggatcatgtctacctg  
 cggggcgtagaagaaaaagggtttccggggtaggggagatcagctgggaagaaagcaggttccctgagcagctgca  
 ctaccgcagccgggtgggcccgtaaatcacacctattaccggtgcaactggtagttaagagagctgcagctgcc  
 gtcactcctgagcaggggggcaactcgttaagcatgtcctgactcgcattgtttccctgaccaaatecgcag  
 aaggcctcgcgcccagcagatagcagttcttgcaaggaagcaagttttcaacgggttgagaccgtccgcccgt  
 aggcattgctttgagcgtttgaccaagcagttccaggcgggtcccacagctcgggtcacctgctctacggcatctcg  
 atccagcatatctcctcgtttccgcccgttggggcggctttcgcctgtacggcagtagtcgggtgctcgtccagacgg  
 gccagggctcatgtctttccacgggcccagggctcctcgtcagcgtagctctgggtcaggtgaaaggggtgctcctc  
 ggctgcccgtgcccaggggtgccccttggggctggctcctgctggtgctgaagcgcctgcccgtcttcgcccgtc  
 cggccaggtagcatttgaccatggtgtcatagtcagccccctccgcccgtggcccttggcgcgcagcttggcc  
 ttggaggaggcgcgcagcagggggcagtgacagcttttgaggcgttagagcttgggcccagaaaaaccgatcc  
 ggggagtaggcatccgcgcccagggcccgcagacggctctgcattccacgagccaggtgagctctggccgttcg  
 gggtaaaaaaccaggtttccccatgctttttgatgctttcttaacctctggtttccatgagccgggtgtccacgc  
 tcgggtgacgaaaaggctgtccgtgtcccgtatacagacttgagagggagttgtatacagacttgagagggcctg  
 tccctgagcgggtgtccgcccgtcctcctcgtatagaaactcggaccactctgagacaaaggctcgcgtccagggc

agcaagaggaggetaagtgggagggtagcggtcgttgtccactaggggggtccactcgctccagggtgtgaaga  
 cacatgtcgccctcttcggcatcaaggaaggtgatgggtttgtaggtgtaggccacgtgaccgggtgttccctgaa  
 ggggggctataaaaggggggtgggggcgcttcgtcctcactctcttcggcatcgctgtctgagggggccagctgt  
 tgggtgagtagtactcctctgaaaagcgggcatgacttctgctgtaagattgtcagtttccaaaaacgaggaggat  
 ttgatattcaoctggcccgggtgatgectttgagggtggccgcatccatctgggtcagaaaagacaatctttttg  
 ttgtcaagcttgggtggcaaacgaccogtagagggcggttgacagcaacttggcgatggagcgcagggtttgggtt  
 ttgtcgogatcggcgcgctccttggccgogatggttagctgcaogtattcgogcgcaacgcaiccgccattcggga  
 aagacgggtgggtgcgctcgtcgggcaccaggtgcaogcgcacaacccgggttgtgcagggtgacaaggtcaacgctg  
 gtggctacctctcgcgtagggcctcgttgggtccagcagaggcggccgcttgcogcagcagaatggcggtagg  
 gggctagctcgtctcgtcgggggggtctgctccacggtaaaagacccgggcagcaggcgcgctcgaagtag  
 tctatcttgcactccttgcagcttagcgcctgctgcatgocggggggcaagcgcgctcgtatgggtgagt  
 gggggaacccatggcatgggtgggtgagcgcggaggcgtaacatgocgcaaatgtcgtaaacgttagaggggtct  
 ctgagtatccaagatgtagggtagcatctccaccgoggtgctggcgcgcaatcgtatagttcgtgc  
 gagggagcagggagggtcgggaccgaggttgcacgggcgggtgctctgctcggaaagactatctgcctgaagatg  
 gcatgtgagttggatgatattggttggacgctggaagcgttgaagctggcgtctgtgagacctaccgctcagc  
 acgaaggaggcgttaggagtcgcgcagcttgttgaccagctcggcgggtgacctgcaogtctaggcgcagtagtcc  
 agggttccttgatgatgtcacttctcctgtccctttttttccacagctcgcgggttagggacaaaactcttcg  
 cggctcttccagtagctcttggatcggaaacccgctcggcctcogaacggtaagagcctagcatgtagaactgggtg  
 acggcctggtagggcgcagcatccctttctacgggtagcgcgtatgcctgocggccttcggagcaggtgtgg  
 gtgagcgcaaaaggtgtccctgacctgactttgaggtactggatattgaaagtcagtgctcgcacccctgc  
 tcccagagcaaaaagtcgctgogctttttggaaacgggatttggcagggcgaaggtgacatcgttgaagagtac  
 tttccogcogagggcataaagttgctgtgatgcggaaggggtccgggcacctcggaaacgggttgttaattacctgg  
 gcggcagcagcatctcgtcaaagccgttgatgttgtggcccacaatgtaaagttccaagaagcgcgggtagccc  
 ttgatggaaggcaatttttaagttcctcgttaggtgagctcttcaggggagctgagccogtgcctgaaagggcc  
 cagctctgcaagatgagggttggaaagcgaatgagctccacaggtcacgggcccattagcatttgacaggtggctg  
 cgaaggtcctaaaactggcagcctatggccatttttctgggggtgatgcagtagaaggtgaagcgggtcttgttcc  
 cagcgggtcccatccaaggttcgoggttaggtctcgcgcggcagtcactagaggctcatctccgcccgaactcatg  
 accagcatgaagggcacgagctgcttcccaaaggcccccacaaagtataggtctctacatcgttaggtgacaaag  
 agacgctcgggtgcgaggatgcgagccgatcgggaagaactggatctcccgccaccaattggaggagtggtattg  
 atgtggtgaaagtagaagtcctgcgacgggcccgaacactcgtgctggcttttgtaaaaacgtgcgcagtagctgg  
 cagcgggtgcacgggctgtacatcctgcacgaggttgacctgacgaccgcgacaaaggaagcagagtgggaaattg  
 agccctcgcctggcgggttgggtgggtcttctacttgggtgcttgtccttgaccgctctggtgctcagagg  
 ggagttacgggtggatcggaccaccagccgcgcgagcccaagtcagatgtccgocgocggcgggtcggagcttg  
 atgacaacatcgcgcagatgggagctgtccatgggtctggagctccogogggcgtcaggtcaggcgggagctcctgc  
 aggttaacctcgcagatagacgggtcagggcgcgggttagatccaggtgatacctaatttccaggggctgggtgggtg  
 gggcgtcagatggcttgcagaggccgcatccccgcggcgcgactacggtaaccgcgcggcgggctgggcccgcg  
 ggggtgtccttggatgatgcatctaaaagcgggtgacgcggggcagccccggaggtagggggggctcgggacccg  
 cggggagagggggcaggggacgctcggcgcgcgcgcgggcaggagctgggtgctgcgcgcgtaggttgcggoga  
 acgogacgacgcggcgggttgatctcctgaatctggcgcctctgctgtaagacgacgggcccgggtgagcttgagcc  
 tgaagagaggttcgacagaatcaatttcgggtgctgctgacggcggcctggcgcacaaatctcctgcaogtctcctg  
 agttgtcttgataggogatctcggccatgaactgctcogatctcttctcctggagatctccgctcgggtcogct

ccacgggtggcggcgaggtcgttggaaatgogggccatgagctgcgagaaggcgttgaggcctccctcgttccaga  
 cggcggctgtagaccacgcccccttcggcatcgcgggcgcgcatgaccacctgcgcgagattgagctccacgtgcc  
 gggcgaagacggcgtagtttcgcaggcgcgtgaaagaggtagttgagggtggtggcgggtgtgttctgccacgaaga  
 agtacataaaccagcgtcgcaacgtggattcgttgatatacccccaaggcctcaaggcgcctccatggcctcgtaga  
 agtccacggcgaagttgaaaaactgggagttgcgcgcgcgacacgggttaactcctcctccagaagacgggatgagct  
 cggcgcacagtgctgcgcacctcgcgcctcaaaggctacaggggcctcttcttcttcttcaatctcctcttccataa  
 gggcctcccccttcttcttcttcttggcggcggtgggggaggggggacacggcggcgaacgaaggcgcacccgggaggc  
 ggtcgacaaaagcgcctcgatcatctcccgcggcgaacggcgcctggctcctgggtgacggcgcggccttctcgcggg  
 ggcgcagttggaagacgcgcctcgtcatgtcccgggttatgggttggcggggggcctgcatgoggcagggatacgg  
 cgctaacgatgcatctcaacaattggtggtgtaggtactcgcgcgcgagggacctgagcaggtccgcctcgaccg  
 gatcggaaaacctctcgagaaaggcgtctaaccagtcacagtcgcaaggtaggctgagcaccgtggcggggcggca  
 gcggggcgggcgtgggggtgtttctggcggagggtgctgctgatgatgtaattaaagtaggcggtcttgagacggc  
 ggatggctgcagagaagcaccatgtccttgggtccggcctgctgaatgcgcagggcggcggccatgcccaggctt  
 cgttttgacatcggcgcaggtctttagtagtcttgcatgagccttctacggcacttcttcttctctctctct  
 ctgtctcgcctctcttgcatctatcgctgcggcggcggcggagttggcogtaggtggcgcctcttctctccca  
 tggctgtgaccccgaagccccctcatcggctgaagcagggctaggtcggcgaacaacgcctcggctaataatggcct  
 gctgcacctgcgtgagggtagactggaagtcacatgctccacaagcgggtggatgcgcctcgtgtgatgggtgt  
 aagtgcagttggccataacggaccagttaacggctcgggtgaccggctgcgagagctcgggtgtacctgagacgcg  
 agtaagccctcgagtaaaatcgtagtcggtgcaagtccgcaccaggtactggatcccacaaaaagtgccggc  
 gcggctggcggtagaggggcccagcgtaggggtggcggggcctccggggcgagatcttccaaacataaggcgtgat  
 atccgtagatgtacctggacatccaggtgatgcggcggcgggtgggtggaggcgcgcggaaagtgcggacgcgggt  
 tccagatggtgocagcggcaaaaagtgctccatggctgggacgctctggcggctcaggcgcgcgcaatcgttga  
 cgcctctaccgtgcaaaaaggagagcctgtaagcgggactcttccgtggctcgggtggataaattcgcaagggtatc  
 atggcggacgcacgggggttcgagccccgtatccggcctcgcgcgtgatccatgcgggttacggcccgcgtgtcga  
 acccaggtgtgcgacgtcagacaacgggggagtgctcctttggcttcttccaggcgcggcggctgctgcgcta  
 gctttttggccactggcgcgcgcagcgtaaagcgggttaggctggaaagcgaagcattaagtggctcgtcctct  
 gttagcggagggttattttccaagggttagctgcgggacccccgggttcgagctcggaccggcggactgcggc  
 gaacgggggtttgctccccgtcatgcaagaccccgttgcataatcctccggaaacagggacgagccccctttt  
 tgcctttcccagatgcatccgggtgctgcggcagatgcgcctccctcctcagcagcggcaagagcaagagcagcgg  
 cagacatgcaggccacctccccctcctcctacgcgctcaggagggcgacatccgcgggtgacgcggcagcagat  
 ggtgattacgaacccccgcggcgcggggcccgccactacctggactggaggagggcgagggcctggcgcggcta  
 ggagcgcctctcctgagcgggtacccaagggtgcagctgaagcgtgatacgcgtgaggcgtacgtgcccgcggcag  
 aacctggttcgcgaccgcgagggagagggagcccagggagatgcgggatcgaaagttccacgcagggcgcgagctg  
 cggcatggcctgaatcgcgagcgggtgctgcgcgagggaggactttgagcccgcgcgcgaaccgggattagtc  
 gcgcgcgcacacgtggcggccgcgcgacctggtaaccgcatacagcagacgggtgaaccaggagattaactttcaa  
 aaaagctttaacaaccacgtgcgtacgcttgtggcgcgcgaggaggtggctataggactgatgcatctgtgggac  
 tttgtaagcgcgctggagcaaaaacccaaatagcaagcgcctcatggcgcagctgttcttatagtgacgacagc  
 agggacaacgaggcattcagggtgagcgtgctaaacatagtagagcccaggggcccgtggctgctcgatttgata  
 aacatcctgcagagcatagtggtgcaggagcgcagcttgagcctggctgacaagggtggccgcatcaactattcc  
 atgcttagcctgggcaagttttacgcccgaagatataccatacccttacgttcccatagacaaggaggt.aaag  
 atcgaggggttctacatgcgcctggcgtgaaaggtgcttaccttgagcgcgacctggcgtttatcgcaacgag

cgcatccacaaggccgtgagcgtgagccggcgcgagctcagcgaccgagctgatgcacagcctgcaaaagg  
gcectggctggcacgggcagcgggatagagagggcagctcctactttgacgcgggcgctgacctgcgctgggccc  
ccaagccgacgcgccctggagggcagctggggccggacctgggctggcggtggcaccgcgcgctggcaacgtc  
ggcggcgtggaggaatatgacgaggacgatgagtagagccagaggacggcgagtagtaagcgggtgatgttctg  
atcagatgatgcaagacgcaacggaccggcggtgcgggcgcgctgcagagccagccgtccggccttaactcca  
cggacgactggcgccaggtcatggaccgcatcatgtcgctgactgcgcgcaatcctgacgcggtccggcagcagc  
cgcaggccaaccggctctccgcaattctggaagcgggtgggtccggcgcgcaaacccacgcacgagaaggtgc  
tggcgatcgtaaaacgcgctggccgaaaacagggccatccggcccgacgaggccggcctggctctacgacgcgctgc  
ttcagcgcgtggctcgttacaaacagcggcaacgtgcagaccaacctggaccggctgggtgggggatgtgcgaggg  
cgtggcgacgctgagcgcgagcagcagcagggcaacctgggctccatgggtgactaaaagcctcctgagta  
cacagcccgcacaacgtgcgcggggacaggaggactacaccaactttgtgagcgcactgcccgtaatggtagctg  
agacaccgcaaaagtgaggtgtaccagctctgggcccagactatttttccagaccagtagacaaggcctgcagaccg  
taaacctgagccaggctttcaaaaaacttgacggggctgtgggggtgcgggctcccacaggcgaccgcgacccg  
tgtctagcttgtgacgcccactcgcgctgttgetgctgctaatagcgcccctcaaggacagtgggcagcgtgt  
cccgggacacatacctaggtcacttgetgacactgtaccgcgagggccataggtcaggcgcatgtggacgagcata  
ctttccaggagattacaagtgctcagccgcgctggggcaggaggacacgggcagcctggaggcaacctaaact  
acctgctgaccaaccggcgccagagaagatcccctcgttgacacagtttaaacagcagggaggagcgcattttgcgct  
acgtgcagcagagcgtgagccttaacctgatgcgcgacggggtaacgcccagcgtggcgctggacatgaccgcgc  
gcaacatggaacgggcatgtatgcctcaaacggccggtttatcaaccgcctaataggactacttgcacgcgcg  
ccgccgtgaaccccgagatattccaccaatgccatcttgaaccgcactggctaccgccccctggttctacaccg  
ggggattcgaggtgcccgagggtaacgatggattcctctgggacgacatagacgacagcgtgtttcccccgaac  
cgcagaccctgctagagttgcaacagcgcgagcagggcagaggcggcgctgcgaaaggaaagcttccgcaggccaa  
gcagcttgtccgatctaggcgctgcggcccccggtcagatgctagtagccatttccaagcttgatagggctctc  
ttaccagcactcgcaccaccgcgcccgcctgctgggcgaggaggtagtacctaaacaactcgtgctgcagccgc  
agcgcgaaaaaaaaactgcctccggcatttcccaacaacgggatagagagcctagtggacaagatgagtagatgga  
agacgtacgcgcaggagcacagggacgtgccaggccccgcgcccaccgctcgtcaaaggcaccgaccgtcagc  
ggggctcgtgtgtgggaggacgatgactcggcagacgacagcagcgtcctggatttgggaggagtggaaccctgt  
ttgcgcaccttcgcccaggctggggagaaatgttttaaaaaaaaaaaagcatgatgcaaaaataaaaaactacca  
aggccatggcaccgagcgttggtttctgtattccccttagtatgcggcgcgcgcgatgtatgaggaaggtcc  
tctccctcctacgagagtggtgagcgcggcgccagtgggcgggcgctgggttctcccttcgatgctccct  
ggaccgcgcttgtgcctccgcggctacctgcggcctaccggggggagaaacagcatccgttactctgagttggc  
accctattcgacaccaaccgctgtgtacctgggtggacaacaagtcaacggatgtggcatccctgaactaccagaa  
cgaccacagcaactttctgaccaggtcattcaaaaactgactacagcccggggaggcaagcacacagaccat  
caatcttgacgaccggctgcactggggcgggacctgaaaaccatcctgcataccaacatgcaaatgtgaacga  
gttcatgtttaccaataagtttaaggcgcggtgatgggtgtcgcttgccactaaggacaatcaggtggagct  
gaaatacgagtggtggagttcacgctgcccagggcaactactccgagaccatgaccatagacctatgaacaa  
cgcgatcgtggagcactactgaaagtgggcagacagaacgggggttctggaaagcgacatcggggtaaaagttga  
caccgcgaactcagactggggtttgaccccgctcactggctctgtcatgcctggggatatacaaacgaagcctt  
ccatccagacatcatttgcctgcccaggatgcgggggtggaactcaccacagcgcctgagcaacttgttgggcat  
ccgcaagcggcaacccttccaggagggtcttaggatcacctacgatgatctggagggtggaacattcccgcact  
gttggatgtggacgcctaccaggcgagcttgaagatgacaccgaacagggcggggggtggcgaggcggcagcaa

cagcagtgccagcggcgcggaagagaactccaacgcggcagccgcggaatgcagccggtggaggacatgaacga  
tcatgccattcgccggcgacacctttgccacacgggctgaggagaagcgcgctgaggccgaagcagcggccgaagc  
tgccgccccgctgcgcaaacccgaggtcgagaagcctcagaagaaacccggtgatcaaacccctgacagaggacag  
caagaaacgcagttacaacctaaataagcaatgacagcaccttcaccagtagccgcagctggtagccttgcatataa  
ctacggcgaccctcagaccggaatccgctcatggaccctgctttgcaectctgacgtaacctgaggctcggagca  
ggtctactggtcgttgccagacatgatgcaagaccccgctgacctccgctccaacgcccagatcagcaacttcc  
ggtggtggggcggagctggtgcccgtgcaactccaagagcttctacaacgaccaggccgctctactcccaactcat  
ccgcccagtttacctctctgacccaagctgttcaatcgctttcccgagaaccagattttggcgcgcccgccagcccc  
caccatcaccaccgctcagtgaaaacggtccctgctctcacagatcacgggacgctaccgctgcgcaacagcatcgg  
aggagtcacagcagtgaccattactgacgcccagacgcccacctgcccctacgtttacaaggccctgggcatagt  
ctcgccgcccgtctctatcgagccgcaactttttgagcaagcatgtccatccttatatcgcccagcaataaacacagg  
ctggggcctgcgcttccccaaagcaagatggttggcgggggccaagaagcgcctccgaccaacaccagtgccgctgcg  
cgggcaactaccgcccggccctggggcgcgcaaaaacggggccgcaactggggcgaccaccgctcgatgacgcatcga  
cgcggtggtggaggaggcgcgcaactacacgcccacgcccaccagtgctccacagtggaacgcccattcagac  
cgtggtgcgaggagcccggcgctatgctaaaaatgaagagacggcgaggcgctagcaacgctccaccgcccggc  
accgggcaactgcgcccacgcgcccggcgccctgcttaaccgcgcaegtcgcaccggccgacggggggccat  
gcccggcgcctcgaaggtggccgggggtattgtcaactgtgccccccagggtccaggcgacgagcggccgcccgacg  
agcccgggcccattagtgctatgactcagggtcgcaggggcaacgtgtattgggtgcgcaactcggtagcggcct  
gcccgtgcccgtgcccaccggcccccccgcgcaactagattgcaagaaaaactacttagactcgtactgttgat  
gtatccagcggggggcgcgcaacgaagctatgtccaagcgcaaaaatcaagaagagatgctccaggtcatcgc  
gccggagatctatggccccccgaagaaggaagagcaggattacaagccccgaaagctaaagcgggtcaaaaagaa  
aaagaagatgatgatgatgaacttgacgacgaggtggaactgctgcaacgctaccgcccagggcgaogggtaaca  
gtggaaggtcgacgcgtaaaacgtgttttgcgaccggcaccaccgtagctttacgcccgggtgagcgtccac  
ccgcaactacaagcgcgtgtatgatgaggtgtacggcgacgaggacctgcttgagcaggccaaacgagcgcctcgg  
ggagtttgctacggaaagcggcataaaggacatgctggcgttgccgctggaacgagggcaacccaacacctagcct  
aaagcccgtaaacactgcagcaggtgctgcccgcgcttgcaaccgctccgaagaaaagcggccctaaagcgcgagtc  
tggtgacttgccaccaccgctgcagctgatggtagcccaagcggccagcgaactggaagatgctctggaaaaaatgac  
cgtggaacctgggctggagcccaggtccgctgcccgaatcaagcaggtggcgccgggactgggctgacgac  
cgtggaactcagataccactaccagtagcaccagtagtccaccgcccacagagggcatggagacacaaaacgctc  
cccggttgctcagcgggtggcggtgcccgggtgacggcggtcgtgcccggcgtccaagacctctacggaggt  
gcaaacggaccgctggatgtttcgcgtttcagccccccggcgcccgcggttcgaggaagtagggcgccgcccag  
cgcgctactgcccgaatatgcctacatccttccattgcccctacccccggctatcgtggetacacctaccgccc  
cagaagaogagcaactaccgacgcccgaaccaccactggaacccgcccgcgcccgtgcgctgcgcccagccgctgct  
ggccccgatttccgtgcccaggggtggctcgcgaaggaggcaggacctggtgctgccaacagcggcctaccaccc  
cagcatcgtttaaaagccggctctttggttcttgcagatatggccctcactgcccctccgtttcccgggtgccc  
gggattccgaggaagaatgcaccgtaggaggggcatggccggccacggcctgacggggcggcatgctgctgcccga  
ccaccggcgggcgcgctgcacccgctgcagcgggggtatcctgccctccttattccactgatcgcgccc  
ggcgattggcgccgtgcccggaaattgcatccgtggccttgacggcgacagagacactgatataaaaacagttgcat  
gtggaaaaaatcaaaaataaaaagtctggactctcaccgctcgttggctctgtaactattttgtagaatggaagaca  
tcaactttcgtctctggcccgcgacacggctcgcgcccgttcatgggaaaactggcaagatatggcaccagca  
atatgagcgggtggcgccctcagctggggctcgtgtggagggcattaaaaatttccggttccaccggttaagaact

atggcagcaaggcctggaacagcagcacaggccagatgctgagggataagttgaaagagcaaaatctccaacaaa  
 aggtggtagatggcctggcctctggcattagcgggggtggaggacctggccaaccaggcagtgcaaaaataagatta  
 acagtaagcttgatccccgcctcccgtagaggagcctccaccggccgtggagacagtgctccagaggggctg  
 gcgaaaagcgtccgocccccgacaggggaagaaactctggtgacgcaaatagacgagcctccctcgtacgaggagg  
 tactaaagcaaggcctgcccaccaccogtcccatcgocccatggtaaccggagtgctgggcccagcacacaccog  
 taacgctggacctgectccccccgacaccccagcagaaacctgtgctgcccaggeccgacccgctgtgtgtaa  
 cccgtcctagccgctgctccctgcccgcgcccagcgggtccgcatcgcttggggccctgtagccagtggaact  
 ggcaaaagcacactgaacagcatcgtgggtctgggggtgcaatccctgaagcggcagcatgcttctgaatagcta  
 acgtgctgtatgtgtgtcatgtatgctccatgtgcccgcagaggagctgctgagccgcccgcgcccgccttcc  
 caagatggctaccccttcgatgatgcccagtggtcttacatgcacatctcggggccaggacgcctcggagtaact  
 gagccccgggctgggtgcagtttcccgcgcccaccgagacgtaacttcagcctgaataacaagttagaaaccccac  
 ggtggcgcctacgcacgacgtgaccacagaccgggtcccagcgtttgaocgtgcccgttcatccctgtggaccogtga  
 ggatactgcgtactcgtacaaggcgcggttcccctagctgtgggtgataaccgtgtgctggacatggcttccac  
 gtactttgacatccgcggcgtgctggacaggggcccactctttaaagccctactctggcactgectacaacgcct  
 ggtcccaagggtgccccaaatccctgcaaatgggatgaagctgctactgctcttgaataaaacctagaagaaga  
 ggacgatgacaacgaagacgaagtagacgagcaagctgagcagcaaaaaactcacgtatctgggcaggcgcctta  
 tctctggtataaaatattacaaggagggtattcaaatagggtgtcgaagggtcaaacacctaaatatgccgataaaac  
 atttcaacctgaacctcaaataggagaatctcagtggtacgaaaactgaaattaatcatgcagctgggagagtcct  
 taaaaagactaccccaatgaaacctgttacgggtcatatgcaaaaccccacaaatgaaaatggagggcaaggcat  
 tcttgaagcaacaaaatggaaagctagaaagtcaagtggaatgcaatcttctcaactactgaggcgaccgc  
 aggcaatgggtgataacttgactcctaaagtgggtattgtacagtgaaagatgtagatatagaaaccccagacactca  
 tatttcttacatgcccactattaaggaaggtaactcacgagaactaatgggccaacaatctatgcccacaggcc  
 taattacattgcttttagggacaattttattgggtctaatgtattacaacagcacgggtaatatgggtgttctggc  
 gggccaagcatcgcagttgaatgctgtgttagatttgcaagacagaaacacagagcttccataccagcttttgc  
 tgattccattgggtgataagaaccaggtaactttctatgtggaatcaggctgttgacagctatgatccagatgttag  
 aattattgaaaatcatggaactgaagatgaacttccaaatctactgctttccactgggaggtgtgattaatacaga  
 gactcttaccaggtaaaacctaaaacagggtcaggaaaatggatgggaaaaagatgctacagaatcttcagataa  
 aatgaaaataagagttggaaataatcttgccatggaaatcaatctaaatgccaacctgtggagaaatctcctgta  
 ctccaacatagocgtgtatctgcccgacaagctaaagtacagtccttccaacgtaaaaatctctgataacccaaa  
 cacctacgactacatgaacaagcagtggtggctccgggttagtggaactgctacattaaccttggagcacogctg  
 gtcccttgactatatggacaacgtcaacccttttaaccaccaccgcaatgctggcctgocgtacogctcaatgtt  
 gctgggcaatggctcgtatgtgcccttccacatccagggtgectcagaagttcttggcattaaaaacctcctct  
 cctgcccgggctcatacacctacgagtggaacttcaggaaggatgttaacatgggtctgcagagctccctaggaaa  
 tgacctaaagggtgacggagccagcattaagtttgatagcatttgcccttacgccacctcttccccatggccca  
 caacaccgctccacgcttgaggccatgcttagaaaacgacaccaacgaccagtcctttaaactatctctcgc  
 cgcacaacatgctctacctatacccgcacaacgctaccaacgtgccatataccatccccccgcaactgggcggc  
 tttccgcggctgggectteacgcgcttaagactaaggaaaccccatcaactgggctcgggctacgaccttatta  
 cacctactctggetctataccctacctagatggaacctttacctcaaccacaccttaagaagggtggccattac  
 ctttgactctctgtcagctggcctggcaatgaccgctgcttacccecaacgagtttgaatgaagcgtcag  
 tgacggggagggttacaacgttggccagtgtaacatgaccaaagactgggttctggtacaaatgctagctaaacta  
 caacattggctaccagggtctctatatcccagagagctacaaggaccgcatgtaactccttcttagaaactcca

gccccatgagccgtcaggtgggtggatgataactaaatacaaggactaccaacaggtgggcatcctacaccaacacaa  
caactctggatttgttgggtaccttgcceccaccatgcgggaaggacagggcctaccctgctaacttcccctatec  
gcttataggcaagaccgcagttgacagcattaccagaaaaagtttctttgogatcgacccttggcgcatccc  
attctccagtaactttatgtccatgggcgcactcacagacctgggcaaaaaccttctctacgccaaactccgcca  
cggctagacatgacttttgaggtggatcccatggacgagcccaccttctttatgttttgtttgaagtcttga  
cgtggctccgtgtgcaaccggccgcaccgcggtcatcgaaaacctgtacctgogcaegcccttctoggcoggeaa  
cgccacaacataaagaagcaagcaacatcaacaacagctgcggccatgggctccagtgagcaggaactgaaagcc  
attgtcaaagatcttggttgtgggccataatkttttgggcaacctatgacaagcgcttccaggcttgtttctcca  
cacaagctcgctgcggcatagtcaatacggccggtcgogagactggggggctacactggatggccttgcctgg  
aaccgcactcaaaaacatgctacctctttgagcccttggcttttctgaccagcgactcaagcaggtttaccag  
tttgagtacgagtcactcctgcggcgtagcgccattgcttcttccccgaccgctgtataacgctggaaaagtcc  
acccaaagcgtacaggggcccacteggcgctgtggactattctgctgcatgtttctccaogccttggcaac  
tggccccaaactcccattggatcacaacccccaccatgaacctattaccggggtacccaaactecatgctcaacagt  
ccccaggtagacgccaccctgogtgcgaaccaggaacagctctacagcttccctggagcgccactcgcctacttc  
cgcagccacagtgccgagattaggagcgccacttcttttgtcacttgaaaaacatgtaaaaaataatgtactaga  
gacactttcaataaaggcaaatgcttttatttgtacactctcgggtgattatttaccceccaccttgcogtctgc  
gcogtttaaaaatcaaaaggggttctgcgcgcategctatgocccactggcagggacacgcttgcgatactgggtg  
ttagtgtccacttaaaactcaggcacaaccatccgcggcagctcggtagaagtttctactccacaggtcgcgacc  
atcaccaaacgcttttagcaggtcgggcgcogatatctgaaagtgcagttggggcctccgcccctgcgcgcgag  
ttgcgatacacaggggtgcgacactggaacactatcagcgcgggtgggtgcacgctggccagcagcctctgtcg  
gagatcagatccgcgtccaggtcctccgcgttgcctcagggcgaacggagtcaactttggtagctgcttcccaaa  
aagggcgctgcccaggctttgagttgcactcgcaccgtagtggcatcaaaaggtgaccgtgcccggctcgggcg  
ttaggatacagcgcctgcataaaaagccttgatctgcttaaaaagccacctgagccttgcgcctcagagaagaac  
atgcogcaagacttgcggaaaaactgattggcgggaacaggccgcgtcgtgcacgcagcaecttgcgtcgggtg  
gagatctgcaccacatttgcggccccaccgggttcttccagatcttggccttgcctagactgctccttcagcgcgcg  
tgcocgttttgcctcgtcacatccatttcaatacagtgctccttattatcataatgcttccgtgtagacactta  
agctcgccttcgatctcagcgcagcgggtgcagccacaacgcgcagcccgtgggctcgtgatgctttaggtcacc  
tctgcaaacgactgcaggtacgcctgcaggaatcgcccacatcatcgtcacaaaggtcttgttgcgtggtaaggtc  
agctgcaaacccgcgggtgctcctcgttcagccaggtcttgcatacggccgcagagcttccacttggtcaggcagt  
agtttgaagttcgcctttagatcgttatccacgtggtaacttgtccatcagcgcogogcagcctccatgcccctc  
tcccacgcagacaagatcggcacactcagcgggttcatcaccgtaatttactttccogcttgcgtgggctcttcc  
tcttctcttgcgtcgcataaccacgcgcactgggtcgtcttcatcagcgcgcgactgtgogcttacctct  
ttgccatgcttgattagcaccgggtgggttgcctgaaacccaccattttagogccacatcttctcttctctctog  
ctgtccacgattacctctgggtgatggcgggcgctcgggcttgggagaagggcgtctcttttcttcttgggcca  
atggccaaatccgcgcgaggtcagtgccgcgggctgggtgtgcgcggcaccagcgcgtcttgtgatgagctc  
tccctcgtcctcggactcgatacgcgcctcatccgctttttggggggcgcocggggaggcggcgagcggggac  
ggggagcacacgtcctccatgggtgggggacgtcogcgcgcaccgcgtccgcgctcgggggtgggttgcgcgtgc  
tctcttcccgactggccatttcttctctataggcagaaaaagatcatggagttagtcgagaagaaggacagc  
ctaaccgccccctctgagttcgcaccaccgcctccaacgatgcccgaacgcgcctaccaccttcccgtcag  
gcacccccgcttgaggaggaggaagtattatcgagcaggaccaggttttgaagcgaagacgacgaggaccgc  
tcagtaccaacagaggataaaaagcaagaccaggacaacgcagaggcaaacgaggaaacaagtccgggggggggac

gaaaggcatggcgactacctagatgtgggagacgacgtgctgttgaagcatctgcagcgccagtgcgccattatc  
 tgcgacgcgttgcaagagcgcagcgcgatgtgccctcgccatagcggatgtcagccttgccctacgaacgccaccta  
 ttctcaccgcgcgtaccccccaaacgccaaagaaaaacggcacatgagcagcccaaccgcgcctcaacttctacccc  
 gtatttgccgtgcccagaggtgcttgccacctatcacatctttttccaaaactgcaagatacccctatcctgcccgt  
 gccaacccgcagcgcgagcggacaagcagctggccttgccgagggcgctgtcatacctgatatacgcctcgtcaac  
 gaagtgccaaaaatctttgagggctcttgacgcgacgagaagcgcgcggcaaacgcctctgcaacaggaaaaacagc  
 gaaaatgaaagtcaactctggagtgttgggtggaactcgaggggtgacaacgcgcgcctagccgtactaaaacgcagc  
 atcgaggtcaccactttgectaccggcacttaacctaccccccaaggctcatgagcacagtcagagtgagctg  
 atcgtgcgcctgcccagcccctggagagggatgcaaatgtgcaagaacaaacagagggggcctaccgcagtt  
 ggcgacgagcagctagcgcgcctggcttcaaacgcgcgagcctgcccacttgaggagcgcagcgaactaatgatg  
 gccgcagtgctcgttacgcgtggagcttgagtgcagcagcggctctttgctgacccggagatgcagcgcgaagcta  
 gaggaaaaattgcaactacacctttcgacagggctacgtaaccagggcctgcaagatctccaacgctggagctctgc  
 aacctggtctcctaccttggaaatgtgacgaaaaaccgccttgggcaaaaacgtgcttcatccacgctcaagggc  
 gagggcgcgcgcgactacgtccgcgactgcttacttatttctatgctacacctggcagacggccatgggcgtt  
 tggcagcagtgcttggaggagtgcaacctcaaggagctgcagaaaactgctaaagcaaaacttgaaggacctatgg  
 accgcttcaaagagcgcctccgtggcgcgcacctggggacatcattttccccgaacgctgcttaaaacctg  
 caacagggctctgccagacttaccagtcaaaagcatggtgcagaactttaggaactttatcctagagcgcctcagga  
 atcttgcgccccacctgctgtgcacttccctagcagcttgggtgccattaaagtaccgcgaatgccctccgcgcctt  
 tggggccactgctaccttctgcagctagccaaactaccttgcctaccactctgacataatggaagacgtgagcgg  
 gacggctctactggagtgtcactgtcgcctgcaacctatgcaccccgaccgctccctggtttgcaattcgcagctg  
 cttaacgaaagtcaaattatcggtacctttgagctgcaggggtccctcgctgacgaaaagtccgcggctccgggg  
 ttgaaactcactccggggctgtggaagctggcttaccttcgcaaatgtgacctgaggactaccacgcccacgag  
 attaggttctacgaagaccaatcccgcgcgcaaatgcccagcttaccgctgctcattaccaggggcaactt  
 cttggccaattgcaagccatcaacaaagcccgcaagagttctgctacgaaagggacggggggttacttggac  
 ccccagtcggcgaggagctcaacccaatccccccgcgcgcgagccctatcagcagcagcgcggggccttgc  
 tcccaggatggcacccaaaaagaagctgcagctgcgcgcgcccacccacggacgaggaggaataactgggacagtc  
 ggcagaggaggttttggacgaggaggaggagacatgatggaagactgggagagcctagacgaggaagcttccga  
 ggtcgaagaggtgtcagacgaaacaccgtaacctcggctgcattcccctcgccggcgcgccagaaaatggcaac  
 cggttccagcatggctacaacctccgctcctcaggcgcgcgcgcgactgcccgttcgcccacccaaccgtagatg  
 ggacaccactggaaaccagggccggtaagtccaagcagcgcgcgcgcttagcccaagagcaacaacagcgcgaagg  
 ctaccgctcatggcgcgggcaacaagacgccatagttgcttgccttgcagactgtgggggcaacatctccttgc  
 ccgcgcttctctctaccatcaaggcgtggccttccccgtaacatcctgcattactaccgctcatctctacag  
 cccatactgcacggcgggcagcggcagcggcagcaacagcagcggccacacagaagcaaggcagccggatagca  
 agactctgacaaaagcccaagaaatccacagcggcggcagcagcaggaggaggagcgtgcgtctggcgcaccaacg  
 aaccgctatcgaccgcgagcttagaaaacaggattttcccactctgtatgctatatttcaacagagcagggggcc  
 aagaacaagagctgaaaaataaaaaacaggctctctgcgatccctcaccgcagctgctgtatcacaagaagcgaag  
 atcagcttcggcgcacgctggaagacgcggaggctctcttcagtaataactgcgcgctgactcttaaggactagt  
 ttgcgccttctctcaaatgaaagcgcgaaaactacgtcatctccagcggccacacccggcgcgacacctgtcg  
 tcagcgcctatgatgcaaggaaatccccagcctacatgtggagttaccagccacaaatgggacttgcggctg  
 gagctgcccagactactcaaccogaataaactacatgagcgcgggaccccacatgatataccgggtcaacggaa  
 tccgcgcccaccgaaaccgaattctcttggaaacaggcggctattaccaccacacctcgtaataaccttaatcccc

gtagttggcccgtgccectgggtgtaccaggaagtccecgctcccaccactgtgggtacttcccagagacgcccagg  
 cogaagttcagatgactaactcagggggcagccttgcggggcgtttcgtcacaggggtgcgggtcgcccgggcagg  
 gtataactcacctgacaatcagagggcgaggtattcagctcaacgacgagtcgggtgagctcctcgcttgggtctcc  
 gtccggacgggacatttcagatcggggcgccggcgtccttcattcaecgecctcgtcaggcaatcctaactctgc  
 agacctcgtcctctgagccggcctctggaggcattggaactctgcaatttattgaggagtttgtgccatcggtct  
 actttaaccccttctcgggacctcccggccactatccggatcaatttattcctaactttgacgcggtaaaggact  
 cggcggacggctacgactgaatgtaagtggagaggcagagcaactgcgcctgaaacacctgggtccactgtcgcc  
 gccacaagtgtttgcocogcactccggtgagttttgctactttgaattgcccaggatcatatcgagggcccg  
 cgcacggcgtccggcttaccgccaggagagccttcccgtagcctgattcgggagtttaaccagcgcctcctgc  
 tagttgagcgggacaggggaccctgtgttctcactgtgatttgcaactgtcctaaccttggattacatcaagatc  
 ctctagttataactagagtaccggggatcttattccctttaactaataaaaaaaaaataataaagcatcacttac  
 ttaaaatcagttagcaatttctgtccagtttattcagcagcaccctcctgcctcctcccagctctgggtattgc  
 agcttcctcctgggtgcacaacttctccacaatctaaatggaatgtcagtttctcctgttctcctgtccatccgca  
 cccactatcttcagttgttgcagatgaagcgcgcaagaccgtctgaagataccttcaaccccggtgatccat  
 gacacggaaaacggctcctccaactgtgccttttcttactcctcccttggatcccccaatgggttcaagagagt  
 cccctggggactctcttgcgcctatccgaacctctagttacctccaatggcatgcttgcgctcaaaatgggc  
 aacggcctctctctggacggggcggcaaccttacctcccaaatgtaaccaactgtgagcccacctctcaaaaa  
 accaagtcaaacataaacctggaatatctgcacctcaccagttacctcagaagccctaactgtggctgcgcgc  
 gcaecttaatggctcggggcaacacactcaccatgcaatcacaggccccgctaaccgtgcaogactccaaactt  
 agcattgcccaccaaggaccctcacagtgtcagaaggaaagctagccctgcaaacatcaggccccctcaccacc  
 accgatagcagtacccttactatcactgcctcaccctcctaactactgocactggtagcttgggcattgacttg  
 aaagagcccatttatacacaaaatggaaaactaggactaaagtaacggggctccttgcagtaaacagacgacct  
 aacactttgacogtagcaactgggtccaggtgtgactattaataacttctctgcaaaactaaagttactggagcc  
 ttgggttttgattcacaaggcaatatgcaacttaatgtagcaggaggactaaggattgatctcaaaacagacgc  
 cttataacttgatgttagttatccgtttgatgctcaaaaccaactaaatctaagactaggacagggccctctttt  
 ataaactcagcccacaacttggatattaactacaacaaaggcctttacttgtttacagcttcaacaattccaaa  
 aagcttgaggttaacctaaagcactgccaaggggtgatggttgacgctacagccatagccattaatgcaggagat  
 gggcttgaatttggttccactaatgcaccaaacacaaatcccccaaaaataatggccatggcctagaattt  
 gattcaacaaggctatgggtcctaaactaggaactggccttagttttgacagcacaggtgccattacagtagga  
 acaaaaaataatgataagctaactttgtggaccacaccagctccatctcctaactgtagactaaatgcagagaaa  
 gatgctaaactcacttgggtcttaacaaaatgtggcagtcataacttgctacagttcagttttggctgtttaa  
 ggcagtttggctccaatatctggaacagttcaagtgctcatcttattataagatttgacgaaaatggagtgcta  
 ctaacaattccttccctggaccagaatattggaactttagaaatggagatcttactgaaggcacagcctataca  
 aacgctgttggatttatgocctaacctatcagcttatccaaaatctcagggtaaaaactgccaaaagtaacattgtc  
 agtcaagtttacttaaacggagacaaaactaacctgtaacactaaccttaccactaaacgggtacacaggaaca  
 ggagacacaactccaagtgcatactctatgtcattttcatgggactgggtctggccacaactacattaatgaaata  
 tttgccacatcctcttactttttcatacattgcccagaataaagaatcgtttgtgttatgtttcaacgtgtt  
 ttttttcaattgcagaaaatttcaagtcatttttcttccagtagtatagccccaccaccacatagcttatacag  
 atcacogtaccttaataaacctcacagaaccttagtattcaacctgocacctccctcccaacacacagagtacac  
 agtctttctcccggctggccttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacatattcttaggtgttatattcca  
 cacggtttctgtcagacaaaacogctcatcagtgatattaataaactcccgggcagctcacttaagttcatgtc

gctgtccagctgctgagccacaggctgctgtccaacttgcgggtgcttaacgggaggcgaaggagaagtccaogc  
ctacatggggtagagtcataatcgtgcatcaggatagggcggtggtgctgcagcagcgcggaataaaactgctg  
ccgcccgcctccgtcctgcaggaatacaacatggcagtggtctcctcagcgatgattcgcaaccgcccgcagcat  
aaggcgcttgtcctccgggcacagcagcgcaccctgatctcacttaaatcagcacagtaactgcagcacagcac  
cacaatatgttcaaaatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcatggcggggaccacagaacccaogtg  
gccatcataccacaagcgcaggtagattaagtggcgaccctcataaacacgctggacataaacattacctcttt  
tggcatgttgaattcaccacctccgggtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccacctcct  
aaaccagctggccaaaactgcccgcggctatacactgcagggaaacgggactggacaatgacagtgagagc  
ccaggactcgtaacatggatcatcatgctcgtcatgatataatggtggcacaacacaggcacacgtgcataca  
cttctcaggattacaagctcctccgcgttagaaccatatacccagggaacaacccattcctgaatcagcgtaaa  
tcccacactgcagggaaagacctcgcagtaactcaegttgtgcatgtcaaagtgttacattcgggcagcagcgg  
atgatcctccagtatggtagcggggttctgtctcaaaaggaggtagacgatccctactgtacggagtgcgccc  
agacaaccogagatcgtgtggctcgtagtgatgccaaatggaaacgcggacgtagtcataattcctgaagcaaa  
accaggtgcggcggtgacaaaacagatctcgtctccggctcgcgcttagatcgtctgtgtagtagttgtagt  
atatecactctctcaagcatccaggcgccccctggctccgggtctatgtaaactcctcatgcgcccgtgcc  
tgataacatccaccaccgcagaataagccacaccagccaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggag  
gagcgggaagagctggaagaaccatgttttttttttttccaaaagattatccaaaacctcaaatgaagatct  
attaagtgaacgcgctcccctccgggtggcgtggtcaactctacagccaaagaacagataatggcatttgaaga  
tggtgcacaatggcttccaaaaggcaaacggccctcacgtccaagtggacgtaaaaggctaaaccttcagggtga  
atctcctctataaacattccagcaccttcaacatgcccaataattctcatctcgccaccttctcaatatact  
ctaagcaaatccgaatattaagtcggccattgtaaaaatctgctccagagcgcctccacctcagcctcaag  
cagcgaatcatgattgcaaaaattcagggtcctcacagacctgtataagattcaaaagcggaacattaacaaaa  
taccgcatcccgtaggtcccttcgcagggccagctgaacataatcgtgcaggtctgcaaggaccagcgcggcca  
cttcccgcaggaaccttgacaaaagaacccacactgattatgacacgcataactcggagctatgctaaccagcg  
tagccccgatgtaagcttctgtgcatggcgcgatataaaatgcaaggctgctcaaaaaatcaggcaagcc  
tcgcgcaaaaaagaaagcacatcgtagtcatgctcatgcagataaaggcaggtaagctcgggaaccaccacagaa  
aaagacaccattttctctcaaacatgtctcgggttctgcataaacacaaaaataaaataacaaaaaacattt  
aaacattagaagcctgtcttacaacaggaaaaaacaccttataagcataagacggactacggccatgccggcgt  
gaccgtaaaaaaactggctaccgtgattaaaaagcaccaccgacagctcctcggctcatgtccggagtataatgt  
aagactcggtaaacacatcagggtgattcatcggctcagtgctaaaaagcgcgcaaatagcccgggggaatacat  
accgcagggcgtagagacaacattacagccccataggaggtataacaaaattaataggagagaaaaacacataa  
acacctgaaaaacctcctgcttaggcaaaatagcaccctcccgtccagaacaacatacagcgttccacagcgg  
cagcctaacagtcagcctaccagtaaaaaagaaaacctattaaaaaacaccactcgacacggcaccagctcaa  
tcagtcacagtgtaaaaaaggccaagtgcagagcaggtatataataggactaaaaaatgacgtaacgggtaaagt  
ccacaaaaaacaccagaaaaacgcacgcgaacctacgcccagaaacgaaagccaaaaaacccacaactcctca  
aatcgtcacttccgtttccacggttacgtaacttccattttaagaaaactacaattcccaacacatacaagtt  
actcggcctaaaaacctacgtcaaccgccccgttccacgcgcccgccacgtcacaacctccacccccctatta  
tcatattggcttcaatccaaaataaggatattattgatgatnnnnnttaattaa

<210> 6  
 <211>  
 <212> DNA  
 <213> L523S  
 <400> 6

atgaacaaactgtatatacggaaacctcagcagagaacgcgcgccctcggacctagaaagtatcttcaaggacgcc  
 aagatcccgggtgtcgggacccttcctgggtgaagactggctacgcggttcgtggactgcccggacgagagctgggcc  
 ctcaaggccatcgaggcgtttcaggtaaaatagaactgcacgggaaacccatagaagttgagcactcggtccca  
 aaaaggcaaaggattcggaaacttcagatacgaatatcccgctcatttacagtgagggtgctggatagttta  
 ctagtccagtatggagtggtggagagctgtgagcaagtgaacactgactcggaaactgcagttgtaaatgtaacc  
 tattccagtaaggaccaagctagacaagcactagacaaactgaatggatttcagttagagaatttcacctgaaa  
 gtagcctatataccctgatgaaaacggccgcccagcaaaaccccttcgacgagccccgaggtcgcgggggcttggg  
 cagaggggctcctcaaggcaggggtctccaggatcogtatccaagcagaaaccatgtgatttgccctcgcgctg  
 ctggttcccacccaatttggttgagccatcataggaaaagaaggtgccaccattcggaacatcaccaaacagacc  
 cagtcataaatcgatgtccaccgtaaaagaaaatgcgggggctgctgagaagtogattactatcctctctactcct  
 gaaggcacctcgcggcttgaagtctattctggagattatgcataaggaagctcaagatataaaaattcacagaa  
 gagatccccttgaagatttagctcataataactttggttgagctcttattggtaaaagaaggaagaaatcttaa  
 aaaattgagcaagacacagacactaaaatcacgatatctccattgcaggaattgacgctgtataatccagaacgc  
 actattacagttaaaggcaatggtgagacatgtgccaaagctgaggaggagatcatgaagaaaatcagggagctct  
 tatgaaaatgatattgettctatgaatcttcaagcacatttaattcctggattaaatctgaacgecttgggtctg  
 tcccaccacttcagggatgccacctcccacctcagggcccccttcagccatgactcctccctaccgcagttt  
 gagcaatcagaaacgggagactgttcatctgtttatcccagctctatcagtcggtgccatcatcggcaagcagggc  
 cagcacatcaagcagcttctcgtttgctggagcttcaattaagattgctccagcgggaagcaccagatgctaaa  
 gtgaggatgggtgattatcactggaccaccagaggctcagttcaaggctcagggagaatttatggaaaaattaaa  
 gaagaaaactttgttagtcctaaagaagaggtgaaacttgaagctcatatcagagtgccatcctttgctgctggc  
 agagttattggaaaaggaggcaaacgggtgaatgaacttcagaatttgcagtgccagaagttgttgcctcgt  
 gaccagacacctgatgagaatgaccaagtgggtgtcaaaaactggctcacttctatgcttgccaggttgcccag  
 agaaaaattcaggaattctgactcaggtaaagcagcaccacaacagaaggctctgcaaagtgaccacctcag  
 tcaagacggaagtaa

<210> 7  
 <211> 579  
 <212> prot  
 <213> L523S  
 <400> 7

Met	Asn	Lys	Leu	Tyr	Ile	Gly	Asn	Leu	Ser	Glu	Asn	Ala	Ala	Pro	Ser
				5					10					15	
Asp	Leu	Glu	Ser	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Lys	Ile	Pro	Val	Ser	Gly	Pro
			20					25					30		
Phe	Leu	Val	Lys	Thr	Gly	Tyr	Ala	Phe	Val	Asp	Cys	Pro	Asp	Glu	Ser
			35				40					45			
Trp	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Lys	Ile	Glu	Leu	His

	50					55					60				
Gly	Lys	Pro	Ile	Glu	Val	Glu	His	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Gln	Arg	Ile
65					70					75					80
Arg	Lys	Leu	Gln	Ile	Arg	Asn	Ile	Pro	Pro	His	Leu	Gln	Trp	Glu	Val
			85					90						95	
Leu	Asp	Ser	Leu	Leu	Val	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Glu	Ser	Cys	Glu	Gln
			100					105					110		
Val	Asn	Thr	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Val	Val	Asn	Val	Thr	Tyr	Ser	Ser
			115				120						125		
Lys	Asp	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Leu	Asp	Lys	Leu	Asn	Gly	Phe	Gln	Leu
						135						140			
Glu	Asn	Phe	Thr	Leu	Lys	Val	Ala	Tyr	Ile	Pro	Asp	Glu	Thr	Ala	Ala
145					150					155					160
Gln	Gln	Asn	Pro	Leu	Gln	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Gly	Leu	Gly	Gln
				165					170					175	
Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Val	Ser	Lys	Gln	Lys
			180					185					190		
Pro	Cys	Asp	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Phe	Val	Gly
		195					200					205			
Ala	Ile	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Arg	Asn	Ile	Thr	Lys	Gln
						215					220				
Thr	Gln	Ser	Lys	Ile	Asp	Val	His	Arg	Lys	Glu	Asn	Ala	Gly	Ala	Ala
225					230					235					240
Glu	Lys	Ser	Ile	Thr	Ile	Leu	Ser	Thr	Pro	Glu	Gly	Thr	Ser	Ala	Ala
				245					250					255	
Cys	Lys	Ser	Ile	Leu	Glu	Ile	Met	His	Lys	Glu	Ala	Gln	Asp	Ile	Lys
			260					265					270		
Phe	Thr	Glu	Glu	Ile	Pro	Leu	Lys	Ile	Leu	Ala	His	Asn	Asn	Phe	Val
		275					280					285			
Gly	Arg	Leu	Ile	Gly	Lys	Glu	Gly	Arg	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Gln
		290				295						300			
Asp	Thr	Asp	Thr	Lys	Ile	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Leu
305					310					315					320
Tyr	Asn	Pro	Glu	Arg	Thr	Ile	Thr	Val	Lys	Gly	Asn	Val	Glu	Thr	Cys
				325					330					335	
Ala	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	Ile	Met	Lys	Lys	Ile	Arg	Glu	Ser	Tyr	Glu
			340					345					350		
Asn	Asp	Ile	Ala	Ser	Met	Asn	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Ile	Pro	Gly	Leu
		355					360					365			
Asn	Leu	Asn	Ala	Leu	Gly	Leu	Phe	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Met	Pro	Pro
	370					375						380			

Pro Thr Ser Gly Pro Pro Ser Ala Met Thr Pro Pro Tyr Pro Gln Phe  
 385 390 395 400  
 Glu Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His Leu Phe Ile Pro Ala Leu Ser  
 405 410 415  
 Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly Gln His Ile Lys Gln Leu Ser  
 420 425 430  
 Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp  
 435 440 445  
 Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile Thr Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe  
 450 455 460  
 Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys Ile Lys Glu Glu Asn Phe Val  
 465 470 475  
 Ser Pro Lys Glu Glu Val Lys Leu Glu Ala His Ile Arg Val Pro Ser  
 485 490 495  
 Phe Ala Ala Gly Arg Val Ile Gly Lys Gly Gly Lys Thr Val Asn Glu  
 500 505 510  
 Leu Gln Asn Leu Ser Ser Ala Glu Val Val Val Pro Arg Asp Gln Thr  
 515 520 525  
 Pro Asp Glu Asn Asp Gln Val Val Val Lys Ile Thr Gly His Phe Tyr  
 530 535 540  
 Ala Cys Gln Val Ala Gln Arg Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val  
 545 550 555 560  
 Lys Gln His Gln Gln Gln Lys Ala Leu Gln Ser Gly Pro Pro Gln Ser  
 565 570 575

Arg Arg Lys

<210> 8

<211>

<212> prot

<213> L523S p13-21

<400> 8

Ala Ala Pro Ser Asp Leu Glu Ser Ile

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión, comprendiendo dicho vector un casete de expresión que comprende desde 5' a 3' los siguientes elementos: una secuencia promotora de citomegalovirus (CMV), una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia de intrón A del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia de ácido nucleico heterólogo y un sitio de poliadenilación, en el que el promotor está unido de forma operatible a la secuencia de ácido nucleico heterólogo, y en el que el casete de expresión comprende los nucleótidos 1-1653 de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno canceroso.
- 10 3. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el casete de expresión comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
4. El vector de expresión de la reivindicación 2, en el que el antígeno canceroso está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 6.
5. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 1.
- 15 6. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 3.
7. La célula huésped de la reivindicación 5, en la que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en E. coli y células de mamíferos.
8. La célula huésped de la reivindicación 6, en la que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en E. coli y células de mamíferos.
- 20 9. Una composición que comprende un vector de expresión como se expone en la reivindicación 1.
10. Un procedimiento para expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo, comprendiendo el procedimiento cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión, comprendiendo dicho vector un casete de expresión que comprende desde 5' a 3' los siguientes elementos: una secuencia promotora de CMV, una secuencia potenciadora de CMV, una secuencia de intrón A del gen temprano inmediato principal de CMV, una secuencia de ácido nucleico heterólogo y un sitio de poliadenilación, en el que el promotor está unido de forma operable a la secuencia de ácido nucleico heterólogo, y en el que el casete de expresión comprende los nucleótidos 1-1653 de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
- 25 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno canceroso.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el casete de expresión comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en E. coli y células de mamíferos.
- 35 14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el antígeno canceroso está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 6.
15. La composición según la reivindicación 9 para desencadenar una respuesta inmunitaria, en la que la respuesta inmunitaria está dirigida contra un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo.
16. La composición de la reivindicación 15, en la que la composición se administra múltiples veces.
- 40 17. El uso de una composición según la reivindicación 9 en la fabricación de un medicamento para desencadenar una respuesta inmunitaria dirigida contra un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo.
18. Un casete de expresión que comprende los nucleótidos 1-1653 de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
- 45 19. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que se ha insertado en un casete de expresión según la reivindicación 18, en el que un promotor del casete de expresión está unido de forma operable a la secuencia de ácido nucleico heterólogo.

20. Un procedimiento para producir un vector de expresión para la expresión de una secuencia de ácido nucleico heterólogo, que comprende insertar una secuencia de ADN que codifica un polipéptido en un vector de expresión recombinante que comprende los nucleótidos 1-1653 de la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3.
- 5 21. Un procedimiento según la reivindicación 20, en el que la secuencia de ADN codifica un antígeno canceroso.