

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 010**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07821082 .0**
96 Fecha de presentación: **09.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2076531**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **PROTEÍNA DE FUSIÓN DE TRANSCRIPTASA INVERSA DE LA TELOMERASA,
NUCLEÓTIDOS QUE LA CODIFICAN Y USOS DE LA MISMA.**

30 Prioridad:
12.10.2006 US 851183 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
**Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P.
Angeletti S.R.L.
Via Vitorchiano 151 CAP
00189 Roma (RM), IT**

72 Inventor/es:
**CILIBERTO, Gennaro;
LA MONICA, Nicola;
MENNUNI, Carmela y
SCARSELLI, Elisa**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 010 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

Proteína de fusión de transcriptasa inversa de la telomerasa, nucleótidos que la codifican y usos de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a la terapia del cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican proteínas de fusión, en la que las proteínas de fusión comprenden al menos una porción del polipéptido asociado a tumores transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT). La presente invención también proporciona vectores recombinantes y huéspedes que comprenden dichos polinucleótidos, proteínas de fusión purificadas y procedimientos para generar o aumentar una respuesta inmune contra el producto proteico del gen de TERT, usando las composiciones y moléculas desveladas en el presente documento.

Antecedentes de la invención

La vacunación se ha convertido en un procedimiento convencional para la prevención de numerosas enfermedades infecciosas. La aplicación de vacunas a otras enfermedades, tales como cáncer, es ahora una posibilidad atractiva debido a los avances en la ingeniería molecular y a una mejor comprensión de la inmunología tumoral.

15 El cáncer es una de las causas principales de mortalidad en todo el mundo. A pesar de la abundancia de investigaciones relacionadas con el cáncer, las terapias convencionales que combinan cirugía, radiación y quimioterapia con frecuencia fracasan en el tratamiento eficaz de cánceres establecidos. Continúan sin estar disponibles también procedimientos fiables de prevención.

20 El cáncer implica normalmente el mal funcionamiento de genes que contribuyen a la regulación del ciclo celular o a la proliferación celular, tales como factores de crecimiento y sus receptores, oncogenes y genes supresores de tumores. Los productos de muchos de estos genes se expresan en la superficie de una amplia diversidad de células tumorales y, por lo tanto, se denominan antígenos asociados o tumores (TAA). Se ha demostrado que la introducción de genes que codifican TAA directamente en un sujeto genera una respuesta inmune protectora frente a los TAA en muchos modelos experimentales, haciendo de estas moléculas una diana para la terapia vacunal. Sin embargo, debido a que muchos de estos productos génicos también se expresan en células normales, aunque a menores niveles, muchas terapias inmunológicas que se dirigen a TAA han demostrado ser ineficaces debido a la autotolerancia.

Los genes que codifican varios antígenos asociados a tumores (TAA) se han aislado, caracterizado e insertado en vectores genéticos tales como ADN plasmídico y vectores víricos. Un antígeno asociado a tumor que se ha implicado en la patogénesis del cáncer es la telomerasa (TERT).

30 La telomerasa es una ADN polimerasa que funciona normalmente en el mantenimiento de la longitud del telómero en los extremos de los cromosomas. Durante el crecimiento celular normal, un cebador de ARN se une al extremo 5' del ADN e inicia la replicación. Tras la eliminación del cebador de ARN, se introduce un hueco de longitud en la cadena de ADN hija resultante. Por lo tanto, la replicación de una cadena lineal de ADN con polimerasas convencionales conduce a un acortamiento de la longitud del telómero en cada ronda progresiva de replicación. Dicho acortamiento de la longitud del telómero es responsable de la senescencia celular o del envejecimiento de las células somáticas humanas normales.

40 La telomerasa es una ribonucleoproteína que comprende un componente de ARN y un componente proteico catalítico (transcriptasa inversa de la telomerasa). El componente catalítico de la telomerasa humana lo describieron Meyerson y col. (Cell 1197: 785-95 (1990) y Nakamura y col. (Science 277: 955-59 (1997)). La enzima TERT usa su componente de ARN como molde para la síntesis de ADN de telómero, permitiendo de este modo que los telómeros mantengan su longitud a lo largo de generaciones sucesivas de crecimiento celular. Dicho mantenimiento de la longitud del telómero a lo largo de numerosos ciclos proliferativos permite que una célula escape a la senescencia normal y se vuelva inmortal, permitiendo que un tumor crezca y metastatice a lo largo de grandes periodos de tiempo. Debido a que la telomerasa confiere inmortalidad replicativa a las células, se ha detectado actividad telomerasa en líneas de células cancerosas y en una variedad diversa de tipos tumorales (Kim y col. Science 266: 2011-15 (1994)). Por el contrario, la telomerasa es inactiva o solamente se expresa de forma transitoria a bajos niveles en tejidos humanos normales y cultivos de células somáticas normales. La combinación de la sobreexpresión de telomerasa en la mayoría de tipos de cáncer, así como la baja expresión o la ausencia de expresión en células normales, hace de TERT una diana para la terapia y/o profilaxis de enfermedades asociadas con una proliferación celular aberrante tales como cáncer.

55 El desarrollo de una vacuna específica de telomerasa es ahora posible debido a que los componentes catalíticos y de ARN de la telomerasa se han clonado y caracterizado (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.166.178). Sin embargo, el desarrollo y la comercialización de muchas vacunas se han visto obstaculizados por las dificultades asociadas con la obtención de altos niveles de expresión del inmunógeno deseado en organismos huésped transformados con éxito. El desarrollo de vacunas basadas en ADN eficaces también se ha visto obstaculizado por la incapacidad para generar una respuesta inmune de una magnitud suficiente en individuos tratados para conducir a la regresión tumoral en un entorno clínico. Por lo tanto, a pesar de la identificación de las

secuencias de nucleótidos de tipo silvestre que codifican las proteínas telomerasa descritas anteriormente, sería altamente deseable desarrollar una vacuna que sea capaz de generar una respuesta inmune específica de TERT aumentada respecto a un ADNc de TERT de longitud completa de tipo silvestre, cuando se administre a un mamífero. También sería deseable desarrollar procedimientos para tratar o prevenir cánceres asociados a TERT que utilicen moléculas de ácido nucleico o proteínas que potencien eficazmente y con seguridad una respuesta inmune específica de TERT.

Sumario de la invención

Como se ha indicado anteriormente, la expresión del gen del antígeno asociado a tumor transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) está comúnmente asociada con el desarrollo o la presencia de adenocarcinomas, incluyendo carcinomas colorrectales. Con este fin, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para generar o aumentar la inmunidad contra los productos proteicos expresados por el gen de TERT humano (hTERT). En concreto, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican la variante de proteínas de fusión, en la que las proteínas de fusión comprenden la proteína hTERT fusionada a una porción sustancial de la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) expuesta en la SEC ID N°: 6. La presente invención también proporciona vectores recombinantes, incluyendo, pero sin limitación, vectores plasmídicos y adenovirus, que comprenden dichos polinucleótidos, y células huésped que comprenden dichos vectores recombinantes. También se proporcionan en el presente documento proteínas de fusión purificadas codificadas por polinucleótidos de la invención. Las proteínas de fusión de hTERT-LTB y polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión son útiles como vacunas para la prevención y/o tratamiento del cáncer asociado a la telomerasa. Dichas vacunas son útiles como monoterapia o como parte de un régimen terapéutico, comprendiendo dicho régimen la administración de una segunda vacuna, tal como una vacuna de polinucleótido, basada en células, de proteína o basada en péptido, o comprendiendo radioterapia o quimioterapia.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica hTERT y/o la secuencia de nucleótidos que codifica LTB comprende codones que se han optimizado para altos niveles de expresión en una célula huésped humana. En otras palabras, en ciertas realizaciones de la invención, el patrón de uso de codones de la secuencia polinucleotídica se parece al de genes mamíferos y/o seres humanos altamente expresados.

Otro aspecto de la presente invención es una construcción de expresión que comprende nucleótidos que codifican la proteína hTERT-LTB variante expuesta en la SEC ID N°: 6. En realizaciones preferidas de esta parte de la invención, la construcción comprende una secuencia líder TPA antes de la secuencia codificante para el gen de TERT para asegurar que la proteína de fusión de TERT-LTB se secreta.

En la presente invención, la actividad catalítica de la telomerasa del antígeno de telomerasa está inactivada, de modo que la proteína de fusión de TERT codificada es más segura que la TERT de tipo silvestre para fines vacunales. La actividad enzimática de la proteína de fusión de TERT puede inactivarse por adición de mutaciones/deleciones a la secuencia de nucleótidos codificante de TERT. En la invención, se han mutado nucleótidos para cambiar aminoácidos específicos D712A y V713I en la secuencia proteica de TERT humana.

La presente invención proporciona además vectores plasmídicos y adenovíricos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de hTERT-LTB variante expuesta en la SEC ID N°: 6. La presente invención también describe el uso de los vectores plasmídicos y de adenovirus en composiciones inmunogénicas y vacunas para la prevención y/o tratamiento del cáncer asociado a hTERT. En realizaciones preferidas de esta parte de la invención, el vector de adenovirus es un vector Ad6. En otras realizaciones preferidas, el vector Ad es un vector Ad5.

También se describen procedimientos para prevenir el desarrollo de un cáncer en un paciente o tratar a un paciente con un tumor asociado a telomerasa generando una respuesta inmune contra la proteína TERT por administración de una vacuna o composición farmacéutica que comprende las fusiones de TERT o proteínas de fusión de TERT proporcionadas por la invención. Preferentemente, la respuesta inmune se aumenta respecto a la respuesta generada por una TERT de tipo silvestre.

Como se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el", "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto imponga claramente otra cosa.

Como se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, son aplicables las siguientes definiciones y abreviaturas:

El término "promotor" se refiere a un sitio de reconocimiento en una cadena de ADN al que se une la ARN polimerasa. El promotor forma un complejo de inicio con la ARN polimerasa para iniciar y dirigir la actividad transcripcional. El complejo puede modificarse por secuencias activantes denominadas "potenciadores" o secuencias inhibitoras denominadas "silenciadores".

El término "casete" se refiere a una secuencia génica o de nucleótidos que se va a expresar a partir de un vector, por ejemplo, la secuencia génica o de nucleótidos que codifica la fusión de hTERT(AI)-LTB. En general, un casete

- comprende una secuencia génica que puede insertarse en un vector, que en algunas realizaciones proporciona secuencias reguladoras para expresar la secuencia génica o de nucleótidos. En otras realizaciones, la secuencia génica o de nucleótidos proporciona las secuencias reguladoras para su expresión. En realizaciones adicionales, el vector proporciona algunas secuencias reguladoras y la secuencia génica o de nucleótidos proporciona otras secuencias reguladoras. Por ejemplo, el vector puede proporcionar un promotor para transcribir la secuencia génica o de nucleótidos, y la secuencia génica o de nucleótidos proporciona una secuencia de terminación de la transcripción. Las secuencias reguladoras que pueden proporcionarse por el vector incluyen, pero sin limitación, potenciadores, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias aceptoras y donadoras de corte y empalme, intrones, secuencias de unión al ribosoma y secuencias de adición de poli(A).
- 5 El término "vector" se refiere a algunos medios por los que pueden introducirse fragmentos de ADN en un organismo huésped o tejido huésped. Existen diversos tipos de vectores incluyendo plásmidos, virus (incluyendo adenovirus), bacteriófagos y cósmidos.
- La expresión "primera generación", como se usa en referencia a vectores adenovíricos, describe vectores adenovíricos que presentan una replicación defectuosa. Los vectores adenovíricos de primera generación tienen normalmente una región génica E1 delecionada o inactivada y, preferentemente, tienen una región génica E3 delecionada o inactivada.
- 15 La denominación "pV1JnsA/TPA-mTERT(AI)-LTBopt" se refiere a una construcción plasmídica desvelada en el presente documento, que comprende el promotor inmediato temprano (IE) de CMV con el intrón A, un gen de TERT murina de longitud completa y codones optimizados fusionado a un gen de LTB de codones optimizados, y secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación derivadas de la hormona de crecimiento bovina (véase el EJEMPLO 2). Además, una secuencia líder que codifica la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano está presente 5' a la secuencia de nucleótidos que codifica mTERT-LTB. La denominación "AI" indica que se añadieron mutaciones a la secuencia de TERT para eliminar funcionalmente la actividad catalítica de la telomerasa. La denominación "pV1JnsA/ mTERT(AI)opt" se refiere a una construcción esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto por que la construcción comprende una secuencia de nucleótidos de TERT optimizada murina que no se fusionó a LTB o TPA.
- 20 La denominación "pV1JnsA/TPA-hTERT(AI)-LTBopt" se refiere a una construcción plasmídica desvelada en el presente documento, que comprende el promotor inmediato temprano (IE) de CMV con el intrón A, un gen de TERT humana de longitud completa y codones optimizados fusionado a un gen de LTB de codones optimizados, y secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación derivadas de la hormona de crecimiento bovina (véase el EJEMPLO 2). Además, una secuencia líder que codifica la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano está presente 5' a la secuencia de nucleótidos que codifica hTERT-LTB. La secuencia de hTERT en esta construcción comprende mutaciones para eliminar funcionalmente la actividad catalítica de la telomerasa.
- 30 Las denominaciones "Ad6/TPAmTERT(AI)-LTBopt" y "Ad6/hTERT(AI)" se refieren a dos construcciones desveladas en el presente documento, que comprenden un genoma adenovírico Ad6 con deleción de las regiones E1 y E3. En la construcción "Ad6/TPAmTERT(AI)-LTBopt", la región E1 se sustituye por un gen de TERT murina-LTB de codones optimizados en una orientación paralela a E1 bajo el control de un promotor de CMV humano sin el intrón A, seguido por una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La secuencia codificante de TERT comprende mutaciones para eliminar la actividad catalítica de la telomerasa. La construcción comprende además secuencias que codifican la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano 5' a la secuencia de nucleótidos codificante de TERT(AI)-LTB. La construcción "Ad6/hTERT(AI)" es esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto por que la región E1 del genoma de Ad6 se sustituye con una secuencia de ADNC de TERT, comprendiendo dicha secuencia mutaciones para suprimir la actividad enzimática.
- 35 La abreviatura "LTB" se refiere en general a la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli*, o a una porción substancial de la misma, incluyendo subunidades que están truncadas en el extremo C-terminal o N-terminal pero que mantienen actividad adyuvante, así como subunidades que contienen inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos internos pero que mantienen actividad adyuvante (Fingerut y col. Vaccine 23: 4685-4696 (2005)).
- 50 Como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene al menos dos polipéptidos heterólogos unidos covalentemente, en la que un polipéptido viene de una secuencia proteica o dominio y el otro polipéptido viene de una segunda secuencia proteica o dominio. Las proteínas de fusión de la presente invención comprenden una variante polipeptídica de TERT de las mismas y un segundo polipéptido, que comprende una porción sustancial de LTB. El extremo C-terminal del polipéptido de TERT se fusiona al extremo N-terminal de LTB como se ejemplifica en las FIGURAS 1 y 2.
- 55 Las expresiones "proteína de fusión de TERT" o "proteína de fusión de TERT-LTB" se usan indistintamente en el presente documento como una expresión general que se refiere a una fusión como se ha descrito anteriormente, que comprende una variante polipeptídica de TERT de la misma fusionada a un polipéptido LTB. Las fusiones de TERT-LTB de la presente invención, tras su administración a un mamífero tal como un ser humano, pueden estimular una respuesta inmune mediante linfocitos T auxiliares o linfocitos T citotóxicos, al menos tan bien como

una secuencia de hTERT de "tipo silvestre". En realizaciones preferidas de la invención, la fusión de TERT-LTB puede aumentar la respuesta inmune en comparación con una hTERT de tipo silvestre.

5 El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno, así como los propensos a presentar el trastorno o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" también incluye la reducción de la probabilidad de obtener el trastorno, así como la reducción de la gravedad del trastorno en los ya afectados.

10 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con las moléculas de la presente invención, incluyendo las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento y las proteínas de fusión que están codificadas por dichas moléculas de ácido nucleico. Se incluyen en el término "trastorno" trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Las moléculas de la presente invención pretenden usarse como tratamientos para trastornos o afecciones caracterizadas por una proliferación celular aberrante, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer pulmonar.

15 La expresión "cantidad eficaz" significa que se introduce una composición de vacuna suficiente para producir los niveles adecuados del polipéptido, de modo que se obtiene como resultado una respuesta inmune. Un experto en la materia reconoce que este nivel puede variar.

20 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido químicamente similar. Son ejemplos de dichas sustituciones conservativas: la sustitución de un resto hidrófobo (isoleucina, leucina, valina o metionina) por otro, la sustitución de un resto polar por otro resto polar de la misma carga (por ejemplo, arginina en lugar de lisina: ácido glutámico en lugar de ácido aspártico).

25 El término "hTERT" se refiere a un antígeno de transcriptasa inversa de la telomerasa humana o a nucleótidos que codifican el antígeno de transcriptasa inversa de la telomerasa humana. El término "hTERTopt" se refiere a una secuencia de nucleótidos de codones optimizados que codifica el antígeno de transcriptasa inversa de la telomerasa humana.

Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de TERT humana de tipo silvestre se exponen en las SEC ID N°:11 y 12, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de LTB se exponen en las SEC ID N°:13 (secuencia opt) y 14.

30 Un "gen" se refiere a una molécula de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos codifica una molécula polipeptídica. Los genes pueden ser secuencias ininterrumpidas de nucleótidos o pueden incluir segmentos intermedios tales como intrones, regiones promotoras, sitios de corte y empalme y secuencias repetitivas. Un gen puede ser ARN o ADN.

La expresión "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" está destinada a ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), sondas, oligonucleótidos, fragmentos o porciones de los mismos, y cebadores.

35 Las expresiones "TERT de tipo silvestre" o "proteína de tipo silvestre" o "proteína wt" se refieren a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de origen natural o una variante de la misma. La secuencia de aminoácidos de TERT humana de tipo silvestre se expone en la SEC ID N°: 12. La secuencia de aminoácidos de la TERT humana de tipo silvestre se ha descrito previamente (Patente de Estados Unidos N° 6.166.178; Patente de Estados Unidos 6.261.836; Patente de Estados Unidos N° 6.927.285; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003-0096344; Meyerson y col., Cell 90: 785-95 (1997); Nakamura y col., Science 277: 955-59 (1997)).

40 La expresión "gen de TERT de tipo silvestre" se refiere a un gen que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína TERT de origen natural, incluyendo proteínas de origen humano o proteínas obtenidas de otro organismo, incluyendo, pero sin limitación, otros mamíferos tales como ratas, ratón y mono rhesus. La secuencia de nucleótidos del gen de TERT humana esta disponible en la técnica (anteriormente).

45 La denominación "TERT(AI)" se refiere a una secuencia de transcriptasa inversa de la telomerasa que comprende mutaciones para eliminar o reducir la actividad catalítica de la telomerasa.

El término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo un ser humano.

La abreviatura "Ag" se refiere a un antígeno.

La abreviatura "ORF" se refiere a la fase de lectura abierta de un gen.

50 **Breve descripción de los dibujos**

La FIGURA 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 1) y de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de una fusión de TPA-hTERT(AI)-LTBopt ejemplar.

La FIGURA 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 3) y de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de una

fusión de TPA-mTERT(AI)-LTBopt ejemplar.

La FIGURA 3 muestra los resultados de un ensayo ELIspot de $IFN\gamma$ en ratones BALB/c vacunados con inyecciones repetidas de plásmido pVIJ/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. Se usaron 5 ratones de cada grupo para controlar la repuesta inmune dirigida contra mTERT o LTB usando combinaciones de péptidos. Los datos representados son de 6 ratones individuales (círculos en blanco). Se indican los valores medios geométricos (círculos oscuros). No se detectó respuesta de linfocitos T contra mTERT en ratones con tratamiento simulado (no se muestra). Véase el EJEMPLO 7.

La FIGURA 4 muestra los resultados de la tinción intracelular de $IFN\gamma$ en esplenocitos de ratones BALB/c vacunados. Se midieron las respuestas de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ contra TERT de ratón usando combinaciones de péptidos solapantes que abarcan la proteína completa. También se controló la respuesta inmune contra LTB. Los datos representados son de 6 ratones individuales (triángulos oscuros). Se indican los valores medios geométricos (línea recta). No se detectaron respuestas de linfocitos T contra TERT en ratones con tratamiento simulado (no se muestra). Véase el EJEMPLO 7.

La FIGURA 5 muestra los resultados de destrucción de CTL por liberación de ^{51}Cr mediante linfocitos T efectoros de células diana 4T1 estimuladas con péptido específico de linfocitos T $CD8^+$ mTERTaa167 (AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20). Se prepararon células efectoras a partir de esplenocitos de dos ratones BALB/c inmunizados y se reestimularon *in vitro* con el péptido específico. Los resultados se expresan como porcentaje de destrucción específica a diferentes proporciones de Efectores/Diana. Véase el EJEMPLO 8.

La FIGURA 6 muestra la inducción de una respuesta inmune contra TERT de ratón. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 5 inyecciones semanales de plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. La respuesta inmune se evaluó en esplenocitos de ratón por ensayo ELIspot de $IFN\gamma$ usando combinaciones de péptidos de TERT de ratón. Las respuestas de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ específicos de antígeno se muestran como valores medios geométricos obtenidos de 6 ratones inmunizados, también se indica la desviación típica. Véase el EJEMPLO 7.

La FIGURA 7 muestra la inducción de una respuesta inmune específica de mTERT en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron con 5 inyecciones semanales de las construcciones pV1J-mTERT(AI)opt o pV1J-TPAmTERT(AI)-LTBopt. Se determinaron las respuestas inmunes por tinción intracelular de $IFN\gamma$ en PBMC usando el epítipo $CD8^+$ correspondiente a la secuencia peptídica mTERTaa167 (AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20). Los datos representados son de 8 ratones individuales (triángulos oscuros). Se indican los valores medios geométricos (líneas rectas).

La FIGURA 8 muestra que la respuesta inmune específica de TERT se aumenta tras la inyección de vectores de adenovirus que expresan mTERT(AI)-LTBopt. Se sometieron grupos de 10 ratones BALB/c a 5 inyecciones semanales de pVIJ/TPA-mTERT(AI)-LT-Bopt (50 μ g/iny.). Dos semanas después de la última inyección de ADN plasmídico, los ratones se reforzaron con una inyección adicional de ADN plasmídico (ADN-EP) o con 10^{10} pv de Ad6/TPA-mTERT(AI)-LTBopt (Ad). Se controlaron las respuestas inmunes contra TERT por ICS de $IFN\gamma$ en PBMC. Los datos representados son de 10 ratones individuales (rombos oscuros). También se muestran los valores medios geométricos de cada grupo (líneas rectas). Véase el EJEMPLO 10.

La FIGURA 9 representa el protocolo usado para analizar la carcinogénesis inducida por DMH y la vacunación en ratones BALB/c. Se administró DMH i.p. semanalmente. La vacunación con pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt se llevó a cabo a los puntos temporales indicados. El análisis de las lesiones intestinales se llevó a cabo la semana 12. Véase el EJEMPLO 11.

La FIGURA 10 muestra el efecto antitumoral de pVIJ/TPA-mTERT(AI)-LTBopt sobre la carcinogénesis inducida por DMH. Se trataron ratones BALB/c con DMH y ADN-EP como se indica en la FIGURA 9. El análisis de ACF y de la formación de adenoma en el colon se llevó a cabo la semana 12 desde el comienzo del tratamiento. El número de ACF y de adenomas en ratones vacunados se comparó con el detectado en controles no vacunados. Véase el EJEMPLO 11.

La FIGURA 11 representa el protocolo usado para analizar la carcinogénesis inducida por DMH y la vacunación en ratones BALB/c. Se administró DMH i.p. semanalmente. La vacunación con ADN de pV1J/TPA-mTERT-LTB y Ad se llevó a cabo a los puntos temporales indicados. El análisis de las lesiones intestinales se llevó a cabo la semana 30. Véase el EJEMPLO 11.

La FIGURA 12 demuestra el efecto antitumoral de la sensibilización con ADN de pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt/refuerzo con Ad son el número de lesiones tumorales. Se trataron ratones BALB/c con DMH y ADN-EP según se indica en la FIGURA 9. El análisis de ACF y de la formación de adenomas en el colon se llevó a cabo la semana 30 desde el comienzo del tratamiento. El número de ACF y adenomas en ratones vacunados se comparó con el detectado en controles no vacunados. Véase el EJEMPLO 11.

La FIGURA 13 demuestra el efecto antitumoral de la sensibilización con ADN de pV1J/TPA-mTERT-LTB(AI)opt/refuerzo con Ad sobre el volumen y la fase de diferenciación de las lesiones tumorales. Se trataron ratones BALB/c con DMH y ADN-EP según se indica. El volumen (Panel A) y la fase de diferenciación histológica (Panel B) de los adenomas de colon presentes en ratones vacunados y de control se analizaron a las 30 semanas desde el comienzo del tratamiento. Los tumores se clasificaron de la forma siguiente: G1: adenocarcinoma bien diferenciado; G2: adenocarcinoma moderadamente diferenciado; G3: adenocarcinoma escasamente diferenciado). Véase el EJEMPLO 11.

La FIGURA 14 muestra la inducción de una respuesta inmune contra TERT humana. Se inmunizaron ratones transgénicos HHD con dos inyecciones bisemanales (ADN-ADN) de plásmido pV1J/TPA-hTERT(AI)-LTBopt o mediante una inyección de plásmido pV1J/TPA-hTERT(AI)-LTBopt seguida, después de dos semanas, por una inyección de Ad6hTERT(AI) 10^{10} pp (ADN/Ad). La respuesta inmune se evaluó en PBMC de ratón mediante

ensayo de ICS de IFN γ . Se incubaron PBMC de ratón con el péptido inmunodominante CD8 para el alelo HLA-A2 hTERT865 (SEC ID N $^{\circ}$: 22). Los datos representados son de 10 ratones individuales (triángulos oscuros). Se indican los valores medios geométricos (línea recta). Véanse los EJEMPLOS 12 y 13.

La FIGURA 15 muestra los resultados de un ensayo de CTL sobre células HeLa-HHD diana marcadas con Cr 51 . Se ensayaron linfocitos T CD8 $^{+}$ obtenidos de un ratón inmunizado en un ensayo de CTL frente a células HeLa-HHD, cargadas exógenamente con el péptido hTERT865 o sin péptido pero en presencia del DMSO usado para la dilución de péptido. Las células HeLa-HHD se infectaron también con un vector Ad que codifica hTERT o un Ad que codifica GFP como control. Véase el EJEMPLO 14.

La FIGURA 16 muestra la inducción de una respuesta inmune mediada por células contra hTERT en monos rhesus inmunizados mediante ADN-EP. Se realizó un análisis ELISpot sobre PBMC de monos rhesus inmunizados con hTERT (pVIJ/TPA-hTERT-LTB; ADN-EP/ADN-EP). El ensayo se realizó por duplicado y se muestra el valor promedio de las repeticiones. Se muestra el análisis realizado después del segundo ADN-EP (Panel A). También se muestra el análisis realizado después del quinto ADN-EP (Panel B). Véase el EJEMPLO 15.

La FIGURA 17 muestra que la respuesta inmune mediada por células contra hTERT se amplificaba en monos rhesus que estaban vacunados con ADN-EP y reforzados con adenovirus que expresaba hTERT, en comparación con la CMI generada en monos vacunados mediante ADN-EP solamente. Se realizó un ELISpot sobre PBMC de monos rhesus inmunizados con hTERT al final del programa de inmunización, que incluía cinco inyecciones de ADN-EP (pV1J/TPA-hTERT-LTB) seguidas de dos inyecciones de Ad (Ad6-hTERT). El ensayo se realizó por duplicado y se muestra el valor promedio de las repeticiones. Véase el EJEMPLO 15.

Descripción detallada de la invención

La expresión del componente catalítico de la telomerasa, conocido como transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT), se detecta comúnmente en una variedad diversa de tipos tumorales. La combinación de la sobreexpresión de la telomerasa en la mayoría de tipos de cáncer, así como la baja expresión o la ausencia de expresión en células normales hace de TERT una diana para la terapia y/o profilaxis de enfermedades asociadas con una proliferación celular aberrante tal como cáncer. Con este fin, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para generar o aumentar inmunidad contra el producto proteico expresado por el antígeno asociado a tumor TERT, en la que la expresión aberrante de TERT está asociada con el carcinoma o su desarrollo. La asociación de la expresión aberrante de TERT con un carcinoma no requiere que se exprese la proteína TERT en tejido tumoral en todos los puntos temporales de su desarrollo, ya que la expresión anormal de TERT puede estar presente al inicio del tumor y no ser detectable posteriormente en la progresión del tumor o viceversa.

Por consiguiente, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican una variante de proteína TERT fusionada a una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB), como se expone en la SEC ID N $^{\circ}$: 6, que es capaz de servir eficazmente como adyuvante de una respuesta inmune contra el antígeno de TERT asociado.

En algunas realizaciones de la invención, la secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento comprenden además una secuencia líder TPA antes de la secuencia codificante para el gen de TERT para asegurar que la proteína de fusión de TERT-LTB se secreta. En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la fusión de TPA-hTERT(AI)-LTB codifica una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N $^{\circ}$: 2. Se expone una secuencia de nucleótidos preferida en la SEC ID N $^{\circ}$: 1.

La secuencia de nucleótidos de TERT humana de tipo silvestre se expone en la SEC ID N $^{\circ}$: 12 y se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 6.166.178; Patente de Estados Unidos 6.261.836; Patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 6.927.285; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003-0096344; Meyerson y col., Cell 90: 785-95 (1997); Nakamura y col., Science 277: 955-59 (1997)). La variante de TERT de la presente invención comprende mutaciones que eliminan funcionalmente actividad catalítica de la telomerasa. Las proteínas de fusión de TERT codificadas de la presente invención son capaces de inducir una respuesta inmune mediada por células cuando se introducen en un destinatario de vacuna o paciente que lo necesite.

Como se ha indicado anteriormente, en realizaciones preferidas de la presente invención, la actividad catalítica de la telomerasa del antígeno de telomerasa se inactiva (en lo sucesivo denominado "TERT(AI)"), de modo que la proteína de fusión de TERT codificada es más segura que la TERT de tipo silvestre para fines vacunales. La actividad enzimática de la proteína de fusión de TERT puede inactivarse por adición de mutaciones/delecciones a la secuencia de nucleótidos codificante de TERT. Por lo tanto, la presente invención incluye moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión de TERT-LTB, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína hTERT variante, en la que dicha variante comprende una o más mutaciones respecto a la secuencia de aminoácidos de hTERT de tipo silvestre, como se expone en la SEC ID N $^{\circ}$: 12, y en la que dichas mutaciones funcionan eliminando la actividad catalítica de la telomerasa de la proteína hTERT codificada. En realizaciones ejemplares específicas de la invención, se han mutado nucleótidos para cambiar los aminoácidos específicos D712A y V713I en la secuencia proteica de TERT humana (como se expone en la SEC ID N $^{\circ}$: 10). Se desvela una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de TERT humana mutada expuesta en la SEC ID N $^{\circ}$: 10 en la SEC ID N $^{\circ}$: 9.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a polinucleótidos sintéticos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de TERT-LTB, comprendiendo dicha proteína de fusión una forma mutante de una proteína TERT fusionada a una proteína LTB que puede aumentar eficazmente la respuesta inmune contra la proteína TERT. Dichas formas mutantes de la proteína TERT incluyen, pero sin limitación: sustituciones de aminoácidos conservativas, truncamientos amino-terminales, truncamientos carboxi-terminales, deleciones o adiciones. Cualquiera de dichas variantes de TERT codificará una proteína que imite al menos sustancialmente las propiedades inmunológicas de la proteína TERT como se expone en la SEC ID N°: 12. Las variantes de TERT preferidas son catalíticamente inactivas, por ejemplo, la variante de TERT expuesta en la SEC ID N°: 10.

Los polinucleótidos sintéticos de la presente invención codifican moléculas de ARNm que expresan una proteína de fusión de TERT(AI)-LTB que es capaz de estimular o aumentar la respuesta inmune contra la proteína TERT asociada, de modo que sean útiles en el desarrollo de una vacuna terapéutica o profiláctica contra el cáncer. Se ha demostrado que la porción LTB de las fusiones de TERT-LTB de la presente invención potencian fuertemente la inmunogenicidad de los antígenos coadministrados (véase, por ejemplo, Simmons y col. Scand. J. Immunol. 53: 218-26 (2001)).

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico sintética (polinucleótido) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ARNm que expresa una nueva proteína de fusión de TERT-LTB; es decir, secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de fusión como se exponen en la SEC ID N°: 6. Una fusión de TERT particularmente preferida de la presente invención es la secuencia de fusión de hTERT(AI)-LTB expuesta en la SEC ID N°: 5. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención están sustancialmente libres de otros ácidos nucleicos.

La presente invención también se refiere a vectores recombinantes y células huésped recombinantes, tanto procariontas como eucariotas, que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las moléculas de ADN sintéticas, vectores asociados y huéspedes de la presente invención son útiles para el desarrollo de una vacuna contra el cáncer.

Moléculas de ácido nucleico ejemplares de la presente invención comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 5, como se muestra en la FIGURA 1, que codifica proteínas de fusión de hTERT-LTB y mTERT-LTB ejemplares de la presente invención.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere además a vectores recombinantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención. Estos vectores pueden estar compuestos por ADN o ARN. Para la mayoría de fines de clonación, se prefieren vectores de ADN. Los vectores típicos incluyen plásmidos, virus modificados, baculovirus, bacteriófagos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras y otras formas de ADN episomal o integrado que pueden codificar una proteína de fusión de TERT-LTB. Está bien dentro del ámbito del experto en la materia determinar un vector apropiado para una transferencia de genes particular u otro uso.

También se proporcionan por la presente invención proteínas de fusión de TERT-LTB purificadas codificadas por los ácidos nucleicos desvelados a lo largo de la presente memoria descriptiva, especialmente proteínas de fusión de TERT(AI)-LTB. La proteína de fusión de TERT-LTB comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6.

Un vector de expresión que contiene una molécula de ácido nucleico codificante de proteína de fusión de TERT-LTB puede usarse para una expresión de alto nivel de proteína de fusión de TERT-LTB en una célula huésped recombinante. Los vectores de expresión pueden incluir, pero sin limitación, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmidos diseñados específicamente o virus. Además, si se desea pueden usarse una diversidad de vectores de expresión bacterianos para expresar secuencias de fusión de TERT-LTB recombinantes en células bacterianas. Además, pueden usarse una diversidad de vectores de expresión de células fúngicas para expresar secuencias de fusión de TERT-LTB recombinantes en células fúngicas. Además, pueden usarse una diversidad de vectores de expresión de células de insecto para expresar proteína recombinante en células de insecto.

La presente invención también se refiere a células huésped transformadas o transfectadas con vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Las células huésped recombinantes pueden ser procariontas o eucariotas, incluyendo, pero sin limitación, bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levaduras, células de mamífero incluyendo, pero sin limitación, líneas celulares de origen bovino, porcino, mono y roedor; y células de insecto incluyendo, pero sin limitación, líneas celulares derivadas de *Drosophilla* y gusano de seda. Dichas células huésped recombinantes pueden cultivarse en condiciones adecuadas para producir una proteína de fusión de TERT-LTB o una forma biológicamente equivalente. En una realización preferida de la presente invención, la célula huésped es humana. Como se define en el presente documento, la expresión "célula huésped" no pretende incluir una célula huésped en el cuerpo de un ser humano transgénico, feto humano o embrión humano.

Como se ha señalado anteriormente, un vector de expresión que contiene ADN que codifica una proteína de fusión de TERT-LTB puede usarse para la expresión de una proteína de fusión de TERT en una célula huésped recombinante. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para expresar una proteína de

fusión de TERT-LTB en una célula huésped recombinante, que comprende: (a) introducir un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de TERT-LTB en una célula huésped humana adecuada, en el que la proteína de fusión de TERT-LTB comprende una proteína TERT o variante inactiva de la misma fusionada a una porción sustancial de la proteína LTB, y en el que la proteína de fusión es capaz de producir una respuesta inmune en un mamífero; y (b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína de fusión de TERT-LTB.

En realizaciones preferidas del procedimiento para expresar una proteína de fusión de TERT-LTB descrito anteriormente, se deleciona la secuencia señal de la secuencia de LTB.

Después de la expresión de una fusión de TERT-LTB en una célula huésped, la proteína de fusión de TERT-LTB puede recuperarse para proporcionar una proteína de fusión de TERT-LTB purificada. Están disponibles varios procedimientos de purificación de proteínas y son adecuados para su uso. La proteína recombinante puede purificarse a partir de lisados y extractos celulares por diversas combinaciones de, o la aplicación individual de fraccionamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de adsorción de hidroxilapatita y cromatografía de interacción hidrófoba. Además, la proteína de fusión de TERT-LTB recombinante puede separarse de otras proteínas celulares mediante el uso de una columna de inmunoadfinidad generada con anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para una proteína TERT, o fragmentos polipeptídicos de una proteína TERT.

Las moléculas de ácido nucleico que comprenden fusiones de TERT-LTB y las proteínas de fusión codificadas de la presente invención estaban diseñadas para aumentar la respuesta inmune específica de TERT respecto al ADNc de tipo silvestre de longitud completa que codifica TERT, para su uso en el desarrollo de vacunas. Para aumentar adicionalmente las propiedades inmunogénicas de las secuencias de fusión de TERT-LTB de la presente invención, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, los polinucleótidos que codifican proteínas de fusión de TERT-LTB comprenden codones optimizados para una expresión de más alto nivel en una célula huésped, como se describe a continuación. En estas realizaciones, al menos una porción de los codones de las fusiones de TERT-LTB se diseñan de modo que se usen los codones preferidos por la célula huésped prevista, que en realizaciones preferidas es una célula humana. Las fusiones de TERT-LTB optimizadas pueden usarse para el desarrollo de vacunas de ADN basadas en plásmidos o adenovirus recombinantes, que proporcionan una inmunoprolifaxis eficaz frente al cáncer asociado a TERT a través de una inmunidad mediada por células. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una composición inmunogénica. La presente invención proporciona polinucleótidos de fusión de TERT-LTB de codones optimizados que, cuando se introducen directamente en un vertebrado *in vivo*, incluyendo mamíferos tales como primates y seres humanos, inducen la expresión de proteínas codificadas dentro del animal.

Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas sintéticas comprenden una secuencia de nucleótidos, en las que algunos de los nucleótidos se han alterado de modo que se usen los codones preferidos por una célula humana, permitiendo de este modo un alto nivel de expresión de proteína de fusión en una célula huésped humana. Las moléculas sintéticas pueden usarse como una fuente de una proteína de fusión de TERT-LTB, que puede usarse en una vacuna contra el cáncer para proporcionar una inmunoprolifaxis eficaz frente a carcinomas asociados a TERT a través de una inmunidad mediada por células. Las moléculas de ácido nucleico desveladas en el presente documento también puede servir como base para una vacuna contra el cáncer basada en ADN.

Un codón de "tripleto" de cuatro bases de nucleótidos posibles puede existir en más de 60 formas variantes. Debido a que estos codones proporcionan el mensaje para sólo 20 aminoácidos diferentes (así como el inicio y la terminación de la transcripción), algunos aminoácidos pueden estar codificados por más de un codón, un fenómeno conocido como redundancia de codones. Por razones que no se entienden completamente, los codones alternativos no están uniformemente presentes en el ADN endógeno de diferentes tipos de células. De hecho, parece existir una jerarquía natural variable o "preferencia" por ciertos codones en ciertos tipos de células. Como ejemplo, el aminoácido leucina está especificado por cualquiera de seis codones de ADN incluyendo CTA, CTC, CTG, CTT, TTA y TTG. El análisis exhaustivo de frecuencias de codones del genoma para microorganismos ha puesto de manifiesto que el ADN endógeno de *E. coli* contiene más comúnmente el codón de especificación de leucina CTG, mientras que el ADN de levaduras y mohos del fango incluye más comúnmente un codón de especificación de leucina TTA. En vista de esta jerarquía, generalmente se cree que la probabilidad de obtener altos niveles de expresión de un polipéptido rico en leucina por un huésped de *E. coli* dependerá en cierta medida de la frecuencia de uso de codones. Por ejemplo, es probable que un gen rico en codones TTA apenas se exprese en *E. coli*, mientras que un gen rico en CTG probablemente se expresará mucho en este huésped. De forma similar, un codón preferido para la expresión de un polipéptido rico en leucina en células huésped de levadura sería TTA.

Las implicaciones de los fenómenos de preferencia de codones sobre técnicas de ADN recombinante son evidentes, y el fenómeno puede servir para explicar muchos fracasos previos a la hora de conseguir altos niveles de expresión de genes exógenos en organismos huésped transformados con éxito —un codón menos "preferido" puede estar presente de forma repetida en el gen insertado y la maquinaria de la célula huésped para la expresión puede no funcionar tan eficazmente. Este fenómeno sugiere que los genes sintéticos que se han diseñado para incluir los codones preferidos de la célula huésped prevista proporcionan una forma óptima de material genético extraño para la práctica de técnicas de ADN recombinante. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un gen de fusión

de TERT-LTB que presenta codones optimizados para la expresión en una célula humana. En una realización preferida de la presente invención, se ha descubierto que el uso de codones alternativos que codifican la misma secuencia proteica puede eliminar las limitaciones de la expresión de proteína de fusión de TERT-LTB exógena en células humanas.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteína de fusión de TERT-LTB se convierten en una secuencia polinucleotídica que tiene una secuencia traducida idéntica pero con un uso de codones alternativo, como se describe por Lathe, "Synthetic Oligonucleotide Probes Deduced from Amino Acid Sequence Data: Theoretical and Practical Considerations" J. Molec. Biol. 183: 1-12 (1985). La metodología consiste generalmente en identificar codones en la secuencia de tipo silvestre que no estén
10 comúnmente asociados con genes humanos altamente expresados, y sustituirlos con codones óptimos para una alta expresión en células humanas. La nueva secuencia génica se inspecciona después para determinar secuencias no deseadas generadas por estas sustituciones de codones (por ejemplo, secuencias "ATTTA", creación involuntaria de sitios de reconocimiento de corte y empalme de intrones, sitios de enzimas de restricción no deseados, etc.). Las secuencias no deseadas se eliminan por sustitución de los codones existentes con diferentes codones que
15 codifiquen el mismo aminoácido. Los segmentos génicos sintéticos se ensayan después para una expresión mejorada.

Se entiende que este procedimiento no dará como resultado necesariamente una secuencia polinucleotídica en la que todos los codones sean codones óptimos de acuerdo con el uso de codones de células de mamífero y/o humanas de alto nivel de expresión. Sin embargo, se prefiere que, en realizaciones de la invención en las que se
20 contemplan variantes de polinucleótidos de codones optimizados de TERT y/o LTB, una porción sustancial de los codones resultantes se parezca al uso de codones de genes de mamífero y/o humanos altamente expresados.

Los procedimientos descritos anteriormente se usaron para crear secuencias de genes sintéticos que codifican proteínas de fusión de TERT-LTB, dando como resultado un gen que comprende codones optimizados para un alto nivel de expresión en células humanas. Aunque el procedimiento anterior proporciona un resumen de una
25 metodología representativa para diseñar genes de codones optimizados para su uso en vacunas contra el cáncer, un experto en la materia entiende que puede conseguirse una eficacia vacunal o una expresión de genes aumentada similar mediante variaciones minoritarias en el procedimiento o mediante variaciones minoritarias en la secuencia.

Un experto en la materia también reconocerá que pueden construirse moléculas de ácido nucleico adicionales que proporcionen altos niveles de expresión de fusión de TERT-LTB en células humanas, en las que sólo una porción de los codones de las moléculas de ADN sean codones optimizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, los codones que comprenden la porción TERT de la fusión de TERT-LTB están optimizados para un alto nivel de expresión en células humanas, y los codones que comprenden la porción LTB de la fusión de TERT-LTB son sustancialmente similares a la LTB de tipo silvestre. En otras realizaciones de la presente invención,
35 los codones que comprenden la porción LTB de la fusión de TERT-LTB están optimizados para un alto nivel de expresión en células humanas, y los codones que comprenden la porción TERT de la fusión de TERT-LTB son sustancialmente similares a un gen de TERT de tipo silvestre. En otras realizaciones más de la presente invención, las porciones tanto TERT como LTB de la fusión de TERT-LTB son de codones optimizados para un alto nivel de expresión en células humanas, por ejemplo, la secuencia de hTERT-LTB_{opt} como se expone en la SEC ID N°: 5. También se contemplan por la presente invención fusiones de TERT-LTB en las que sólo un subconjunto de los
40 codones están optimizados dentro de la porción de TERT y/o LTB de la fusión de TERT-LTB.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ensamblarse en un casete de expresión que comprende secuencias diseñadas para proporcionar una expresión eficaz de la proteína en una célula humana. El casete contiene preferentemente un gen codificante de proteína de fusión de TERT-LTB, con secuencias de control de la transcripción y de la traducción relacionadas unidas operativamente al mismo, tales como un promotor y secuencias de terminación. En una realización preferida, el promotor es el promotor de citomegalovirus con la secuencia del intrón A (CMV), aunque los expertos en la materia reconocerán que puede usarse cualquiera de varios otros promotores conocidos, tales como un promotor de inmunoglobulina fuerte u otro promotor de gen eucariota. Un terminador de la transcripción preferido es el terminador de la hormona de crecimiento bovina, aunque también
50 pueden usarse otros terminadores de la transcripción conocidos. La combinación de terminador de CMV-BGH se prefiere particularmente.

De acuerdo con la presente invención, el casete de expresión de la fusión de TERT-LTB se inserta en un vector. El vector es preferentemente un vector adenovírico o plasmídico, aunque también puede usarse ADN lineal unido a un promotor, u otros vectores tales como virus adenoasociados o un virus vaccinia modificado, vector retrovírico o
55 lentivírico.

En una realización preferida de la invención, el vector es un vector de adenovirus (usado indistintamente en el presente documento con el término "adenovector"). Los adenovectores pueden basarse en diferentes serotipos de adenovirus, tales como los encontrados en seres humanos o animales. Los ejemplos de adenovirus de animales incluyen bovinos, porcinos, de chimpancés, murinos, caninos y aviares (CELO). Los adenovectores preferidos están basados en serotipos humanos, más preferentemente serotipos de Grupo B, C o D. Los ejemplos de serotipos de
60

Grupo B, C, D o E de adenovirus humanos incluyen los tipos 2 ("Ad2"), 4 ("Ad4"), 5 ("Ad5"), 6 ("Ad6"), 24 ("Ad24"), 26 ("Ad26"), 34 ("Ad34") y 35 ("Ad35"). En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el vector de expresión es un vector de adenovirus de tipo 6 (Ad6).

5 Si el vector seleccionado es un adenovirus, se prefiere que el vector sea un denominado vector adenovirico de primera generación. Estos vectores adenoviricos se caracterizan por tener una región de gen E1 no funcional y, preferentemente, una región de gen E1 adenovirico delecionada. Además, los vectores de primera generación pueden tener una región de gen E3 no funcional o delecionada (Danthinne y col. Gene Therapy 7: 1707-1714 (2000); F. L. Graham, Immunology Today 21(9): 426-428 (2000)). Los adenovectores no tienen que tener sus regiones E1 y E3 completamente eliminadas. En su lugar, se elimina una cantidad suficiente de la región E1 para
10 hacer que el vector sea incompetente para la replicación en ausencia de que las proteínas E1 se suministren en trans; y la deleción de E1 o la combinación de las deleciones de E1 y E3 son suficientemente grandes para alojar un casete de expresión génica.

En algunas realizaciones, el casete de expresión se inserta en la posición en la que se localiza normalmente el gen E1 adenovirico. Además, estos vectores tienen opcionalmente una región E3 no funcional o delecionada. Se prefiere
15 que el genoma de adenovirus usado tenga delecionadas las regiones tanto E1 como E3 ($\Delta E1\Delta E3$). Los adenovirus pueden multiplicarse en líneas celulares conocidas que expresan el gen E1 vírico, tales como células 293 o células PERC.6, o en líneas celulares derivadas de células 293 o PERC.6 que se transformen de forma transitoria o de forma estable para expresar una proteína extra. Por ejemplo, cuando se usan construcciones que tienen una expresión de gen controlador, tal como un sistema de promotor regulable por tetraciclina, la línea celular puede expresar los componentes implicados en el sistema regulador. Un ejemplo de dicha línea celular es T-Rex-293; se conocen otras en la técnica.
20

Por comodidad en la manipulación del vector adenovirico, el adenovirus puede estar en forma de un plásmido lanzadera. La presente invención también se refiere a un vector plasmídico lanzadera que comprende una porción plasmídica y una porción de adenovirus, comprendiendo la porción de adenovirus un genoma adenovirico que tiene E1 delecionado y una deleción de E3 opcional, y que tiene un casete de expresión insertado que comprende una
25 secuencia de nucleótidos codificante de proteína de fusión de TERT-LTB. En realizaciones preferidas, existe un sitio de restricción flanqueando la porción adenovirica del plásmido, de modo que el vector adenovirico puede eliminarse fácilmente. El plásmido lanzadera puede replicarse en células procariotas o células eucariotas.

En una realización preferida de la invención, el casete de expresión se inserta en un plásmido de adenovirus Ad6 ($\Delta E1\Delta E3$) (véase Emini y col., documento US20040247615). Este vector comprende un genoma adenovirico Ad6 con las regiones E1 y E3 delecionadas. En otras realizaciones preferidas de la invención, el casete de expresión se inserta en el plásmido adenovirico pMRKAd5-HV0 (véase Emini y col., documento US20030044421). Este plásmido comprende un genoma adenovirico Ad5 con las regiones E1 y E3 delecionadas. El diseño del plásmido pMRKAd5-HV0 se mejoró sobre los adenovectores previos por extensión de la región de empaquetamiento que actúa en cis 5' más hacia el gen E1 para incorporar elementos que se descubrió que eran importantes en la optimización del empaquetamiento vírico, dando como resultado una amplificación de virus aumentada. Ventajosamente, estos vectores adenoviricos mejorados son capaces de mantener una estabilidad genética después de una propagación de alto número de pases.
30
35

Las técnicas convencionales de biología molecular para preparar y purificar construcciones de ADN permiten la preparación de los adenovirus, plásmidos lanzadera e inmunógenos de ADN de la presente invención.
40

Se ha determinado de acuerdo con la presente invención que la vacunación genética con ADN plasmídico que codifica TPA mTERT(AI)-LTBopt puede romper la inmunotolerancia en ratones BALB/c y B6 (véase el EJEMPLO 7). También se ha demostrado en el presente documento que la inmunización con el plásmido TPA-mTERT(AI)-LTBopt puede generar una respuesta inmune citotóxica en ratones BALB/c (véase el EJEMPLO 8). Se ha demostrado además que está construcción es capaz de inducir una respuesta inmune CD8+ más potente que mTERT(AI) solamente (véase el EJEMPLO 9) y es capaz de controlar el crecimiento tumoral (EJEMPLO 11). Por lo tanto, los datos descritos en la presente memoria demuestran que la fusión de la secuencia codificante de TERT con el ADNc de LTB da como resultado un aumento en la respuesta inmune específica de TERT.
45

También se ha demostrado de acuerdo con la presente invención que el hTERT(AI)-LTBopt puede inducir una respuesta inmune CD8+ restringida por HLA-A2 (véase el EJEMPLO 12), y que esta respuesta inmune puede amplificarse por refuerzo con Ad6-hTERT(AI).
50

Por lo tanto, los vectores descritos anteriormente pueden usarse en composiciones inmunogénicas y vacunas para prevenir el desarrollo de tumores asociados con una expresión aberrante de TERT y/o para tratar cánceres existentes. Los vectores de la presente invención permiten el desarrollo y la comercialización de vacunas eliminando las dificultades con la obtención de altos niveles de expresión de TERT exógena en organismos huésped transformados con éxito y proporcionando una proteína de fusión de TERT-LTB que pueda generar una respuesta inmune aumentada cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano.
55

Con este fin, también se describe un procedimiento de prevención o tratamiento del cáncer asociado a TERT, que

comprende administrar a un mamífero un vector vacunal, que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención.

5 El vector vacunal puede administrarse para el tratamiento o la prevención de un cáncer en cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitación: cáncer pulmonar, cáncer de mama y cáncer colorrectal. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

10 Además, un experto en la materia puede seleccionar cualquier tipo de vector para su uso en el procedimiento de tratamiento y prevención descrito. Preferentemente, el vector es un vector de adenovirus o un vector plasmídico. En una realización preferida de la invención, el vector es un vector adenovírico que comprende un genoma adenovírico con una delección en la región E1 de adenovirus y un inserto en la región E1 de adenovirus, en el que el inserto comprende un casete de expresión que comprende: (a) una secuencia de nucleótidos de la invención; y (b) un promotor unido operativamente al polinucleótido.

15 La presente invención se refiere además a un vector vacunal de adenovirus que comprende un genoma adenovírico con una delección en la región E1 y un inserto en la región E1, en el que el inserto comprende un casete de expresión que comprende: (a) una secuencia de nucleótidos de la invención; y (b) un promotor unido operativamente al polinucleótido.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el vector adenovírico es un vector Ad 6.

En otra realización preferida de la invención, el vector adenovírico es un vector Ad 5.

20 En otra realización preferida más, el vector adenovírico es un vector Ad 24. También se contempla para su uso en la presente invención un vector vacunal de adenovirus que comprende un genoma de adenovirus que infecta de forma natural a una especie distinta del ser humano, incluyendo, pero sin limitación, vectores adenovíricos de chimpancés. Una realización preferida de este aspecto de la invención es un vector vacunal Ad 3 de chimpancé.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un plásmido vacunal que comprende una porción plasmídica y una porción de casete de expresión, comprendiendo la porción de casete de expresión: (a) una secuencia de nucleótidos de la invención; y (b) un promotor unido operativamente al polinucleótido. Un ejemplo de un plásmido adecuado sería el plásmido de expresión de mamífero VIJns como se describe (J. Shiver y col. en DNA Vaccines, M. Liu y col. eds., N. Y. Acad. Sci., N. Y., 772: 198-208 (1996).

30 En algunas realizaciones de la presente invención, las vacunas de polinucleótidos basadas en plásmidos y adenovirus recombinantes desveladas en el presente documento se usan en diversas combinaciones de sensibilización/refuerzo para inducir una respuesta inmune aumentada. En este caso, los dos vectores se administran en un régimen de "sensibilización y refuerzo". Por ejemplo, el primer tipo de vector se administra una o más veces y entonces, después de una cantidad de tiempo predeterminada, por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, seis meses u otro intervalo apropiado, se administra un segundo tipo de vector una o más veces. Preferentemente, los vectores llevan casetes de expresión que codifican el mismo polinucleótido o una combinación de polinucleótidos.

35 En la realización en la que también se usa ADN plasmídico, se prefiere que el vector contenga uno o más promotores reconocidos por células de mamífero o de insecto. En una realización preferida, el plásmido contendría un promotor fuerte tal como, pero sin limitación, el promotor de CMV. Un experto en la materia reconocerá que puede seleccionarse cualquiera de varios otros promotores conocidos con los fines de dirigir la expresión de las secuencias de nucleótidos de TERT-LTB de la presente invención. Los ejemplos de promotores adicionales incluyen promotores de origen natural tales como el promotor alfa EF 1, el promotor del virus del sarcoma de Rous y los promotores temprano/tardío de SV40 y el promotor de p-actina; y promotores artificiales tales como un promotor específico de músculo sintético y un promotor de CMV/específico de músculo quimérico (Li y col., Nat. Biotechnol. 17: 241-245 (1999); Hagstrom y col., Blood 95: 2536-2542 (2000)). El gen de fusión de TERT-LTB sintético u otro gen a expresar estaría unido a dicho promotor.

45 Como se ha indicado anteriormente, una vacuna de vector adenovírico y una vacuna plasmídica pueden administrarse a un vertebrado como parte de un solo régimen terapéutico para inducir una respuesta inmune. Por lo tanto, se desvela un procedimiento de protección de un mamífero de un cáncer asociado a TERT que comprende: (a) introducir en el mamífero un primer vector que comprende: i) una secuencia de nucleótidos de la invención y ii) un promotor unido operativamente al polinucleótido; (b) permitir que pase una cantidad de tiempo predeterminada; y
50 (c) introducir en el mamífero un segundo vector que comprende: i) una secuencia de nucleótidos de la invención; y ii) un promotor unido operativamente al polinucleótido.

55 En una realización del procedimiento de protección descrito anteriormente, el primer vector es un plásmido y el segundo vector es un vector de adenovirus. En una realización alternativa, el primer vector es un vector de adenovirus y el segundo vector es un plásmido. En algunas realizaciones de la presente invención, el primer vector se administra al paciente más de una vez antes de que se administre el segundo vector.

En el procedimiento descrito anteriormente, el primer tipo de vector puede administrarse más de una vez, con cada

administración del vector separada por una cantidad de tiempo predeterminada. Dicha serie de administración del primer tipo de vector puede estar seguida de la administración de un segundo tipo de vector una o más veces, después de que haya pasado una cantidad de tiempo predeterminada. De forma similar al tratamiento con el primer tipo de vector, el segundo tipo de vector también puede administrarse una vez o más de una vez, después de intervalos de tiempo predeterminados.

Se desvela un procedimiento de tratamiento de un paciente que padece un cáncer asociado a TERT que comprende: (a) introducir en el mamífero un primer vector que comprende: i) una secuencia de nucleótidos de la invención; y ii) un promotor unido operativamente al polinucleótido; (b) permitir que pase una cantidad de tiempo predeterminada; y (c) introducir en el paciente un segundo vector que comprende: i) una secuencia de nucleótidos de la invención; y ii) un promotor unido operativamente al polinucleótido.

El primer vector puede ser un plásmido y el segundo vector puede ser un vector de adenovirus. Como alternativa, el primer vector puede ser un vector de adenovirus y el segundo vector puede ser un plásmido. El primer vector puede administrarse al paciente más de una vez antes de que se administre el segundo vector al paciente.

La cantidad de ADN expresable o de ARN transcrito a introducir en un destinatario de vacuna dependerá parcialmente de la potencia de los promotores usados y de la inmunogenicidad del producto génico expresado. En general, una dosis inmunológicamente o profilácticamente eficaz de aproximadamente 1 ng a 100 mg y, preferentemente, de aproximadamente 10 µg a 300 µg de un vector vacunal plasmídico se administra directamente en tejido muscular. Una dosis eficaz para adenovirus recombinante es de aproximadamente 10^6 - 10^{12} partículas y, preferentemente, de aproximadamente 10^7 - 10^{11} partículas. La inyección subcutánea, la introducción intradérmica, la impresión a través de la piel y otros modos de administración tales como la administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o por inhalación también se contemplan.

Los vectores vacunales pueden introducirse en el destinatario a través de inyección intramuscular.

Los vectores vacunales de la presente invención pueden estar desnudos, es decir, no asociados con ninguna proteína u otros agentes que afecten al sistema inmune del destinatario. En este caso, es deseable para los vectores vacunales que estén en una solución fisiológicamente aceptable, tal como, pero sin limitación, solución salina estéril o solución salina tamponada estéril. Como alternativa, puede ser ventajoso administrar un agente que contribuya a la captación celular de ADN, tal como, pero sin limitación, ión calcio. Estos agentes se denominan generalmente reactivos facilitadores de la transfección y cámaras farmacéuticamente aceptables. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el reactivo o vehículo farmacéuticamente aceptable particular, así como el tiempo y modo de administración apropiados.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1

Construcción de proteínas de fusión de TERT

Para determinar si la fusión del antígeno de transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) con la subunidad LTB de enterotoxina termolábil de *E. coli* (Fingerut y col. Vaccine 23(38): 4685-96 (2005); Rigano y col. Plant Cell Rep. 22(7): 502-8 (2004)) podía aumentar la inmunogenicidad de TERT en solitario, se construyeron vectores que codifican la transcriptasa inversa de la telomerasa de longitud completa con modificaciones. En primer lugar, se optimizaron los codones de la secuencia de ADN para incorporar los codones preferidos por células huésped humanas. Además, para asegurarse de que el antígeno codificado era seguro para uso vacunal, se introdujeron mutaciones en la secuencia de nucleótidos de TERT para inactivar la actividad catalítica de la telomerasa de la proteína codificada. En concreto, se añadieron las mutaciones D712A y V713I a la secuencia de TERT humana y se añadieron las mutaciones D702A y V703I a la secuencia de TERT de ratón (Arai y col. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. J. Biol. Chem. 277 (10): 8538-44 (2002)).

Las fusiones de TERT se obtuvieron por ingeniería genética uniendo el extremo C-terminal de las secuencias de nucleótidos de TERT modificadas descritas anteriormente a una secuencia de nucleótidos que codifica una LTB modificada (nt 64 a 375), en la que se había eliminado la secuencia codificante de péptido señal. Además, se añadió una secuencia líder que codifica la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano 5' a la secuencia de nucleótidos codificante de TERT para asegurar la secreción de la proteína TERT (Haddad y col. Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18(3): 193-202 (1997)). Se optimizaron los codones de la secuencia completa para incorporar codones preferidos por células huésped humanas usando algoritmos informáticos. El gen de codones optimizados sintético se ensambló mediante oligonucleótidos sintéticos. En la construcción final, se añadieron dos aminoácidos (S y R) entre la secuencia de TERT y la secuencia de LTB debido a la estrategia de clonación.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las fusiones de TERT se clonaron en el vector pV1JnsA bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (CMV)/intrón A más la señal de poliadenilación de la hormona de

crecimiento bovina (BGH). El plásmido pV1J/TPA-hTERT-LTBopt lleva el ADNc inactivado de codones optimizados de TERT humana fusionado a las secuencias codificantes de la secuencia señal de TPA en el extremo N-terminal, y LTB en el extremo C-terminal. De forma similar, el plásmido pV1J/TPA-mTERT-LTBopt lleva el ADNc inactivado de codones optimizados de TERT de ratón fusionado a TPA y LTB.

5 Ejemplo 2

Construcciones de plásmido y adenovirus

10 pV1JnsA/TPA-mTERT(AI)-LTBopt: El plásmido 041046pucKana que contenía la secuencia de TPA-mTERT(AI)-LTB se obtuvo en GENEART (Geneart GmbH, Regensburg, Alemania). El plásmido se digirió con *BglII* y *Sall* y el fragmento resultante se clonó en el sitio *BglIII/Sall* en el plásmido pV1JnsA (Montgomery y col., DNA Cell Biol., 12 (9): 777-83(1993)).

15 pV1JnsA/mTERT(AI)opt: El pV1JnsA/TPA-mTERT(AI)-LTB se digirió con *XbaI* para eliminar la secuencia codificante de LTB (presente entre dos sitios *XbaI*), la construcción resultante pV1JnsA/TPA-mTERT(AI) tenía 3 aminoácidos (S;R;N) después del último aminoácido de mTERT y antes del codón de terminación. La eliminación de la secuencia codificante de TPA se realizó en el pV1JnsA/TPA-mTERT(AI) por digestión con *BamHI* y *EcoRV*. La secuencia codificante de TPA se sustituyó por un producto de PCR obtenido amplificando la secuencia de mTERT con el cebador con sentido (5'-GATCTGATGATATCGCCA CCATGACCAGAGCCCCCAGATG-3; SEC ID N°: 15) y el cebador antisentido (5'-AGGGGGGATCCGCACACCTGGTAGGCGCAGCTGGGG-3'; SEC ID N°: 16) y se clonó de nuevo en el vector digerido con *BamHI* y *EcoRV*.

20 pV1JnsA/TPA-hTERT(AI)-LTBopt: El fragmento sintético correspondiente a TPA-hTERT(AI)-LTB obtenido por GENEART se clonó en el pV1JnsA usando los sitios de restricción *BglII/Sall*.

25 Ad6-TPAmTERT(AI)-LTBopt: El plásmido 041046pucKana que contenía la secuencia de TPA-mTERT(AI)-LTBopt se obtuvo en GENEART. El plásmido se digirió con *BglII* y *Sall* y el fragmento se clonó con *BglII/Sall* en el vector lanzadera plasmídico pNEBAd6-CMVpA. El plásmido pNEBAd6-CMVpA-TPA-mTERT(AI)-LTB digerido con *EcoRI/HindIII* se recombinó con el plásmido linealizado con *Clal* pMRK Ad6 ΔE1 ΔE3. El plásmido se cortó con *PacI* para liberar las ITR de Ad y se transfectó en células Perc-6. La amplificación del vector Ad6 se llevó a cabo por pases en serie y se purificó a través de purificación en gradiente de CsCl convencional.

30 Ad6-hTERT(AI): El plásmido pCRsript que contenía la secuencia de tipo silvestre de hTERT (la secuencia de tipo silvestre de hTERT se rescató por transcripción inversa de ARNm de células tumorales humanas) se digirió con *BglII/XbaI*, se rellenó con la enzima Klenow y se clonó en pV1JnsA digerido con *EcoRV* y *BglII*. El pV1JnsA-hTERT se mutó usando un oligonucleótido (5'-CTGTACTT TGCAAGGTGGCTATCACGGGCGCGTACG-3'; SEC ID N°: 17) y el kit de mutagénesis dirigida Quikchange de Stratagene (Stratagene, LA Jolla, CA; Cat: 200513) para obtener el pV1JnsA-hTERT(AI). El plásmido se digirió con *BglII* y *Sall* y el fragmento se clonó con *BglII/Sall* en el vector lanzadera plasmídico pNEBAd6-CMVpA. El plásmido pNEBAd6-CMVpA-hTERT(AI) se digirió con *PacI/PmeI* y se recombinó con plásmido linealizado con *Clal* pMRK Ad6 ΔE1 ΔE3. El plásmido se cortó con *PacI* para liberar las ITR de Ad y se transfectó en células Perc-6. La amplificación del vector Ad6 se llevó a cabo por pases en serie y se purificó a través de una purificación en gradiente de CsCl convencional.

Ejemplo 3

Ensayo ELISPOT de IFN- γ

40 Se detectaron esplenocitos de ratón que secretaban IFN- γ de una forma específica de antígeno usando un ensayo Inmunospot (ELISPOT) unido a enzimas (Miyahira y col. J Immunol Methods 181(1): 45-54 (1995)). Se revistieron placas MAIP de noventa y seis pocillos (Millipore Corp., Billerica, MA) con 100 μ l/pocillo de anti-IFN- γ de ratón de rata purificado (IgG1, clon R4-6A2, Pharmingen) diluido hasta 2,5 μ g/ml en PBS estéril. Después de lavar con PBS, el bloqueo de las placas se llevó a cabo con 200 μ l/pocillo de medio R10 durante 2 h a 37 °C.

45 Se obtuvieron esplenocitos por extirpación del bazo de los ratones eutanasiados de una forma estéril, seguido de disgregación del bazo por rallado sobre una rejilla de metal. Se eliminaron los eritrocitos por lisis osmótica por adición de 1 ml de PBS 0,1X al sedimento celular y agitación vorticial durante aproximadamente 15 s. Después, se añadió un ml de PBS 2x y el volumen se llevó a 4 ml con PBS 1x. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, y el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio R10. Las células viables se contaron usando tinción de Türks.

50 Los esplenocitos se sembraron en placas a 5×10^5 y $2,5 \times 10^5$ células/pocillo por duplicado y se incubaron durante 20 h a 37 °C con una suspensión de 1 μ g/ml de cada péptido. Se usó concanavalina (ConA) como control interno positivo para cada ratón a 5 μ g/ml. Después de lavar con PBS, Tween 20 al 0,05 %, las placas se incubaron durante una noche a 4 °C con 50 μ l/pocillo de anti-IFN γ de ratón de rata conjugado con biotina (IgG1 de rata, clon XMG 1.2, PharMingen) diluido a 1:2500 en tampón de ensayo. Después de un lavado exhaustivo, las placas se revelaron por adición de NBTB-CIP 50 μ l/pocillo (Pierce) hasta que era claramente visible el desarrollo de manchas. La reacción

se interrumpió por lavado de las placas minuciosamente con agua destilada. Las placas se secaron al aire y después se contaron las manchas usando un lector ELISPOT automático.

Ejemplo 4

Tinción de citocina intracelular

- 5 De uno a dos millones de esplenocitos de ratón o PBMC obtenidas por extracción de sangre retroorbitaria en EDTA se resuspendieron en 1 ml de RPMI FCS al 10 % y se incubaron con una combinación de péptidos (5-6 µg/ml de concentración final de cada péptido) y brefeldina A (1 µg/ml; BD Pharmingen nº cat 555028/2300kk) a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 12-16 horas. Después, las células se lavaron con tampón FACS (PBS FBS al 1 %, NaN₃ al 0,01 %) y se incubaron con bloque de Fc anti-CD16/CD32 de ratón purificado (BD Pharmingen nº cat 553142) durante 15 min a 4 °C. Después, las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpos de superficie: anti-ratón conjugado con CD4-PE (BD Pharmingen, nº cat. 553049), anti-ratón conjugado con PercP CD8 (BD Pharmingen nº cat 553036) y anti-CD3e de ratón conjugado con APC (BD Pharmingen nº cat 553066) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después del lavado las células se fijaron y se permeabilizaron con Solución Cytotfix-Cytoperm (BD Pharmingen nº cat 555028/2300kk) durante 20 min a 4 °C en la oscuridad. Después de lavar con Solución PermWash (BD Pharmingen nº cat 555028/2300kk) las células se incubaron con los anticuerpos de IFN γ -FITC (BD Pharmingen). Después, las células se lavaron, se fijaron con formaldehído al 1 % en PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACS-Calibur usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA).

Ejemplo 5

Ensayo de linfocitos T citotóxicos (CTL)

- 20 Se obtuvieron esplenocitos extirpando el bazo de los ratones eutanasiados de forma estéril, seguido de disgregación del bazo por rallado sobre una rejilla de metal. Se eliminaron los eritrocitos por lisis osmótica por adición de 1 ml de PBS 0,1X al sedimento celular y agitación vorticial durante aproximadamente 15 s. Se sembraron en placas esplenocitos a 2×10^6 células/ml en R10 en una placa de cultivo celular de 24 pocillos (2 ml de células/pocillo) en presencia del péptido inmunogénico a la concentración final de 10 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C, humedad del 95 %, CO₂ al 5 % durante 6 días. El día 3 de cultivo, se añadió IL-2 humana recombinante a una concentración final de 10 U/ml.

- 30 Las células diana que crecían en fase exponencial se recogieron y se llevaron a 1×10^6 células/ml/tubo en presencia de péptido inmunogénico a 10 µg/ml de concentración final. Las células se marcaron con 50-100 µCi de ⁵¹Cr/tubo a 37 °C durante 2 horas. Las células diana se lavaron tres veces con 10 ml de medio por centrifugación a 250 g, a temperatura ambiente durante 5 min y se llevaron a 1×10^5 células/ml.

- El ensayo de CTL se realizó por siembra en placa de células Efectoras/Diana con una proporción de E/T a 100:1, 50:1, 25:1 y 12,5:1. Después de 4 horas de incubación, las placas se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante (30 µl/pocillo). Las placas se secaron durante una noche y se contaron usando un contador BetaPlate.

35 Ejemplo 6

Inmunización de ratones

- Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra (H-2b) en Charles River (Lecco, Italia). Los ratones HLA-A2.1 (HHD) se proporcionaron por cortesía de F. Lemmonier (Instituto Pasteur, París, Francia). Se adquirieron ratones BALB/c (H-2d) en Charles River (Lecco, Italia). Los ratones se inmunizaron a las 8 semanas de edad. Se electroinyectaron cincuenta microgramos de ADN plasmídico en un volumen de 50 µl en el cuádriceps de los ratones como se ha descrito previamente (Rizzuto y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(11): 6417-22 (1999)). La electroporación (EP) se realizó como se ha descrito previamente (Zucchelli y col. J. Virol. 74(24): 11598-607 (2000); Rizzuto y col., anteriormente). En resumen, el choque eléctrico consistía en 10 series con 1000 pulsos cuadrados bipolares (90V/cm, 75mA, 200 µs/fase). Las inyecciones de Ad se llevaron a cabo en los cuádriceps de ratones en un volumen de 50 µl. Se analizó la respuesta inmune mediada por células en el momento indicado.

Ejemplo 7

La vacunación genética con ADN plasmídico que codifica TPA-mTERT(AI)-LTB rompe la inmunotolerancia

- 50 Para determinar si la vacunación de ratones con TPA-mTERT(AI)-LTB podía romper la inmunotolerancia, se inmunizaron grupos de 20 ratones BALB/c con 5 inyecciones semanales de plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTB seguido de electroporación, como se describe en el EJEMPLO 6. Once días después de la última inyección, se obtuvieron esplenocitos de ratones individuales, que se usaron para analizar la respuesta inmune mediada por células mediante un ensayo ELISPOT de IFN- γ y mediante tinción de citocina intracelular (ICS).

La secreción de IFN γ específica de antígeno a partir de esplenocitos estimulados se midió usando tres

combinaciones de péptidos de mTERT de 15 monómeros que solapaban en 11 aminoácidos y que abarcaban la proteína mTERT completa. La combinación de mTERT-1 estaba compuesta por 94 péptidos individuales que abarcaban la región de mTERT del aminoácido 1 al 388. La combinación de mTERT-2 estaba compuesta por 106 péptidos individuales que abarcaban la región de mTERT del aminoácido 377 al 811. La combinación de mTERT-3 estaba compuesta por 78 péptidos individuales que abarcaban la región de mTERT del aminoácido 801 al 1122. Como control negativo, también se midió la producción de citocina tras la estimulación de los esplenocitos con DMSO a la misma concentración usada para solubilizar los péptidos de TERT. La respuesta inmune inducida frente al adyuvante LTB se detectó también usando una combinación de 24 péptidos de 15 monómeros individuales que solapaban en 11 aminoácidos y que abarcaban la secuencia completa de LTB. Los resultados de ELISpot indican que la vacunación de ratones con TPA-mTERT (AI)-LTBopt generaba una respuesta inmune mediada por células (CMI) contra las regiones N-terminal y central de la proteína TERT, contenidas dentro de las combinaciones de péptidos TERT-1 y TERT-2 (FIGURA 3). También se detectó la CMI contra LTB mediante ELISpot (FIGURA 3).

Para caracterizar mejor la respuesta de linfocitos T generada por el plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt, y para identificar el subconjunto de linfocitos T CD8+ y CD4+ responsables de la producción de IFN- γ , se llevó a cabo la tinción intracelular de IFN- γ en esplenocitos de ratones vacunados y se analizó por FACS. Los datos obtenidos por ICS demuestran que la inmunización genética de ratones BALB/c vacunados con TPA-mTERT(AI)-LTBopt generaba una respuesta de linfocitos T CD8+ significativa contra la región N-terminal de la proteína TERT (contenida dentro de la combinación de péptidos mTERT-1, véase la FIGURA 4). La respuesta de linfocitos T CD4+ se mapeó en la región central de TERT (combinación de péptidos mTERT-2). Por el contrario, no pudo detectarse CMI en estos ratones contra la región C-terminal de la proteína (combinación de péptidos mTERT-3). También se detectó una respuesta de linfocitos T CD4+ contra LTB (FIGURA 4).

Para mapear adicionalmente la respuesta de linfocitos T CD8+, se usó una combinación de tamaño medio de péptidos de 15 monómeros de mTERT. Cada combinación de tamaño medio contenía diez péptidos de 15 monómeros, que estaban cada uno contenido individualmente en una combinación de tamaño medio separada. Por lo tanto, una reacción positiva de 2 combinaciones de tamaño medio identificaría inequívocamente un péptido de 15 monómeros individual como inmunogénico. Debido a que los epítomos CD8+ son siempre de 9 aminoácidos de longitud, cualquier péptido CD8+ está contenido en dos péptidos de 11 monómeros adyacentes. Los resultados demostraron que la respuesta inmune de linfocitos T CD8+ estaba localizada en la región de TERT incluida en los péptidos de mTERT de 15 monómeros siguientes: mTERT-41 (TERTaa161; LVPPSCAYQVCGSPL (SEC ID N°: 18) y mTERT-42 (TERTaa165; SCAYQVCGSPLYQIC; SEC ID N°: 19). Por solapamiento de los dos péptidos de 15 monómeros (mTERT41 y mTERT-42), se sintetizaron tres números reactivos posibles y se ensayaron en ICS. Por último, el epítomo CD8+ inmunodominante en ratones BALB/c se identificó en la secuencia siguiente (mTERTaa167; AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20). Estos resultados demuestran que la vacunación de ratones BALB/c con pV1J/TPA-mTERT-LTB podría romper la inmunotolerancia al antígeno de mTERT.

Para confirmar los datos obtenidos en ratones BALB/c, se inmunizaron también ratones C57BL/6 (B6) con 5 inyecciones semanales de plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. Se llevó a cabo la tinción intracelular de IFN- γ en esplenocitos de ratones vacunados y se analizaron por FACS. De forma similar a los resultados obtenidos con ratones BALB/c, la tolerancia frente a mTERT se rompió en todos los ratones B6. Además, se detectaron linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ que producían IFN γ por ICS tras la estimulación con péptidos de TERT (véase la FIGURA 6).

La respuesta inmune CD8+ generada por vacunación con ADN en ratones C57BL/6 estaba principalmente sesgada hacia la región central de la proteína TERT (combinación de péptidos mTERT-2). También era detectable una respuesta inmune a CD8+ más débil en la combinación de péptidos de mTERT-1. La respuesta inmune CD8+ se mapeó en ratones B6 usando combinaciones de tamaño medio como se han descrito anteriormente. Se identificaron dos epítomos CD8+ en B6. La primera secuencia inmunogénica se mapeó en la secuencia de aminoácidos mTERT198 (VGRNFTNL; SEC ID N°: 21) y el segundo epítomo CD8+ se mapeó en la secuencia mTERT486 (SLGKYGKL; SEC ID N°: 22). Además, la respuesta inmune CD4+ estaba localizada en la región N-terminal de TERT (combinación de péptidos mTERT-1). No se detectó respuesta inmune contra la región C-terminal de mTERT.

De forma similar a los resultados obtenidos con ratones BALB/c descritos anteriormente, la inmunización y el análisis de la respuesta inmune posterior de ratones B6 confirma que la inmunización con TPA-mTERT(AI)-LTBopt puede romper la inmunotolerancia al antígeno mTERT. Por lo tanto, en su conjunto, los resultados obtenidos con ratones BALB/c y B6 indican que la fusión de TPA-mTERT(AI)-LTBopt es un inmunógeno potente en el contexto propio independientemente de la cepa de ratones usada.

Ejemplo 8

Actividad citolítica de linfocitos T CD8+ específicos de TERT

Se usó un ensayo de linfocitos T citotóxicos (CTL) para detectar la actividad citolítica de linfocitos T CD8+ específicos de TERT generada por inmunización de ratones BALB/c con pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. Los ratones se inmunizaron con 5 inyecciones semanales de plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt, seguido de electroporación. Los esplenocitos de ratones obtenidos de 2 ratones individuales se recogieron 10 días después de la última inmunización. Estos esplenocitos se estimularon durante una semana con el péptido inmunogénico

mTERTaa167 (AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20) para obtener linfocitos T activados *in vitro*. La línea celular tumoral singénica de BALB/c 4T1 (Aslakson y col. Cancer Res. 52(6): 1399-405 (1992)) se usó como diana. Las células 4T1 se cargaron con el péptido inmunorreactivo y se marcaron con Cr⁵¹ para usarse como diana para el ensayo de CTL. Los linfocitos T activados se coincubaron con las células 4T1 diana a diferentes proporciones de efectores/diana. Los linfocitos T activados obtenidos tanto del ratón n° 1 como del ratón n° 2 mostraban actividad citolítica sobre células diana cuando estaban cargados con el péptido inmunogénico mTERTaa167 (AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20). Los dos ratones mostraban grados diferentes de actividad citotóxica que variaba del 80 % (ratón n° 1) al 25 % (ratón n° 2) a una proporción de efectores/diana de 50/1.

Los resultados indican que se indujo una respuesta inmune citotóxica tras la inmunización con ADN con TPA-mTERT(AI)-LTBopt como autoantígeno en ratones BALB/c (FIGURA 5).

Ejemplo 9

Inmunogenicidad comparativa de la construcción TPA-mTERT(AI)-LTBopt.

Para comparar la inmunogenicidad de la proteína mTERT(AI) secretada fusionada a LTB codificada por pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt con una versión no secretada de mTERT(AI) sin fusión a LTB, se construyó un derivado del plásmido pV1J que llevaba el mTERT(AI), como se describe en el EJEMPLO 2.

Se inmunizaron grupos de 6 ratones BALB/c con 5 inyecciones semanales de plásmidos pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt o pV1J/mTERT(AI)opt. La respuesta inmune se controló mediante tinción intracelular de IFN γ usando la secuencia de epítipo inmunodominante CD8+ mTERTaa167 previamente identificada para ratones BALB/c (AYQVCGSPL (SEC ID N°: 20)).

Los resultados indican que TPA-mTERT(AI)-LTBopt es una construcción mejor para la inducción de una respuesta inmune CD8+ contra la telomerasa murina que mTERT(AI) (FIGURA 7). La diferencia observada en la respuesta de linfocitos T CD8⁺ inducida en el grupo inmunizado por TPA-mTERT-LTB(AI)opt es estadísticamente diferente de la obtenida usando el mTERT(AI)opt en el contexto de la inmunización con ADN (prueba t de Student p = 0,04).

Ejemplo 10

Comparación de regímenes de inmunización

La respuesta inmune mediada por células anti-mTERT generada por inmunización de ratones BALB/c con ADN TPA-mTERT(AI)-LTBopt más estimulación eléctrica en solitario se comparó con la respuesta inmune inducida por un régimen de inmunización de sensibilización/refuerzo diversificado usando ADN TPA-mTERT(AI)-LTBopt más estimulación eléctrica como sensibilización y Ad6 TPA-mTERT(AI)-LTBopt como reforzador final de la respuesta inmune.

Se inmunizaron grupos de 10 ratones con 5 inyecciones semanales de plásmido pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. Una semana después, se administró una inyección de refuerzo que consistía en una inyección adicional de 50 μ g de ADN más electroporación (EP) con 10¹⁰ pv del Ad6/TPA-mTERT(AI)-LTBopt. Se realizó tinción intracelular de IFN γ en PBMC de ratón para evaluar la respuesta inmune mediada por células resultante. Un péptido que incluía un epítipo específico de linfocitos T CD8⁺ mTERT 167 (AYQVCGSPL; SEC ID N°: 20) que se había mapeado previamente en la región N-terminal de TERT se usó como antígeno. Los resultados indican que la amplitud de la respuesta inmune generada por la combinación de ADN-EP/Ad era 4,6 veces superior a la que se observó en ratones que habían recibido solamente un régimen de ADN-EP (véase la FIGURA 8).

Ejemplo 11

La vacunación con TPA-mTERT-LTB controla el crecimiento tumoral

Para determinar si la respuesta inmune específica de mTERT podía generar un efecto antitumoral, se trataron ratones BALB/c con el carcinógeno químico dimetil hidrazina por inyección intraperitoneal (i.p.) antes de la vacunación. El tratamiento de ratones con este carcinógeno conduce a un desarrollo progresivo de tumores en el colon caracterizado por formación de criptas aberrantes, adenomas y, por último, carcinomas. El tratamiento químico de estos ratones no hizo que estuvieran inmunocomprometidos, ya que la inmunización con TPA-mTERT(AI)-LTBopt generaba una respuesta inmune comparable a la encontrada previamente en ratones no tratados (no se muestran los datos).

Para evaluar el impacto de la inmunización genética en fases tempranas de la carcinogénesis inducida por DMH, se trataron ratones BALB/c con DMH y se inmunizaron mediante ADN seguido de electroporación (ADN-EP) con pV1J/TPA-mTERT(AI)-LTBopt de acuerdo con el programa descrito en la FIGURA 9.

Se eutanasiaron veinte ratones 12 semanas después del comienzo de tratamiento con DMH para contar el número de ACF (focos de criptas aberrantes) y el número de adenomas que se habían formado. Se observó una reducción significativa tanto del número de ACF como del número de adenomas presentes en ratones vacunados en

comparación con ratones no vacunados (FIGURA 10).

También se controló la eficacia de la vacunación con mTERT en una fase posterior de desarrollo tumoral. Para aumentar y mantener la respuesta inmune contra mTERT, los ratones se sometieron a ADN-EP repetido TPA-mTERT(AI)-LTBopt y Ad6TPA-mTERT(AI)-LTBopt (FIGURA 11). La respuesta inmune generada en estos ratones era comparable a la detectada en ratones BALB/c vacunados con el mismo régimen de ADN/Ad y no tratados con DMH.

Se eutanasiaron veinte ratones 30 semanas después del comienzo del tratamiento con DMH para contar el número de ACF (focos de criptas aberrantes) y de adenomas formados. Como los resultados observados con el desarrollo de tumores en fase temprana, se observó una reducción significativa en el número de ACF y adenomas en ratones vacunados en comparación con ratones no vacunados (FIGURA 12).

Por último, los tumores encontrados en ratones vacunados eran de menor volumen en comparación con los encontrados en ratones no vacunados (FIGURA 13A). Además, el análisis histológico mostró que los tumores presentes en ratones vacunados estaban en una fase menos avanzada en comparación con los tumores en animales no vacunados (FIGURA 13B).

15 Ejemplo 12

Caracterización de pV1JTPA-hTERT(AI)-LTBopt.

El potencial inmunogénico de pV1J/TPA-hTERT(AI)-LTBopt se evaluó en un contexto no propio ya que no estaban disponibles ratones transgénicos para hTERT. Se usaron ratones C57BL/6 transgénicos para el HLA-A2 humano (ratones transgénicos HHD) de modo que los péptidos inmunogénicos de TERT se presentarían en el contexto de HLA humano clase 1. Se vacunaron ratones transgénicos HHD mediante ADN-EP con 2 inyecciones bisemanales de 50 µg de plásmido pV1J/TPA-hTERT(AI)-LTBopt. La respuesta inmune inducida se evaluó por ICS en PBMC de ratones. El péptido inmunogénico de hTERT correspondiente al epítipo de hTERT 865 RLVDFFLLV (SEC ID N°: 23) se usó como antígeno. Esta secuencia de epítipo se describió previamente como un agente de unión fuerte para HLA-A2 e inductor de actividad CTL en experimentos de sensibilización *in vitro* de linfocitos T (Dupont y col. Cancer Research 65(12): 5417-27 (2005)).

Los resultados obtenidos a partir de 10 ratones mostraron que, de promedio, el 12 % de las células CD8+ producían IFN-γ cuando se estimulaban con el péptido de hTERT 865 inmunogénico (FIGURA 14). Los resultados indican que el candidato a vacuna pV1JTPA-hTERT(AI)-LTBopt es inmunogénico e inducía una respuesta inmune CD8 restringida por HLA-A2.

30 Ejemplo 13

Caracterización de la respuesta inmune en ratones vacunados después del refuerzo con Ad6-hTERT(AI).

Se ensambló una construcción de Ad6 hTERT(AI) como se ha descrito en el EJEMPLO 2. Esta construcción comprende codones de tipo silvestre, con la excepción de dos mutaciones que se añadieron para suprimir la actividad catalítica de la telomerasa. También se generó una construcción de fusión de Ad6 hTERT-LTB, pero no pudo rescatarse, de modo que el ensayo posterior se realizó solamente con Ad6hTERT(AI).

La construcción Ad6 hTERT(AI) se ensayó para determinar su capacidad de refuerzo sobre la respuesta inmune inducida por ADN-EP en ratones transgénicos HHD. Se vacunaron grupos de 10 ratones mediante ADN-EP con 1 inyección de 50 µg de plásmido pV1J/TPA-hTERT(AI)-LTBopt y se reforzaron con una segunda inyección de ADN o con Ad6 hTERT 10¹⁰ pp dos semanas después de la primera inyección de ADN. La respuesta inmune inducida se midió usando el péptido inmunodominante para alelo HLA-A2 hTERT865 identificado previamente. Se detectaron linfocitos T CD8+ reactivos que producían IFN-γ con altas frecuencias. Como se muestra en la FIGURA 14, la amplitud de la respuesta inmune generada por la combinación de ADN-EP/Ad era 3 veces superior a la observada en ratones que habían recibido solamente un régimen de ADN-EP.

Los resultados demostraron que la respuesta inmune específica de hTERT sensibilizada por inyección de ADN de pVIJ/TPA-hTERT(AI)-LTBopt se amplificaba por refuerzo de la misma con Ad6-hTERT(AI).

45 Ejemplo 14

Caracterización de la actividad CTL inducida por inmunización con hTERT.

La respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra hTERT generada en ratones vacunados se caracterizó adicionalmente por ensayo de la actividad citotóxica (CTL) de linfocitos T activados contra células diana tumorales. Se estimularon esplenocitos de ratones inmunizados en cultivo durante 6 días en presencia del péptido hTERT865 (SEC ID N°: 23; véase el EJEMPLO 12) e IL-2. Después de eso, se ensayaron linfocitos T CD8+ activados frente a células diana para determinar su actividad lítica en un ensayo de liberación de Cr⁵¹. Se usaron como células diana células HeLa transfectadas de forma estable para expresar la molécula de MHC de clase I quimérica presente en ratones HHD

(HeLa-HHD). Las células diana HeLa-HHD se cargaron exógenamente con el péptido inmunogénico hTERT865 o se infectaron 24 horas antes con un vector Ad6 que codifica hTERT, para sobreexpresar de forma endógena el antígeno TERT. Como control, las células diana se infectaron con un vector Ad6 que codifica GFP. Los resultados indican que los linfocitos T CD8+ inducidos por la vacunación descrita eran capaces de destruir células diana que sobreexpresan el antígeno hTERT (FIGURA 15).

Ejemplo 15

Caracterización de la inmunogenicidad de la vacuna de TERT humana en monos Rhesus.

La inmunogenicidad de la plataforma de vacunación genética basada en sensibilización con ADN, refuerzo con Ad, con hTERT se evaluó en monos rhesus. Debido a que la homología de secuencia de la TERT humana y la TERT de rhesus es del 96 %, se esperaba que la tolerancia desempeñara un papel fundamental en la determinación de la eficacia de la vacunación.

El protocolo de vacunación consistía en cinco inyecciones de ADN-EP (pV1J/TPA-hTERT-LTB, 5 mg/inyección), administradas cada dos semanas. Cuatro semanas después del último tratamiento con ADN-EP, los monos se reforzaron con un vector Ad que expresaba hTERT (Ad6-hTERT, 10^{11} pv) 2 veces con un intervalo de dos semanas. Los datos sobre peso corporal y signos clínicos se recogieron cada semana. No se observaron efectos negativos sobre el peso corporal del animal o la aparición de signos clínicos.

La respuesta inmune inducida se controló mediante ensayo ELISPOT de IFN- γ de PBMC usando combinaciones de péptidos de hTERT similares a las descritas en el EJEMPLO 7, y una combinación de péptidos que abarcaba la secuencia de LTB. Las respuestas inmunes se puntuaron positivas si la señal obtenida era al menos cuatro veces superior a la reactividad de fondo (DMSO). El análisis ELISPOT de la CMI inducida indicaba que había una respuesta inmune detectable después de los primeros 2 tratamientos con ADN-EP en cuatro de los cuatro monos vacunados (FIGURA 16A). Se observó un ligero aumento a la respuesta después del quinto ADN-EP (FIGURA 16B). La respuesta inmune también se midió al final del protocolo completo de inmunización, después de los dos refuerzos con Ad. Los resultados indican que los refuerzos con Ad inducían un aumento uniforme en la amplitud de la CMI (FIGURA 17). Por lo tanto, la potencia de una modalidad de sensibilización/refuerzo heteróloga se confirmó adicionalmente mediante este experimento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P. Angeletti S.p.A.
- 5 <120> PROTEÍNA DE FUSIÓN DE TRANSCRIPTASA INVERSA DE LA TELOMERASA, NUCLEÓTIDOS QUE LA CODIFICAN Y USOS DE LA MISMA
- <130> ITR0119Y PCT
- 10 <150> 60/851.183
<151> 12-10-2006
- <160> 23
- 15 <170> FastSEQ para windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 3783
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> TPA-hTERT(AI)-LTBopt
- 25 <400> 1

```

atggatgcaa tgaagagggg cctgtgctgc gtgctgctgc tgggtggcgc cgtgtttgtg 60
agccctagcg agatccccag agcccccaga tgcagagccg tgcggagcct gctgcggagc 120
cactaccggg aagtgtgtcc cctggccacc ttcgtgcggc ggctgggccc ccagggctgg 180
cggctgggtg agcggggcga cctgcccgc ttccgggccc tggtggtca gtgcctgggtg 240
tgcgtgccct gggacgccag accccccca gccgccccta gcttccggca ggtgagctgc 300
ctgaaggaac tgggtggccag agtgctgcag cggctgtgcg agagaggcgc caagaactgtg 360
ctggccttcg gcttcgccct gctggacggc gccagagggc gccctcccga ggcttcacc 420
acaagcgtg ggagctacct gcccaacacc gtgaccgacg cctgcgggg cagcggcgc 480
tggggcctgc tgctgagaag agtgggcgac gacgtgctgg tgacactgtt ggcccgggtg 540
gccctgttcg tgctggtggc ccccagctgc gcctaccagg tggcggccc accctgtac 600
cagctgggag ccgccaccga ggccaggccc ccaccccacg ccagcggccc cagacggaga 660
ctgggctgc agcgggctg gaaccacagc gtgagagagg ccggcgtgcc cctgggctg 720
ccagccccg ggcgcagaag aagaggcggc agcgcagacc ggagcctgcc cctgcccag 780
cggcccagaa gaggcgctgc ccccagacc gagcggacc ccgtgggcca gggcagctgg 840
gccacccccg gcagaaccag agggcccagc gaccggggct tctgcgtggt gagccccgc 900
agaccgccc agggagccac aagcctggag ggcccccga gcggcaccg cagcagacc 960
cccagctgg ccgggcagca ccacgcggga ccccagca ccagcagacc ccccagacc 1020
tgggacacc cctgcccccc tgtgtacgcc gagaccaagc acttctgta cagcagcggc 1080
gacaaggagc agctgcggcc cagcttctct ctgagcagcc tgagaccag cctgaccggc 1140
gccaggagac tgggtggagc catcttctct ggagcgggc cctggatgcc cggcaccccc 1200
cggagctgac cccggctgcc cagcgggtac ggccagatgc ggcccctgtt cctggagctg 1260
ctgggcaacc acgcccagtg cccctacggc gtgctgctga aaaccactg ccccctgaga 1320
gccgcccgtg cccccgctgc cggcgtgtgc gccagagaga agcccaggg cagcgtggcc 1380
gctcccagg agggagacac cgaccccaga gcctgggtgc agctgtctgc gacgacagc 1440
agcccttgg aggtgtacgg ctctgtgccc cctgcccaga gaaggctggt gcccctggc 1500
ctgtggggca gcagacacaa cgagcggcgg ttctgcccga acaccaagaa gttcatcagc 1560
ctggggaagc acgccaagct gagcctgcag gaactgacct ggaagatgag cgtgcgggac 1620
tgcgcctggc tgcggcggag ccctggcgtg ggctgctgct cagccgcccga gcaccggctg 1680
cgggaggaga tcttggccaa gttcctgcac tggctgatga gcgtgtactt ggtggaactg 1740
ctgaggctct tcttctactg gaccgaaacc accttcaga agaaccggtt gttcttctac 1800
cggaagagcg tgtggagcaa gctgcagagc atcggcatca ggcagcactt gaagagagtg 1860
cagctgcggc agctgagcga ggccgaagtg agacagcacc gggaggccag acctgcccctg 1920
ctgaccagcc ctgctgcggt catcccgaag cccgacggcc tgcggcccat tgcggccatg 1980
gactacgtgg tgggcgccag aaccttccgg cgggagaagc gggccgagcg gctgaccagc 2040
agagtgaagg ccctgttcag cgtgctgaac tacgagcggg ccagagagacc cggcctgctg 2100
ggcggcagcg tgctgggccc ggacgacatc caccgggccc ggccgacctt cgtgctgaga 2160
gtgcgggccc aggaccccc acccagctg tactctgta aagtggccat caccggcgc 2220
tacgacacca tccccagga ccggctgacc gaagtgatcg ccagcatcat caagccccag 2280
aacacctact gcgtgcggcg gtacgcccgt gtgcagaagg ccgcccacgg ccagctgcgg 2340
aaggccttca agagccactg gagcaccctg accgacctgc agccctacat gcggcagttc 2400
gtggcccacc tgcaggagac cagcccctg cgggatgcc tgggtatcga gcagagcagc 2460
agcctgaagc aggccagcag cggcctgttc gacgtgttcc tgcgcttcat gtgccaccac 2520
gccgtgcgga tccggggcaa gagctacgtg cagtgcagg gcacccctca gggcagcatc 2580
ctgagcacac tgctgtgctc tctgtgctac ggcgacatgg agaacaagct gttcgcggcc 2640

```

ES 2 376 010 T3

```

atccggcggg acggactgct gctgcgcctg gtggacgact tcctgctggt gaccctcac 2700
ctgaccacg ccaagacctt cctgcggacc ctggtgcggg gcgtgcccga gtacggctgt 2760
gtggtgaacc tgcgcaagac cgtggtgaac ttcccctgg aggacgaggc cctgggaggc 2820
acagccttcg tgcagatgcc cgccatggc ctgttccctt ggtgcgggct gctgctggac 2880
acccggacc tgaagtgca gagcgactac agcagctacg cccggaccag catccgggcc 2940
agcctgacat tcaaccgcg cttcaaggcc ggcagaaaca tgcggcggaa gctgtttggc 3000
gtgctgcggc tgaagtcca cagcctggtt ctggacctgc aggtgaacag cctgcagacc 3060
gtgtgcacca acatctaaa gatcctgctg ctgcaggcct accggtcca cgctgcgtg 3120
ctgcagctgc cctccatca gcagggtggt aagaacccca ccttcttct gcgctgatc 3180
tctgacaccg ccagcctgtg ctacagcatt ctgaaggcca agaacgcccg catgagcctg 3240
ggcgccaagg gcgctgccgg acccctgccc agcgaggccg tgcagtggct gtgtcaccag 3300
gcctttctgc tgaagtgac ccggcaccgc gtgacctacg tgcccctgct ggggaagcctg 3360
cggaccgccc agaccagct gagccggaag ctgcctggca ccaccctgac agcctggag 3420
gccgctgcca acccgcctt gcctagcgac ttcaagacca tcctggactc tagagcccct 3480
cagagcatca ccgagctgtg cagcgagtac cggaacacc agatttacac catcaacgac 3540
aagatcctga gctacaccga gtctatggcc ggcaagcggg agatggtgat catcacctc 3600
aagagcggcg ccaccttca ggtggaagtg cctggcagcc agcacatcga cagccagaag 3660
aaggccatcg agcggatgaa ggacaccctg cggatcacct acctgaccga gaccaagatc 3720
gacaagctgt gtgtgtggaa caacaagacc cccaacagca tcgccccat ctctatggag 3780
aac

```

<210> 2
 <211> 1267
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> -hTERT(AI)-LTBopt

10

<400> 2

ES 2 376 010 T3

Met 1	Asp	Ala	Met	Lys 5	Arg	Gly	Leu	Cys 10	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys 15	Gly
Ala	Val	Phe	Val 20	Ser	Pro	Ser	Glu	Ile 25	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Cys 30	Arg
Ala	Val	Arg 35	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser 40	His	Tyr	Arg	Glu	Val 45	Leu	Pro	Leu
Ala	Thr 50	Phe	Val	Arg	Arg	Leu 55	Gly	Pro	Gln	Gly	Trp 60	Arg	Leu	Val	Gln
Arg 65	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala 70	Phe	Arg	Ala	Leu	Val 75	Ala	Gln	Cys	Leu	Val 80
Cys	Val	Pro	Trp	Asp 85	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro 90	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe 95	Arg
Gln	Val	Ser	Cys 100	Leu	Lys	Glu	Leu	Val 105	Ala	Arg	Val	Leu	Gln	Arg 110	Leu
Cys	Glu	Arg 115	Gly	Ala	Lys	Asn	Val 120	Leu	Ala	Phe	Gly	Phe 125	Ala	Leu	Leu
Asp	Gly 130	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro 135	Pro	Glu	Ala	Phe	Thr 140	Thr	Ser	Val	Arg
Ser 145	Tyr	Leu	Pro	Asn 150	Thr	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Arg 155	Gly	Ser	Gly	Ala 160
Trp	Gly	Leu	Leu	Leu 165	Arg	Arg	Val	Gly	Asp 170	Asp	Val	Leu	Val	His 175	Leu
Leu	Ala	Arg	Cys 180	Ala	Leu	Phe	Val	Leu	Val 185	Ala	Pro	Ser	Cys 190	Ala	Tyr
Gln	Val	Cys 195	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr 200	Gln	Leu	Gly	Ala	Ala 205	Thr	Gln	Ala
Arg	Pro 210	Pro	Pro	His	Ala	Ser 215	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg 220	Leu	Gly	Cys	Glu
Arg 225	Ala	Trp	Asn	His	Ser 230	Val	Arg	Glu	Ala	Gly	Val 235	Pro	Leu	Gly	Leu 240
Pro	Ala	Pro	Gly	Ala 245	Arg	Arg	Arg	Gly	Gly 250	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser 255	Leu
Pro	Leu	Pro	Lys 260	Arg	Pro	Arg	Arg	Gly 265	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro 270	Glu	Arg
Thr	Pro	Val 275	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp 280	Ala	His	Pro	Gly	Arg 285	Thr	Arg	Gly
Pro	Ser 290	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys 295	Val	Val	Ser	Pro	Ala 300	Arg	Pro	Ala	Glu

ES 2 376 010 T3

Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His
 305 Pro Ser Val Gly Arg Gln His His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg
 310 325 335
 Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr
 340 345 350
 Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser
 355 360 365
 Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu
 370 375 380
 Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro
 385 390 395 400
 Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu
 405 410 415
 Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu
 420 425 430
 Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly
 435 440 445
 Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu
 450 455 460
 Glu Asp Thr Asp Pro Arg Leu Val Gln Leu Arg Gln His Ser
 465 470 475 480
 Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu
 485 490 495
 Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu
 500 505 510

 Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu
 530 535 540
 Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu
 545 550 555 560
 Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr
 565 570 575
 Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe
 580 585 590
 Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu
 595 600 605
 Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu
 610 615 620
 Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu
 625 630 635 640
 Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 645 650 655
 Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu
 660 665 670
 Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val
 675 680 685
 Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val
 690 695 700
 Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg
 705 710 715 720
 Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala
 725 730 735
 Ile Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val
 740 745 750
 Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr
 755 760 765
 Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys
 770 775 780
 Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe
 785 790 795 800
 Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile
 805 810 815
 Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val
 820 825 830
 Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser
 835 840 845

Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu
 850 855 860
 Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly
 865 870 875 880
 Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu
 885 890 895
 Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val
 900 905 910
 Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val
 915 920 925
 Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val
 930 935 940

 Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp
 945 950 955 960
 Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr
 965 970 975
 Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg
 980 985 990
 Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser
 995 1000 1005
 Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val
 1025 1030 1035 1040
 Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe
 1045 1050 1055
 Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys
 1060 1065 1070
 Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro
 1075 1080 1085
 Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu
 1090 1095 1100
 Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
 1105 1110 1115 1120
 Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu
 1125 1130 1135
 Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
 1140 1145 1150
 Thr Ile Leu Asp Ser Arg Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser
 1155 1160 1165
 Glu Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser
 1170 1175 1180
 Tyr Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe
 1185 1190 1195 1200
 Lys Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile
 1205 1210 1215
 Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile
 1220 1225 1230
 Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn
 1235 1240 1245
 Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Ser Glu Gln
 1250 1255 1260
 Ile Asp Asn
 1265

<210> 3
 <211> 3753
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> TPA-mTERT(AI)-LTBopt

10

<400> 3

atggatgcaa tgaagagggg cctgtgctgc gtgctgctgc tgtgtggcgc cgtgtttgtg 60
 agccctagcg agatcaccag agccccaga tgccctgccc tgagaagcct gctgaggagc 120
 cggtagacag aagtgtggcc cctggccacc tttgtgagga gactgggccc tgagggcagg 180
 agactgggtgc agcctggcga ccccaaaatc tacaggacc tggtggccca gtgtctggtg 240

tgtatgcaact ggggcagcca gccccctccc gccgacctga gcttccacca ggtgtccagc 300
 ctgaaggaac tgggtggccag agtgggtgcag agactgtgctg agcggaaacga gagaaacgtg 360
 ctggccttcg gcttcgagct gctgaacgag gccagaggcg gccctcccat ggccttcacc 420
 agctctgtga ggagctacct gcccaacacc gtgatcgaga ccctgagagt gaggcggcgc 480
 tggatgctgc tgcctgagcag agtgggcgat gacctgctgg tgtacctgct ggcccactgc 540
 gccctgtatc tgctgggtgcc ccccagctgc gcctaccagg tgtgcccgat ccccctgtac 600
 cagattttgcg ccaccaccga catctggccc agcgtgtctg ccagctacag acccaccaga 660
 cctgtgggccc ggaacttcac caacctgcgg ttcctgcagc agatcaagag cagcagcaga 720
 caggaggccc ccaagcccct ggccctgccc agcagaggca ccaagagaca cctgagcctg 780
 accagcacca gcgtgcccag cgccaagaaa gccagatgct acccctgccc tagagtggag 840
 gaggggccctc acagacaggt gctgcccacc cccagcggca agagctgggt gccagcccc 900
 gccagaagcc ccgaagtgcc caccgcccag aaggacctga gcagcaagg caaagtgagc 960
 gacctgtctc tgagcggcag cgtgtgttg aagcacaagc ccagcagcac cagcctgctg 1020
 agcccccca gacagaacgc cttccagctg aggcctttca tcgagaccg gcacttctctg 1080
 tacagcagag gcgatggcca ggagagactg aaccccagct tcctgtgag caacctgcag 1140
 cctaacctga ccggcggccag acgcctgggt gagatcatct tcctgggcag cagaccaga 1200
 accagcggcc ctctgtgcag aaccaccgg ctgagcaggc ggtactggca gatgagacc 1260
 ctgttccagc agctgctggt gaaccacgcc gagtgccagt atgtgcccgt gctgaggagc 1320
 cactgcagat tcaggaccgc caaccagcag gtgaccgacg cctgaaacac cagccccct 1380
 cacctgatgg atctgctgag gctgcacagc agcccctggc aggtgtaccg ctctctgaga 1440
 gcctgcctgt gcaaatggtt gtccgcccagc ctgtggggca ccagacacaa cgagcggcgg 1500
 ttcttaaga atctgaagaa gtatcatcagc ctgggcaagt acggcaagt gagctgcag 1560
 gaactgagtg ggaagatgaa agtggaggac tgccactggc tgagaagcag ccccggcaag 1620
 gacagagtgc ctgcccgcga gcacagactg agggagagaa tcctggccac attcctgttc 1680
 tggctgatgg acacctacgt ggtgcagctg ctgcccgtct tcttctacat caccgagagc 1740
 accttcaga agaaccggct gttcttctac cggaaagtctg tgtggagcaa gctgcagagc 1800
 atcggagtga gacagacct ggagagagt agctgagca ggagagatt ggagagattg 1860
 agacaccacc aggatacctg cctggccatg cccatctgcc ggctgagatt catccccaa 1920
 cccaacggcc tgagaccat cgtgaacatg agctacagca tgggcacaag agccctgggc 1980
 agaagaaagc agggccagca cttcaccag cggtgaaaa ccctgttctc catgctgaac 2040
 tacgagcggc ccaagcacc acacctgatg ggcagcagcg tgctgggat gaacgacatc 2100
 taccggacct ggagaccctt cgtgctgaga gtgcccggcc tggaccagac cctcggatg 2160
 tacttctgta aggcggccat caccggcggc tacgacgcca tccccaggg caaactgggtg 2220
 gaagtgggtg ccaacatgat caggcacagc gactccacct actgcatcag gcagtacgcc 2280
 gtggtgagaa gagacagcca gggccagggt cacaagagct tccggagaca ggtgaccacc 2340
 ctgagcgate tgcagcctta catgggcccag ttcctgaagc acctgcagga tagcagcgc 2400
 agcgcctga gaaatagcgt ggtgatcgag cagagcatca gcatgaacga gctccagcagc 2460
 agcctgttcg acttcttctc gcacttctct aggcacagcg tggtaagat cggcgacaga 2520
 tgctacacc agtgtcagg catccctcag ggctctagcc tgagaccct gctgtgtagc 2580
 ctgtgcttcg gcgacatgga gaataagctg ttcgcccgaag tgacagagaga tggcctgctg 2640
 ctgcccctc tggacgattt cctgctggtg accccacacc tggaccaggc caagaccctc 2700
 ctgagcacac tgggtgcagg cgtgcccag tacggctgca tgatcaatct gcagaaaacc 2760
 gtggtgaact tccctgtgga gcccgccacc ctgggcccag ccgcccctta ccagctgccc 2820
 gccactgcc tgttcccctg gtgcccactg ctgctggata cccagaccct ggaagtgttc 2880
 tgcgactaca gcggctacgc ccagaccagc atcaagacca gcctgacctt ccagagcctg 2940
 ttcaaggccc gcaagaccat gaggaacaag ctgctgagcg tgetgagact gaagtgccac 3000
 ggcctgttcc tggatctgca ggtgaacagc ctgcagaccg tgtgtatcaa catctacaag 3060
 attttctctg tgcaggccta cagattccac gcctgctgta tccagctgcc cttcgaccag 3120
 agagtgcgga agaacctgac cttcttctct gggatcatca gcagccaggc cagctgctgc 3180
 tacgccatcc tgaagtga gaaccccggc atgacctga aggccagcgg cagcttccct 3240
 cccgagcctc cccactggct gtgctaccag gccttctgc tgaagctggc cgcccacagc 3300
 gtgacttaca agtgctgct gggcccctg agaaccgccc agaagctgct gtgcccgaag 3360
 ctgcccaggg ccacctgac cattctgaaa gccgcccggc accccgccct gagcaccgac 3420
 tccagacca tcttgact tagagcccct cagagcatca ccgagctgtg cagcgagtac 3480
 cggaacccc agatttacac catcaacgac aagatcctga gctacaccga gtctatggcc 3540
 ggcaagcgg agatggtgat catcacctc aagagcggcg ggtggaagtg 3600
 cctggcagcc agcacatga cagccagaag aaggccatcg agcggatgaa ggacaccctg 3660
 cggatcacct acctgaccga gaccaagatc gacaagctgt gtgtgtggaa caacaagacc 3720
 cccaacagca tcgcccctat ctctatggag aac 3753

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> TPA-mTERT(AI)-LTBopt

<400> 4

Met	Asp	Ala	Met	Lys	Arg	Gly	Leu	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Ala	Val	Phe	Val	Ser	Pro	Ser	Glu	Ile	Thr	Arg	Ala	Pro	Arg	Cys	Pro
			20					25					30		
Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	Arg	Tyr	Arg	Glu	Val	Trp	Pro	Leu
		35					40					45			
Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Pro	Glu	Gly	Arg	Arg	Leu	Val	Gln
	50					55					60				
Pro	Gly	Asp	Pro	Lys	Ile	Tyr	Arg	Thr	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val
65					70					75					80
Cys	Met	His	Trp	Gly	Ser	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	His
				85					90					95	
Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Val	Ala	Arg	Val	Val	Gln	Arg	Leu
			100					105					110		
Cys	Glu	Arg	Asn	Glu	Arg	Asn	Val	Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu
		115					120					125			
Asn	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro	Met	Ala	Phe	Thr	Ser	Ser	Val	Arg
	130					135					140				
Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Arg	Val	Ser	Gly	Ala
145					150					155					160
Trp	Met	Leu	Leu	Leu	Ser	Arg	Val	Gly	Asp	Asp	Leu	Leu	Val	Tyr	Leu
				165					170					175	
Leu	Ala	His	Cys	Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr
			180					185					190		
Gln	Val	Cys	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Gln	Ile	Cys	Ala	Thr	Thr	Asp	Ile
		195					200					205			
Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro	Val	Gly	Arg
	210					215					220				
Asn	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln	Gln	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg
225					230					235					240
Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Arg
				245					250					255	
His	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg
			260					265					270		
Cys	Tyr	Pro	Val	Pro	Arg	Val	Glu	Glu	Gly	Pro	His	Arg	Gln	Val	Leu
		275					280					285			
Pro	Thr	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Trp	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro
	290					295					300				
Glu	Val	Pro	Thr	Ala	Glu	Lys	Asp	Leu	Ser	Ser	Lys	Gly	Lys	Val	Ser
					310					315					320
Asp	Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Cys	Cys	Lys	His	Lys	Pro	Ser	Ser
				325					330					335	
Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Pro	Arg	Gln	Asn	Ala	Phe	Gln	Leu	Arg	Pro
			340					345					350		
Phe	Ile	Glu	Thr	Arg	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Glu
		355					360					365			
Arg	Leu	Asn	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Gln	Pro	Asn	Leu	Thr
					375						380				
Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Arg
385					390					395					400
Thr	Ser	Gly	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	His	Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Tyr	Trp
				405					410					415	
Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Val	Asn	His	Ala	Glu	Cys
			420					425					430		
Gln	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	His	Cys	Arg	Phe	Arg	Thr	Ala	Asn
		435					440					445			
Gln	Gln	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	Ser	Pro	Pro	His	Leu	Met	Asp
		450				455					460				
Leu	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Arg	Arg
465					470				475						480
Ala	Cys	Leu	Cys	Lys	Val	Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Trp	Gly	Thr	Arg	His
				485					490					495	
Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Leu	Gly
			500					505					510		
Lys	Tyr	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Met	Trp	Lys	Met	Lys	Val
		515					520					525			
Glu	Asp	Cys	His	Trp	Leu	Arg	Ser	Ser	Pro	Gly	Lys	Asp	Arg	Val	Pro
	530					535					540				
Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Thr	Phe	Leu	Phe

ES 2 376 010 T3

545	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	550	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	555	Leu	Arg	Ser	Phe	Phe	560	Tyr
	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	565	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	570	Leu	Phe	Phe	Tyr	Arg	Lys	
	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	580	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	585	Val	Arg	Gln	His	Leu	Glu	
	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	595	Glu	Leu	Ser	Gln	Glu	600	Glu	Val	Arg	His	His	Gln	
	Asp	Thr	Trp	Leu	Ala	610	Met	Pro	Ile	Cys	Arg	615	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys	
	Pro	Asn	Gly	Leu	Arg	625	Pro	Ile	Val	Asn	Met	630	Ser	Tyr	Ser	Met	Gly	Thr	
	Arg	Ala	Leu	Gly	Arg	645	Arg	Lys	Gln	Ala	Gln	650	His	Phe	Thr	Gln	Arg	Leu	
	Lys	Thr	Leu	Phe	Ser	660	Met	Leu	Asn	Tyr	Glu	665	Arg	Thr	Lys	His	Pro	His	
	Leu	Met	Gly	Ser	Ser	675	Val	Leu	Gly	Met	Asn	680	Asp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Trp	
	Arg	Ala	Phe	Val	Leu	690	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	695	Asp	Gln	Thr	Pro	Arg	Met	
	Tyr	Phe	Val	Lys	Ala	705	Ala	Ile	Thr	Gly	Ala	710	Tyr	Asp	Ala	Ile	Pro	Gln	
	Gly	Lys	Leu	Val	Glu	725	Val	Val	Ala	Asn	Met	730	Ile	Arg	His	Ser	Glu	Ser	
	Thr	Tyr	Cys	Ile	Arg	740	Gln	Tyr	Ala	Val	Val	745	Arg	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	
	Gln	Val	His	Lys	Ser	755	Phe	Arg	Arg	Gln	Val	760	Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Leu	
	Gln	Pro	Tyr	Met	Gly	770	Gln	Phe	Leu	Lys	His	775	Leu	Gln	Asp	Ser	Asp	Ala	
	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	785	Ser	Val	Val	Ile	Glu	790	Gln	Ser	Ile	Ser	Met	Asn	
	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	805	Leu	Phe	Asp	Phe	Phe	810	Leu	His	Phe	Leu	Arg	His	
	Ser	Val	Val	Lys	Ile	820	Gly	Asp	Arg	Cys	Tyr	825	Thr	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	
	Pro	Gln	Gly	Ser	Ser	835	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	840	Cys	Ser	Leu	Cys	Phe	Gly	
	Asp	Met	Glu	Asn	Lys	850	Leu	Phe	Ala	Glu	Val	855	Gln	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	
	Leu	Arg	Phe	Val	Asp	865	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	870	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Gln	
	Ala	Lys	Thr	Phe	Leu	885	Ser	Thr	Leu	Val	His	890	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	
	Cys	Met	Ile	Asn	Leu	900	Gln	Lys	Thr	Val	Val	905	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Pro	
	Gly	Thr	Leu	Gly	Gly	915	Ala	Ala	Pro	Tyr	Gln	920	Leu	Pro	Ala	His	Cys	Leu	
	Phe	Pro	Trp	Cys	Gly	930	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	935	Gln	Thr	Leu	Glu	Val	Phe	
	Cys	Asp	Tyr	Ser	Gly	945	Tyr	Ala	Gln	Thr	Ser	950	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	Thr	
	Phe	Gln	Ser	Val	Phe	965	Lys	Ala	Gly	Lys	Thr	970	Met	Arg	Asn	Lys	Leu	Leu	
	Ser	Val	Leu	Arg	Leu	980	Lys	Cys	His	Gly	Leu	985	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	
	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	995	Val	Cys	Ile	Asn	Ile	1000	Tyr	Lys	Ile	Phe	Leu	Leu	
	Gln	Ala	Tyr	Arg	Phe	1010	His	Ala	Cys	Val	Ile	1015	Gln	Leu	Pro	Phe	Asp	Gln	
	Arg	Val	Arg	Lys	Asn	1025	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	1030	Gly	Ile	Ile	Ser	Ser	Gln	
	Ala	Ser	Cys	Cys	Tyr	1045	Ala	Ile	Leu	Lys	Val	1050	Lys	Asn	Pro	Gly	Met	Thr	
	Leu	Lys	Ala	Ser	Gly	1060	Ser	Phe	Pro	Pro	Glu	1065	Ala	Ala	His	Trp	Leu	Cys	
	Tyr	Gln	Ala	Phe	Leu	1075	Leu	Lys	Leu	Ala	Ala	1080	His	Ser	Val	Ile	Tyr	Lys	

ES 2 376 010 T3

```

      1090                1095                1100
Cys Leu Leu Gly Pro Leu Arg Thr Ala Gln Lys Leu Leu Cys Arg Lys
1105                1110                1115                1120
Leu Pro Glu Ala Thr Met Thr Ile Leu Lys Ala Ala Ala Asp Pro Ala
      1125                1130                1135
Leu Ser Thr Asp Phe Gln Thr Ile Leu Asp Ser Arg Ala Pro Gln Ser
      1140                1145                1150
Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile
      1155                1160                1165
Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu
      1170                1175                1180

Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val
1185                1190                1195                1200
Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met
      1205                1210                1215
Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys
      1220                1225                1230
Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser
      1235                1240                1245
Met Glu Asn
      1250

```

- <210> 5
- <211> 3711
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> hTERT(AI)-LTBopt

- <400> 5

cccagagccc	ccagatgcag	agccctgctgc	ggagccacta	ccgggaagtg	60
ctgccccctg	ccaccttcgt	gccccccagg	gctggcggct	ggtgcagcgg	120
ggcagaccctg	ccgccttccg	gctcagtgcc	tggtgtgcgt	gccctgggac	180
gccagacccc	ccccagccgc	cggcaggtga	gctgcctgaa	ggaactggtg	240
gccagagtgc	tgacgcggct	ggcgcgaaga	acgtgctggc	cttcggcttc	300
gccctgctgg	acggcgccag	cccagggcct	tcaccacaag	cgtgcggagc	360
tacctgcccc	acaccgtgac	cgagccctg	cggggcagcg	gcgcctgggg	420
agaagagtgg	gcgacgacgt	gctggtgcac	ctgctggccc	ggtgcgccct	480
gtggccccca	gctgcgccta	ccaggtgtgc	ggcccccccc	tgtaccagct	540
accagggcca	ggccccccacc	ccacgccagc	ggccccagac	ggagactggg	600
gcctggaacc	acagcgtgag	agaggccggc	gtgccccctg	gcctgccagc	660
agaagaagag	gcggcagcgc	cagcccggagc	ctgccccctg	ccaagcggcc	720
gctgcccccg	agcccgagcg	gacccccgtg	ggcaggggca	gctgggcccc	780
accagaggcc	ccagcgaccg	gggcttctgc	gtggtgagcc	ccgccagacc	840
gccacaagcc	tggagggcgc	cctgagcggc	accgggcaca	gccaccccag	900
cagcaccacg	ccggaccccc	cagcaccagc	agacccccca	gaccctggga	960
ccccctgtgt	acgcccagac	caagcacttc	ctgtacagca	gcggcgacaa	1020
cgccccagct	tcctgctgag	cagcctgaga	cccagcctga	ccggcgccag	1080
gagaccatct	tcctgggcag	ccggccctgg	atgcccggca	ccccccggag	1140
ctgccccagc	ggtactggca	gatgcggccc	ctgttccctg	agctgctggg	1200
cagtgcacct	acggcgtgct	gctgaaaacc	cactgcccc	tgagagccgc	1260
gctgcggcg	tgtgcgccag	agagaagccc	cagggcagcg	tggccgctcc	1320
gacaccgacc	ccagacgcct	ggtgcagctg	ctgcggcagc	acagcagccc	1380
tacggcttcg	tgccggcctg	cctgagaagg	ctggtgcccc	ctggcctgtg	1440
cacaacgagc	ggcggttcct	gcggaacacc	aagaagtcca	tcagcctggg	1500
aagctgagcc	tgcaaggaact	gacctggaag	atgagcgtgc	gggactgcgc	1560
cgagaccctg	gcgtgggctg	cgtgccagcc	gcccagcacc	ggctgcggga	1620
gccaaattcc	tgcactggct	gatgagcgtg	tacgtggtgg	aactgctgcg	1680
tacgtgaccg	aaaccacctt	ccagaagaac	cggtgttctt	tctaccggaa	1740
agcaagctgc	agagcatcgg	catcaggcag	cacctgaaga	gagtgcagct	1800
agcgaggccc	aagtgcagca	gcaccgggag	gccagaccctg	ccctgctgac	1860
cggttcatcc	ccaagcccga	cgccctgcgg	cccacgtgta	acatggacta	1920
gccagaacct	tccggcggga	gaagcgggccc	gagcggctga	ccagcagagt	1980
ttcagcgtgc	tgaactacga	gccccccagg	agaccggccc	tgttgggcgc	2040
ggcctggacg	acatccaccg	ggcctggcgg	accttcgtgc	tgagagtgcg	2100
ccccaccgcc	agctgtactt	cgtgaaagtg	gccatccacc	gcgcctacga	2160
caggaccggc	tgaccgaagt	gatgccccagc	atcatcaagc	cccagaacac	2220

cgccggtagc	ccgtggtgca	gaaggccgcc	cacggccacg	tgcggaaggg	cttcaagagc	2280
cacgtgagca	ccctgaccga	cctgcagccc	tacatgcggc	agttcgtggc	ccacctgcag	2340
gagaccagcc	ccctgcggga	tgccgtggtg	atcgagcaga	gcagcagcct	gaaccgagggc	2400
agcagcggcc	tgtttcgacgt	gttctgcgc	ttcatgtgcc	accacgcctg	gcggatcccg	2460
ggcaagagct	acgtgcagtg	ccagggcatc	cctcagggca	gcacactgag	caactgctg	2520
tgcttctgtg	gctacggcga	catggagaac	aagctgttcg	ccggcatccg	gcgggacgga	2580
ctgctgctgc	gcctggtgga	cgacttctg	ctggtgaccc	ctcacctgac	ccacgccaag	2640
accttctctg	ggaccctggt	gccccggcgtg	cccaggtacg	gctgtgtggt	gaacctgcgc	2700
aagaccgtgg	tgaacttccc	cgtggaggac	gaggccctgg	gcggcacagc	cttcgtgcag	2760
atgcccggcc	atggcctggt	cccttgggtg	gggctgctgc	tggacaccgg	gacctggaa	2820
gtgcagagcg	actacagcag	ctacgcccgg	accagcatcc	gggcccagcct	gacattcaac	2880
cgcggttca	aggccggcag	aaacatgcgg	cggaaagctgt	ttggcgtgct	gcggctgaag	2940
tgccacagcc	tgtttctgga	cctgcaggtg	aacagcctgc	agaccgtgtg	caccaacatc	3000
tacaagatcc	tgctgctgca	ggcctaccgg	ttccacgcct	gcgtgctgca	gctgcccttc	3060
catcagcagg	tgtggaagaa	ccccaccttc	ttcctgcggc	tgatctctga	caccgccagc	3120
ctgtgctaca	gcattctgaa	ggccaagaac	gccggcatga	gcctgggcgc	caagggcgct	3180
gccggacccc	tgcccagcga	ggcctgagc	tggtgtgtgc	accaggcctt	tctgtgaag	3240
ctgacccggc	accgcgtgac	ctacgtgccc	ctgctgggaa	gcctgcggac	cgcccagacc	3300
cagctgagcc	ggaagctgcc	tggcaccacc	ctgacagccc	tggaggccgc	tgccaacccc	3360
gcctgcctca	gcgacttcaa	gaccatcctg	gactctagag	cccctcagag	catcaccgag	3420
ctgtgcagcg	agtaccggaa	caccagatt	tacaccatca	acgacaagat	cctgagctac	3480
accgagtcta	tggccggcaa	gccccgagatg	gtgatcatca	ccttcaagag	cgccgccacc	3540
tttcaggtgg	aagtgcctgg	cagccagcac	atcgacagcc	agaagaaggg	catcgagcgg	3600
atgaaggaca	ccctgcggat	cacctaccctg	accgagacca	agatcgacaa	gctgtgtgtg	3660
tggaacaaca	agacccccaa	cagcatcgcc	gccatctcta	tggagaactg	a	3711

ES 2 376 010 T3

<211> 1236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> hTERT(AI)-LTBopt

<400> 6

```

Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser His
 1      5      10     15     20     25     30     35     40     45     50     55     60     65     70     75     80
Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly Pro
      20     25     30     35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90     95
Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala
      35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90     95     100    105    110
Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro Pro
      50     55     60     65     70     75     80     85     90     95     100    105    110    115    120    125
Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu Val
      65     70     75     80     85     90     95     100    105    110    115    120    125    130    135    140
Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val Leu
      85     90     95     100    105    110    115    120    125    130    135    140    145    150    155    160
Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro Glu
      100    105    110    115    120    125    130    135    140    145    150    155    160    165    170    175
Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr Asp
      115    120    125    130    135    140    145    150    155    160    165    170    175    180    185    190
Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val Gly
      130    135    140    145    150    155    160    165    170    175    180    185    190    195    200    205
Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val Leu
      145    150    155    160    165    170    175    180    185    190    195    200    205    210    215    220
Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr Gln
      165    170    175    180    185    190    195    200    205    210    215    220    225    230    235    240
Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly Pro
      180    185    190    195    200    205    210    215    220    225    230    235    240    245    250    255
Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg Glu
      195    200    205    210    215    220    225    230    235    240    245    250    255    260    265    270
Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg Gly
      210    215    220    225    230    235    240    245    250    255    260    265    270    275    280    285
Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg Gly
      225    230    235    240    245    250    255    260    265    270    275    280    285    290    295    300
Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp Ala
      245    250    255    260    265    270    275    280    285    290    295    300    305    310    315    320
His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val Val
      260    265    270    275    280    285    290    295    300    305    310    315    320    325    330    335
    
```

10

Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Leu
 275 280 285
 Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His Ala
 290 295 300
 Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro Cys
 305 310 315 320
 Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly Asp
 325 330 335
 Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser
 340 345 350
 Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser Arg
 355 360 365
 Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln Arg
 370 375 380
 Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His Ala
 385 390 395 400
 Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg Ala
 405 410 415
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln Gly
 420 425 430
 Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu Val
 435 440 445
 Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe Val
 450 455 460
 Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser Arg
 465 470 475 480
 His Asn Gln Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser Leu
 485 490 495
 Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met Ser
 500 505 510
 Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys Val
 515 520 525
 Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe Leu
 530 535 540
 His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe Phe
 545 550 555 560
 Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg
 565 570 575

 Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu
 580 585 590
 Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His
 595 600 605
 Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 610 615 620
 Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly
 625 630 635 640
 Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg
 645 650 655
 Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro
 660 665 670
 Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala
 675 680 685
 Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu
 690 695 700
 Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala Ile Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro
 705 710 715 720
 Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn
 725 730 735
 Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly
 740 745 750
 His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp Leu
 755 760 765
 Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro
 770 775 780
 Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala
 785 790 795 800
 Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala
 805 810 815

Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln
 820 825 830
 Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met
 835 840 845
 Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Arg
 850 855 860
 Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys
 865 870 875 880
 Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val
 885 890 895
 Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala
 900 905 910
 Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro
 915 920 925
 Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp
 930 935 940
 Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn
 945 950 955 960
 Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val
 965 970 975
 Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser
 980 985 990
 Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Gln Ala
 995 1000 1005

 Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val
 1010 1015 1020
 Trp Lys Asn Pro Thr Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser
 1025 1030 1035 1040
 Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly
 1045 1050 1055
 Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu
 1060 1065 1070
 Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr
 1075 1080 1085
 Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg
 1090 1095 1100
 Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Asn Pro
 1105 1110 1115 1120
 Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp Ser Arg Ala Pro Gln
 1125 1130 1135
 Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr
 1140 1145 1150
 Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg
 1155 1160 1165
 Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu
 1170 1175 1180
 Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg
 1185 1190 1195 1200
 Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp
 1205 1210 1215
 Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile
 1220 1225 1230
 Ser Met Glu Asn
 1235

<210> 7
 <211> 3681
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> mTERT(AI)-LTBopt

10

<400> 7

accagagccc ccagatgccc tgcctgaga agcctgtgctg ggagccggtg cagagaagtg 60
 tggcccctgg ccacctttgt gaggagactg ggccctgagg gcaggagact ggtgcagcct 120
 ggcgacccca aatctacag gaccctggtg gccaggtgct tgggtgtgat gcactggggc 180
 agccagcccc ctcccgcga cctgagcttc caccaggtgt ccagcctgaa ggaactggtg 240

gccagagtgg tgcagagact gtgagagcgg aacgagagaa acgtgctggc cttcggcttc 300
 gagctgctga acgaggccag agggggccct cccatggcct tcaccagctc tgtgaggagc 360
 tacctgcccac acaccgtgat cgagaccctg agagtggagc gcgcctggat gctgtgctg 420
 agcagagtgg acgatgacct gctggtgtac ctgctggccc actgcccctt gtatctgctg 480
 gtgccccca gctgcgcta ccaggtgtgc ggatcccccc tgtaccagat ttgcgccacc 540
 accgacatct ggcccagcgt gtctgcccagc tacagaccca ccagacctgt gggccggaac 600
 ttaccaaac tgcggttctt gcagcagatc aagagcagca gcagacagga ggcccccaag 660
 cccctggccc tccccagcag aggcaccaag agacacctga gcctgaccag caccagcgtg 720
 cccagcggca agaaagccag atgtaccctt gtgcctagag tggaggaggg cctcacaga 780
 caggtgctgc ccacccccag cggcaagagc tgggtgccc a gccccgccag aagccccgaa 840
 gtgcccaccg ccgagaagga cctgagcagc aagggcaaaag tgagcgacct gtctctgagc 900
 ggcagcgtgt gttgcaagca caagcccagc agcaccagcc tgctgagccc cccagacag 960
 aacgccttcc agctgaggcc tttcatcgag acccggcact tcctgtacag cagaggcgtg 1020
 ggccaggaga gactgaacct cagcttctct ctgagcaacc tgcagcctaa cctgaccggc 1080
 gccagacgcc tgggtggagat catcttctct ggcagcagac ccagaaccag cggcctctg 1140
 tgcagaaccc accggctgag caggcggctac tggcagatga gaccctgtt ccagcagctg 1200
 ctggtgaacc acgcccagtg ccagtatgtg cggctgctga ggagccactg cagattcagg 1260
 accgccaacc acagagtgac cgacgccctg aacaccagcc cccctacct gatggatctg 1320
 ctgaggctgc acagcagccc ctggcaggtg tacggcttcc tgagagcctg cctgtgcaaa 1380
 gtggtgtccg ccagcctgtg gggcaccaga cacacagagc ggcggttctt caagaatctg 1440
 aagaagtca tcagcctggg caagtacggc aagctgagcc tgcaggaact gatgtggaag 1500
 atgaaagtgg aggactgcca ctggctgaga agcagcccc gcaaggacag agtgccctgc 1560
 gccgagcaca gactgagga ggaatctct ggcacattcc tgttctggct gatggacacc 1620
 tacgtggtgc agctgctgcg gtccttcttc tacatcaccg agagcacctt ccagaagaac 1680
 cggctgttct tctaccggaa gtctgtgtgg agcaagctgc agagcatcgg agtgagacag 1740
 cacctggaga gactgaggct gagagagctg agccaggagg aagtgagaca ccaccaggat 1800
 acctggctgg ccattgcccatt ctgcccgtg aatattatcc ccaagcccaa cggcctgaga 1860
 cccatcgtga acatgagcta cagctggggc acaagagccc tgggcagaag aaagcaggcc 1920
 cagcacttca cccagcggct gaaaacctg ttctccatgc tgaactacga gcggaccaag 1980
 caccacacc tgatgggagc cagcgtgctg ggcataagc acatctaccg gacctggaga 2040
 gccttcgtgc tgagagtggc ggccctggac cagaccctc ggatgtactt cgtgaaggcc 2100
 gccatcaccg gcgcttacga cgcctcccc cagggcaaac tgggtggaag ggtggccaac 2160
 atgatcaggc acagcgagtc cacctactgc atcaggcagt acgcccgtgt gatgaagagac 2220
 agccagggcc aggtgcacaa gagcttccgg agacaggtga ccacctgag cgtatgagac 2280
 ccttacatgg gccagttcct gaagcactg caggatagcg acgccagcgc cctgagaaat 2340
 agcgtggtga tcgagcagag catcagcatg aacgagtcca gcagcagcct gttcagctt 2400
 ttctgcatc tctgaggca cagcgtgggt caccgtggcg acagatgcta caccagctt 2460
 cagggcatcc ctcagggtc tagcctgagc aacctgctgt gtagcctgtg cttcggcgac 2520
 atggagaata agctgttcgc cgaagtgcag agagatggcc tgctgctgag cttcgtggac 2580
 gatttctgct tgggtgacccc acacctggac caggccaaga ccttctctgag cacactgggtg 2640
 cacggcgtgc ccgagtacgg ctgcatgatc aatctgcaga aaaccgtggt gaacttccct 2700
 gtggagcccg gcaccctggg cggagccgcc ccttaccagc tgcccggcca ctgctgtttc 2760
 cctggtgagc gactgctgct ggatacccag accctggaag tgttctgca ctacagcggc 2820
 tacgcccaga ccagcatcaa gaccagcctg acctccaga gcgtgttcaa ggccggcaag 2880
 accatgagga acaagctgct gagcgtgctg agactgaagt gccacggcct gttcctggat 2940
 ctgaggtga acagcctgca gaccgtgtgt atcaacatct acaagatctt cctgctgagc 3000
 gcctacagat tccacgcctg cgtgatccag ctgccccttcg accagagagt gcggaagaac 3060
 ctgaccttct tctggggat catcagcagc caggccagct gctgctacgc catctgaaa 3120
 gtgaagaacc ccggcatgac cctgaaggcc agcggcagct tccctcccga ggccgcccac 3180
 tggctgtgct ccaggcctt tctgctgaag ctggccgccc acagcgtgat ctacaagtgc 3240
 ctgctggggc cctgagaac cgcccagaag cctctgtgcc ggaagctgcc cgaggccacc 3300
 atgaccattc tgaaagccgc cgccgacccc gcctgagca cggacttcca gaccatcctg 3360
 gactctagag cccctcagag catcaccgag ctgtgcagcg agtaccgaa caccagatt 3420
 tacaccatca acgacaagat cctgagctac accgagtcta tggccggcaa gcgggagatg 3480
 gtgatcatca cctcaagag cggcgcacc tttcaggtgg aagtgcctgg cagccagcac 3540
 atcgacagc agaagaaggc catcgagcgg atgaaggaca ccctgcccag cacctacctg 3600
 accgaccca agatcgacaa gctgtgtgtg tggaaacaaca agaccccaa cagcatcgcc 3660
 gccatctcta tggagaactg a 3681

ES 2 376 010 T3

<211> 1232
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> mTERT(AI)-LTBopt

<400> 8

Thr Arg Ala Pro Arg Cys Pro Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser Arg

10

1				5					10					15		
Tyr	Arg	Glu	Val	Trp	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Pro	
			20					25					30			
Glu	Gly	Arg	Arg	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asp	Pro	Lys	Ile	Tyr	Arg	Thr	
		35					40					45				
Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Met	His	Trp	Gly	Ser	Gln	Pro	Pro	
		50				55					60					
Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	His	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Val	
65					70					75				80		
Ala	Arg	Val	Val	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Arg	Asn	Glu	Arg	Asn	Val	Leu	
				85					90				95			
Ala	Phe	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro	Met	
			100					105					110			
Ala	Phe	Thr	Ser	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Ile	Glu	
		115					120					125				
Thr	Leu	Arg	Val	Ser	Gly	Ala	Trp	Met	Leu	Leu	Leu	Ser	Arg	Val	Gly	
		130				135						140				
Asp	Asp	Leu	Leu	Val	Tyr	Leu	Leu	Ala	His	Cys	Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu	
145					150					155				160		
Val	Pro	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Ser	Pro	Leu	Tyr	Gln	
				165					170					175		
Ile	Cys	Ala	Thr	Thr	Asp	Ile	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	
			180					185					190			
Pro	Thr	Arg	Pro	Val	Gly	Arg	Asn	Phe	Thr	Asn	Leu	Arg	Phe	Leu	Gln	
		195					200					205				
Gln	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Arg	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ala	Leu	
	210					215					220					
Pro	Ser	Arg	Gly	Thr	Lys	Arg	His	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Val	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	Ala	Arg	Cys	Tyr	Pro	Val	Pro	Arg	Val	Glu	Glu	
				245					250					255		
Gly	Pro	His	Arg	Gln	Val	Leu	Pro	Thr	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Trp	Val	
			260					265					270			
Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Pro	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	Glu	Lys	Asp	Leu	
		275					280					285				
Ser	Ser	Lys	Gly	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Cys	
		290				295					300					
Cys	Lys	His	Lys	Pro	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Pro	Arg	Gln	
305					310					315					320	
Asn	Ala	Phe	Gln	Leu	Arg	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr	Arg	His	Phe	Leu	Tyr	
				325					330				335			
Ser	Arg	Gly	Asp	Gly	Gln	Glu	Arg	Leu	Asn	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	
			340					345					350			
Asn	Leu	Gln	Pro	Asn	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Ile	Ile	
		355					360					365				
Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Arg	Thr	Ser	Gly	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	His	
		370				375					380					
Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Gln	Gln	Leu	
385					390					395					400	
Leu	Val	Asn	His	Ala	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	His	
				405					410					415		
Cys	Arg	Phe	Arg	Thr	Ala	Asn	Gln	Gln	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	
			420					425					430			
Ser	Pro	Pro	His	Leu	Met	Asp	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Ser	Pro	Trp	
		435					440					445				
Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Arg	Ala	Cys	Leu	Cys	Lys	Val	Val	Ser	Ala	
						455					460					
Ser	Leu	Trp	Gly	Thr	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Phe	Lys	Asn	Leu	
465					470					475					480	
Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Leu	Gly	Lys	Tyr	Gly	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	
				485					490					495		
Leu	Met	Trp	Lys	Met	Lys	Val	Glu	Asp	Cys	His	Trp	Leu	Arg	Ser	Ser	
				500				505					510			
Pro	Gly	Lys	Asp	Arg	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Arg	
		515					520					525				
Ile	Leu	Ala	Thr	Phe	Leu	Phe	Trp	Leu	Met	Asp	Thr	Tyr	Val	Val	Gln	
	530					535					540					
Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	Phe	Tyr	Ile	Thr	Glu	Ser	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	

545	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	550	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	555	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	560	Ile
	Gly	Val	Arg	Gln	His	565	Leu	Glu	Arg	Val	Arg	570	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	575	Gln
	Glu	Glu	Val	Arg	His	580	His	Gln	Asp	Thr	Trp	585	Leu	Ala	Met	590	Pro	Ile	Cys
	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	595	Pro	Lys	Pro	Asn	Gly	600	Leu	Arg	Pro	605	Ile	Val	Asn
	Met	Ser	Tyr	Ser	Met	610	Gly	Thr	Arg	Ala	Leu	615	Gly	Arg	Arg	620	Lys	Gln	Ala
	625	Gln	His	Phe	Thr	630	Gln	Arg	Leu	Lys	Thr	635	Leu	Phe	Ser	640	Met	Leu	Asn
	Glu	Arg	Thr	Lys	His	645	Pro	His	Leu	Met	Gly	650	Ser	Ser	Val	655	Leu	Gly	Met
	Asn	Asp	Ile	Tyr	Arg	660	Thr	Trp	Arg	Ala	Phe	665	Val	Leu	Arg	670	Val	Arg	Ala
	Leu	Asp	Gln	Thr	Pro	675	Arg	Met	Tyr	Phe	Val	680	Lys	Ala	Ala	685	Ile	Thr	Gly
	Ala	Tyr	Asp	Ala	Ile	690	Pro	Gln	Gly	Lys	Leu	695	Val	Glu	Val	700	Val	Ala	Asn
	705	Met	Ile	Arg	His	710	Ser	Glu	Ser	Thr	Tyr	715	Cys	Ile	Arg	720	Gln	Tyr	Ala
	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	725	Gln	Gly	Gln	Val	His	730	Lys	Ser	Phe	735	Arg	Arg	Gln
	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	740	Asp	Leu	Gln	Pro	Tyr	745	Met	Gly	Gln	750	Phe	Leu	Lys
	His	Leu	Gln	Asp	Ser	755	Asp	Ala	Ser	Ala	Leu	760	Arg	Asn	Ser	765	Val	Val	Ile
	Glu	Gln	Ser	Ile	Ser	770	Met	Asn	Glu	Ser	Ser	775	Ser	Ser	Leu	780	Phe	Asp	Phe
	785	Phe	Leu	His	Phe	790	Arg	His	Ser	Val	Val	795	Lys	Ile	Gly	800	Asp	Arg	Cys
	Tyr	Thr	Gln	Cys	Gln	805	Gly	Ile	Pro	Gln	Gly	810	Ser	Ser	Leu	815	Ser	Thr	Leu
	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	820	Phe	Gly	Asp	Met	Glu	825	Asn	Lys	Leu	830	Phe	Ala	Glu
	Val	Gln	Arg	Asp	Gly	835	Leu	Leu	Leu	Arg	Phe	840	Val	Asp	Asp	845	Phe	Leu	Leu
	Val	Thr	Pro	His	Leu	850	Asp	Gln	Ala	Lys	Thr	855	Phe	Leu	Ser	860	Thr	Leu	Val
	His	Gly	Val	Pro	Glu	865	Tyr	Gly	Cys	Met	Ile	870	Asn	Leu	Gln	875	Lys	Thr	Val
	Val	Asn	Phe	Pro	Val	885	Glu	Pro	Gly	Thr	Leu	890	Gly	Gly	Ala	895	Ala	Pro	Tyr
	Gln	Leu	Pro	Ala	His	900	Cys	Leu	Phe	Pro	Trp	905	Cys	Gly	Leu	910	Leu	Leu	Asp
	Thr	Gln	Thr	Leu	Glu	915	Val	Phe	Cys	Asp	Tyr	920	Ser	Gly	Tyr	925	Ala	Gln	Thr
	Ser	Ile	Lys	Thr	Ser	930	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	935	Val	Phe	Lys	940	Ala	Gly	Lys
	945	Thr	Met	Arg	Asn	950	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	955	Arg	Leu	Lys	960	Cys	His	Gly
	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	965	Gln	Val	Asn	Ser	Leu	970	Gln	Thr	Val	975	Cys	Ile	Asn
	Ile	Tyr	Lys	Ile	Phe	980	Leu	Leu	Gln	Ala	Tyr	985	Arg	Phe	His	990	Ala	Cys	Val
	Ile	Gln	Leu	Pro	Phe	995	Asp	Gln	Arg	Val	Arg	1000	Lys	Asn	Leu	1005	Thr	Phe	Phe
	Leu	Gly	Ile	Ile	Ser	1010	Ser	Gln	Ala	Ser	Cys	1015	Cys	Tyr	Ala	1020	Ile	Leu	Lys
	1025	Val	Lys	Asn	Pro	1030	Met	Thr	Leu	Lys	Ala	1035	Ser	Gly	Ser	1040	Phe	Pro	Pro
	Glu	Ala	Ala	His	Trp	1045	Leu	Cys	Tyr	Gln	Ala	1050	Phe	Leu	Leu	1055	Lys	Leu	Ala
	Ala	His	Ser	Val	Ile	1060	Tyr	Lys	Cys	Leu	Leu	1065	Gly	Pro	Leu	1070	Arg	Thr	Ala
	Gln	Lys	Leu	Leu	Cys	1075	Arg	Lys	Leu	Pro	Glu	1080	Ala	Thr	Met	1085	Thr	Ile	Leu

ES 2 376 010 T3

```

      1090              1095              1100
Lys Ala Ala Ala Asp Pro Ala Leu Ser Thr Asp Phe Gln Thr Ile Leu
1105              1110              1115              1120
Asp Ser Arg Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg
      1125              1130              1135
Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu
      1140              1145              1150
Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly
      1155              1160              1165
Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln
      1170              1175              1180
Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu
1185              1190              1195              1200
Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro
      1205              1210              1215
Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Ser Glu Gln Ile Asp Asn
      1220              1225              1230

```

<210> 9
 <211> 3393
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> hTERT(AI)

10

<400> 9

cccagagccc	ccagatgcag	agccctgctgc	ggagccacta	ccgggaagtg	60
ctgcccctgg	ccaccttcgt	gcgccgctg	ggccccaggg	ggtgcagcgg	120
ggcgaccctg	ccgccttccg	ggccctgggtg	gctcagtgcc	tggtgtgctg	180
gccagacccc	ccccagccgc	ccctagcttc	cggcaggtga	gctgcctgaa	240
gccagagtgc	tgcagcggct	gtgcgagaga	ggcgccaaga	acgtgctggc	300
gccctgctgg	acggcgccag	agggggccct	cccagggcct	tcaccacaag	360
tacctgcccc	acaccgtgac	cgacgccctg	cggggcagcg	gcgcctgggg	420
agaagagtgg	gcgacgacgt	gctgggtgac	ctgctggccc	gggtgcgccct	480
gtggccccc	gctgcgccta	ccaggtgtgc	ggcccccccc	tgtaccagct	540
accagggcca	ggccccccacc	ccacgcctagc	ggccccagac	ggagactggg	600
gcctggaacc	acagcgtgag	agaggccggc	gtgcccctgg	gcctgcccagc	660
agaagaagag	gcggcagcgc	cagccggagc	ctgcccctgc	ccaagcggcc	720
gctgcccccg	agcccgagcg	gacccccgtg	ggccagggca	gctgggcccc	780
accagaggcc	ccagcagaccg	gggcttctgc	gtggtgagcc	ccgcccagacc	840
gccacaagcc	tggagggcgc	cctgagcggc	acccggcaca	gccaccccag	900
cagcaccacg	ccggaccccc	cagcaccagc	agacccccca	gacccctggg	960
ccccctgtgt	acgccgagac	caagcacttc	ctgtacagca	gcggcgacaa	1020
cggcccagct	tcctgctgag	cagcctgaga	cccagcctga	ccggcgccag	1080
gagaccatct	tcctgggagc	ccggccctgg	atgcccggca	ccccccggag	1140
ctgccccagc	ggtaactggca	gatgcccggc	ctgttcctgg	agctgctggg	1200
cagtggccct	acggcgtgct	gctgaaaacc	cactgcccc	tgagagccgc	1260
gctgcccggc	tgtgcgccag	agagaagccc	cagggcagcg	tggccgctcc	1320
gacaccgacc	ccagacgcct	ggtgcagctg	ctgcccagc	acagcagccc	1380
tacggcttcg	tgcgggcctg	cctgagaagg	ctggtgcccc	ctggcctgtg	1440
cacaacgagc	ggcggttcct	gcggaacacc	aagaagtcca	tcagcctggg	1500
aagctgagcc	tgcaggaact	gacctggaag	atgagcgtgc	gggactgccc	1560
cggagccctg	gcgtgggctg	cgtgccagcc	gccgagcacc	ggctgcggga	1620
gccaaagtcc	tgcactggct	gatgagcgtg	tacgtgggtg	aactgctgcg	1680
tacgtgaccg	aaaccacctt	ccagaagaac	cggctgttct	tctaccggaa	1740
agcaagctgc	agagcatcgg	catcaggcag	cacctgaaga	gagtgcagct	1800
agcagggccg	aagtgagaca	gcaccgggag	gccagacctg	ccctgctgac	1860
cggttcatcc	ccaagcccga	cggcctgccc	cccacgtgga	acatggacta	1920
gccagaacct	tccggcggga	gaagcgggcc	gagcggctga	ccagcagagt	1980
ttcagcgtgc	tgaactacga	gcccggccag	agaccggccc	tgctgggccc	2040
ggcctggagc	acatccaccg	ggcctggcgg	accttcgtgc	tgagagtggc	2100
ccccaccctg	agctgtactt	cgtgaaagtg	gccatcaccg	gcgcctacga	2160
caggaccggc	tgaccgaagt	gatcggcagc	atcatcaagc	cccagaacac	2220
cggcggtagc	ccgtgggtgca	gaaggccgcc	cacggccacg	tgcggaaggc	2280
cacgtgagca	ccctgaccga	cctgcagccc	tacatgcggc	agttcgtggc	2340
gagaccagcc	ccctgcccga	tgcctgggtg	ttcagagcaga	gcagcagcct	2400
agcagcggcc	gtttcagcgt	gttctgccc	atcatgtgcc	accacgccc	2460
ggcaagagct	acgtgcagtg	ccagggcatc	cctcagggca	gcatectgag	2520

tgctctctgt	gctacggcga	catggagaac	aagctgttcg	ccggcatccg	gcgggacgga	2580
ctgctgctgc	gcctgggtgga	cgacttccctg	ctggtgacct	ctcactgacc	ccacgccaag	2640
accttctctg	ggaccctgggt	gcggggcgtg	cccaggtacg	gctgtgtggt	gaacctgcgc	2700
aagaccgtgg	tgaacttccc	cgtggaggac	gaggccctgg	gcggcacagc	cttcgtgcag	2760
atgcccggcc	atggcctggt	cccttgggtgc	gggctgctgc	tggacaccgg	gacctgggaa	2820
gtgcagagcg	actacagcag	ctacgcccgg	accagcatcc	gggcccagcct	gacattcaac	2880
cgcggcttca	aggccggcag	aaacatgcgg	cggaagctgt	ttggcgtgct	gcggctgaag	2940
tgccacagcc	tgtttctgga	cctgcaggtg	aacagcctgc	agaccgtgtg	caccaacatc	3000
tacaagatcc	tgctgctgca	ggcctaccgg	ttccacgcct	gcgtgctgca	gctgcccttc	3060
catcagcagg	tgtggaagaa	ccccaccttc	ttcctgcggc	tgatctctga	caccgcccagc	3120
ctgtgctaca	gcattctgaa	ggccaagaac	gccggcatga	gcctgggccc	caagggcgct	3180
gccggacccc	tgcccagcga	ggccgtgacg	tggctgtgtc	accaggcctt	ctgtctgaag	3240
ctgacccggc	accgctgac	ctacgtgcc	tgctgggaa	gcctgcggac	gcgccagacc	3300
cagctgagcc	ggaagctgcc	tggcaccacc	ctgacagccc	tggaggccgc	tgccaacccc	3360
gccctgccta	gcgacttcaa	gacctcctg	gac			3393

- <210> 10
- <211> 1137
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> hTERT(A)

<400> 10

Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser His
 1 5 10 15
 Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly Pro
 20 25 30
 Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala
 35 40 45
 Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro Pro
 50 55 60
 Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu Val
 65 70 75 80
 Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val Leu
 85 90 95
 Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Gly
 100 105 110
 Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr Asp
 115 120 125
 Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val Gly
 130 135 140
 Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr Gln
 165 170 175
 Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro His Ala Ser Gly Pro
 180 185 190
 Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg Glu
 195 200 205
 Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg Gly
 210 215 220
 Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg Gly
 225 230 235 240
 Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp Ala
 245 250 255
 His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val Val
 260 265 270
 Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Leu
 275 280 285
 Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His Ala
 290 295 300
 Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro Cys
 305 310 315 320
 Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly Asp
 325 330 335
 Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser
 340 345 350

Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser Arg
 355 360 365
 Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln Arg
 370 375 380
 Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His Ala
 385 390 395 400
 Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg Ala
 405 410 415
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln Gly
 420 425 430
 Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu Val
 435 440 445
 Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe Val
 450 455 460
 Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser Arg
 465 470 475 480
 His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser Leu
 485 490 495
 Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met Ser
 500 505 510
 Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys Val
 515 520 525
 Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe Leu
 530 535 540
 His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe Phe
 545 550 555 560
 Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg
 565 570 575
 Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu
 580 585 590
 Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His
 595 600 605
 Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 610 615 620
 Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly
 625 630 635 640
 Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg
 645 650 655
 Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro
 660 665 670
 Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala
 675 680 685
 Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu
 690 695 700
 Leu Tyr Phe Val Lys Val Ala Ile Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro
 705 710 715 720
 Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn
 725 730 735
 Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly
 740 745 750

 His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp Leu
 755 760 765
 Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro
 770 775 780
 Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala
 785 790 795 800
 Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala
 805 810 815
 Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln
 820 825 830
 Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met
 835 840 845
 Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Arg
 850 855 860
 Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys
 865 870 875 880
 Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val
 885 890 895

Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala
 900 905 910
 Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro
 915 920 925
 Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp
 930 935 940
 Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn
 945 950 955 960
 Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val
 965 970 975
 Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser
 980 985 990
 Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Gln Ala
 995 1000 1005
 Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val
 1010 1015 1020
 Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser
 1025 1030 1035 1040
 Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly
 1045 1050 1055
 Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu
 1060 1065 1070
 Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr
 1075 1080 1085
 Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg
 1090 1095 1100
 Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro
 1105 1110 1115 1120
 Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp Ser Glu Gln Ile Asp
 1125 1130 1135
 Asn

- <210> 11
- <211> 3399
- <212> ADN
- <213> Homo Sapiens

- <400> 11

atgccgcg	ctccccgctg	ccgagccgtg	cgctccctgc	tgcgcagcca	ctaccgag	60
gtgctgccc	tggccacggt	cgtgcccgc	ctggggcccc	agggtggcg	gctgggtgag	120
cgcggggacc	cgccggcttt	ccgcgcgctg	gtggcccagt	gcttgggtg	cgtgccctgg	180
gacgcacggc	cgccccccgc	cgccccctcc	ttccgccagg	tgtcctgcct	gaaggagctg	240
gtggccccgag	tgtgacagag	gctgtgagag	cgccggcgga	agaacgtgct	ggccttcggc	300
ttcgcgctgc	tggacggggc	ccgcgggggc	ccccccgagg	ccttcaccac	cagcgtgccc	360
agctacctgc	ccaacacggt	gaccgacgca	ctgcccggga	gcggggcggt	ggggctgctg	420
ctgcccgcg	tgggcgacga	cgtgctgggt	cacctgctgg	cacgctgccc	gctctttgtg	480
ctgggtggctc	ccagctgccc	ctaccagggtg	tgcgggccc	cgctgtacca	gctcggcgtc	540
gccactcagg	cccggcccc	gccacacgct	agtggacccc	gaaggcgtct	gggatgcaa	600
cgggcctgga	accatagcgt	cagggaggcc	ggggctcccc	tgggcctgcc	agccccgggt	660
gcgaggaggc	gcggggcgag	tgccagccga	agtcgcccgt	tgcccaagag	gccccaggct	720
ggcgtgccc	ctgagccgga	gcggacgccc	gttgggcagg	ggtcctgggc	ccaccgggc	780
aggacgctg	gaccgagtga	ccgtggtttc	tgtgtgggtg	cacctgccag	acccgccgaa	840
gaagccacct	ctttggaggg	tgcgctctct	ggcacgccc	actccccacc	atccgtgggc	900
cgccagcacc	acgcggggcc	cccattcaca	tcgcccacc	cacgtcccctg	ggacacgctc	960
tgtccaccgg	tgtacgcccga	gaccaagcac	ttccttact	cctcaggcga	caaggagcag	1020
ctgcccctct	cccttctact	cagctctctg	aggcccagcc	tgactggcgc	tcggaggctc	1080
gtggagacca	tctttctggg	ttccaggccc	tggatgccag	ggactccccg	caggttgccc	1140
cgctgcccc	agcgtactg	gcaaatgccc	cccctgttct	tggagctgct	tgggaaccac	1200
gcgagtgccc	cttacggggg	gctcctcaag	acgcactgcc	cgctgagagc	tgcggctacc	1260
ccagcagccc	gtgtctgtgc	ccgggagaag	ccccagggtc	ctgtggcgcc	ccccaggag	1320
gaggacacag	acccccgctg	cctgggtgag	ctgctcccgc	agcacagcag	cccctggcag	1380
gtgtacggct	tcgtgcccgc	ctgcccgcgc	cggtgggtgc	ccccaggcct	ctggggctcc	1440
aggcacaacg	aacgcccgtt	cctcaggaac	accaagaagt	tcatctccc	ggggaagcat	1500
gccaagctct	cgctgcagga	gctgacgtgg	aagttagcgc	tgcgggactg	cgcttggctg	1560
cgagagagcc	caggggttgg	ctgtgttccc	gcccagagc	accgtctgct	tgaggagatc	1620
ctggccaagt	tcttgcactg	gctgatgagt	gtgtacgtgc	tcgagctgct	caggtctttc	1680
ttttatgtca	cggagaccac	gtttcaaaag	aacaggctct	ttttctaccg	gaagagtgtc	1740
tggagcaagt	tgcaaaagcat	tggaatcaga	cagcacttga	agaggggtga	gctgcccggg	1800

ctgtcggaa	cagaggtcag	gcagcatcgg	gaagccaggc	ccgccctgct	gacgtccaga	1860
ctccgcttca	tccccaaagc	tgacgggctg	cgcccgattg	tgaacatgga	ctacgtcgtg	1920
ggagccagaa	cgttccgag	agaaaagagg	gccgagcgtc	tcacctcgag	ggtgaaggca	1980
ctgttcagcg	tgtcaacta	cgagcggggc	cgggcccctg	gcttccctggg	cgctctgtg	2040
ctgggcccgg	acgatatcca	cagggcctgg	cgaccttcg	tgtgctggtg	cgggcccag	2100
gaccgcgccc	ctgagctgta	ctttgtcaag	gtggatgtga	cgggcgcgta	cgacaccatc	2160
ccccaggaca	ggctcacgga	ggcatcgc	agcatcatca	aaccccagaa	cacgtactgc	2220
gtgctgccc	atgcccgtgg	ccagaaggcc	gcccattggc	acgtccgcaa	ggccttcaag	2280
agccacgtct	ctaccctgac	agacctccag	ccgtacatgc	gacagttcgt	ggctcacctg	2340
caggagacca	gcccgtgag	ggatgcccgc	gtcatcgagc	agagctccc	cctgaatgag	2400
gccagcagtg	gcttcttga	cgcttcccta	cgcttcatgt	gccaccacgc	cgtgcccac	2460
aggggcaagt	cctacgtcca	gtgccagggg	atcccgcagg	gctccatcct	ctccacgctg	2520
ctctgcagcc	tgtgtacgg	cgacatggag	aacaagctgt	ttgcccggat	tcggcgggac	2580
gggctgctcc	tgcgtttgg	ggatgatttc	ttgttgggtg	cacctcacct	caccacgcg	2640
aaaaccttcc	tcaggacctt	ggtcgaggtg	gtccctgagt	atggctgctg	ggtgaactg	2700
cggaagacag	tgggtgaact	ccctgtagaa	gacgagggcc	tgggtggcac	ggcttttgg	2760
cagatgccgg	cccacggcct	attccccctg	tgcccctgc	tgctggatac	ccggacctg	2820
gaggtgcaga	gcgactactc	cagctatgcc	cgacctcca	tcagagccag	tctcacctc	2880
aaccgcccgt	tcaaggctgg	gaggaacatg	cgtcgcaaac	tctttgggg	cttgcggctg	2940
aagtgtcaca	gctgtttct	ggatttgcag	gtgaacagcc	tccagacggg	gtcaccaac	3000
atctacaaga	tcctcctgct	gcagggctac	aggtttcag	catgtgtgct	gcagctcca	3060
tttcatcagc	aagtttggaa	gaacccccaca	ttttctctgc	gcgtcatctc	tgacacggcc	3120
tccctctgct	actccatcct	gaaagccaag	aacgcaggga	tgctcgtggg	ggccaagggc	3180
gcccgcggcc	ctctgcccct	cgaggccgtg	cagtggctgt	gccaccaagc	attcctgctc	3240
aagctgactc	gacaccgtgt	cacctacgtg	ccactcctgg	ggtcactcag	gcagccagcag	3300
acgcagctga	gtcggaaagct	ccccgggacg	acgctgactg	ccctggaggc	cgagccaac	3360
ccggcactgc	cctcagactt	caagaccatc	ctgactga			3399

5
 <210> 12
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

 <400> 12

Met	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Cys	Arg	Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	
His	Tyr	Arg	Glu	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly
			20					25					30		
Pro	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg
		35					40					45			
Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Pro	Trp	Asp	Ala	Arg	Pro
	50					55					60				
Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Glu	Leu
65					70					75				80	
Val	Ala	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Lys	Asn	Val
				85					90					95	
Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro
			100					105					110		
Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr
		115					120					125			
Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val
	130					135					140				
Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val
145					150				155					160	
Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr
				165					170					175	
Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly
			180					185					190		
Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg
		195					200					205			
Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg
	210					215					220				
Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg
225					230					235				240	
Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp
				245					250					255	
Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val
			260					265					270		
Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala

		275					280				285				
Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His
	290					295					300				
Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro
305					310					315					320
Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly
				325					330					335	
Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro
			340					345					350		
Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser
		355					360					365			
Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln
	370					375					380				
Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His
385					390					395					400
Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg
				405					410					415	
Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln
			420					425					430		
Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu
		435					440					445			
Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe
	450					455					460				
Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser
465					470				475						480
Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser
				485					490					495	
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met
			500					505					510		
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys
		515					520					525			
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe
	530					535					540				
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe
545					550					555					560
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr
				565					570					575	
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His
			580					585					590		
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln
		595					600					605			
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile
	610					615					620				
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val
625					630					635					640
Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser
				645					650					655	
Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg
			660					665					670		
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg
		675					680					685			
Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro
	690					695					700				
Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile
705					710					715					720
Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln
				725					730					735	
Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His
			740					745					750		
Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp
		755					760					765			
Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser
	770					775					780				
Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu
785					790					795					800
Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His
				805					810					815	
Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro

				820					825					830			
Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp		
		835					840					845					
Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu		
	850					855					860						
Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala		
	865				870						875				880		
Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys		
				885					890					895			
Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu		
			900					905					910				
Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe		
		915					920					925					
Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser		
	930					935					940						
Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe		
	945				950					955					960		
Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly		
				965					970					975			
Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn		
			980					985					990				
Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln		
		995					1000						1005				
Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln		
	1010					1015						1020					
Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala		
	1025				1030					1035					1040		
Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser	Leu		
				1045					1050					1055			
Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Trp		
			1060					1065					1070				
Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	His	Arg	Val	Thr		
		1075				1080						1085					
Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser		
	1090					1095					1100						
Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn		
	1105				1110					1115					1120		
Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp						
				1125					1130								

<210> 13
 <211> 309
 <212> ADN
 <213> *E. coli*

5

<400> 13

```

gcccctcaga gcatcaccga gctgtgcagc gagtaccgga acaccagat ttacaccatc 60
aacgacaaga tcctgagcta caccgagtct atggccggca agcgggagat ggtgatcatc 120
acctcaaga gcgggccac ctttcaggtg gaagtgcctg gcagccagca catcgacagc 180
cagaagaagg ccatcgagcg gatgaaggac accctgcgga tcacctacct gaccgagacc 240
aagatcgaca agctgtgtgt gtggaacaac aagaccccca acagcatcgc cgccatctct 300
atggagaac                                     309
    
```

10

<210> 14
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *E. coli*

15

<400> 14

ES 2 376 010 T3

Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln
 1 5 10 15
 Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala
 20 25 30
 Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly Ala Thr Phe
 35 40 45
 Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln Lys Lys Ala
 50 55 60
 Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr
 65 70 75 80

Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile
 85 90 95
 Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Ser Glu Gln Ile Asp Asn
 100 105

5 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR
 10 <400> 15
 gatctgatga tatcgccacc atgaccagag cccccagatg 40

15 <210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 16
 aggggggatc cgcacacctg gtaggcgag ctgggg 36

25 <210> 17
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador de PCR
 <400> 17
 ctgtactttg tcaaggtggc taccacgggc gcgtacg 37

35 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido

45 <400> 18

Leu Val Pro Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Ser Pro Leu
 1 5 10 15

5 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 10 <400> 19

Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Ser Pro Leu Tyr Gln Ile Cys
 1 5 10 15

15 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 20 <400> 20

Ala Tyr Gln Val Cys Gly Ser Pro Leu
 1 5

25 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 21

Val Gly Arg Asn Phe Thr Asn Leu
 1 5

40 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido
 45 <400> 22

Ser Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Leu
 1 5

50 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido

<400> 23

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de una proteína de fusión de hTERT-LTB como se expone en la SEC ID N°: 6.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia como se expone en la SEC ID N°: 5.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la secuencia de nucleótidos comprende además una secuencia líder que codifica la secuencia señal del activador de plasminógeno tisular (TPA) humano.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia como se expone en la SEC ID N°: 1.
- 10 5. Una proteína de fusión de hTERT-LTB purificada, que comprende mutaciones que funcionan eliminando la actividad catalítica de la telomerasa, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N°: 6.
6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. El vector de la reivindicación 6, en el que el vector es un vector plasmídico o un vector de adenovirus.
- 15 8. Un vector de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende un casete de expresión que comprende la proteína de fusión de hTERT y un promotor unido operativamente al polinucleótido.
9. El vector de la reivindicación 7 u 8, en el que el vector es el plásmido pV1J.
10. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 6, 7, 8 ó 9.
11. Un vector de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que es un vector Ad5 o Ad6.
- 20 12. Un procedimiento para expresar una proteína de fusión de hTERT-LTB en una célula huésped recombinante, que comprende:
 - (a) introducir un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en una célula huésped adecuada; y
 - (b) cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína de fusión de hTERT-LTB.
- 25 13. Una composición farmacéutica que comprende un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 u 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Una combinación de un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y un vector adenovírico de acuerdo con la reivindicación 11, en la que los vectores no son los mismos.
- 30 15. Una molécula de ácido nucleico, un vector o una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
16. Una molécula de ácido nucleico, un vector o una proteína para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el uso es el tratamiento del cáncer.
- 35 17. Uso de una molécula de ácido nucleico, o un vector o una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P S E
 1 ATGGATGCA ATGAAGAGG GGCCTGTGC TCGTGTGTG TGGCGCGTG TTTGTGAGC CCTAGCGAG
 I P R A P R C R A V R S L L R S H Y R E V L P L
 73 ATCCCCAGA GCCCCAGA TGCAGAGCC GTGCGGAGC CTGCTGCGG AGCCACTAC CGGGAAGTG CTGCCCTG
 A T F V R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R
 145 GCCACCTTC GTGGGCGG CTGGGCCCC CAGGGCTGG CGGCTGGTG CAGCGGGG GACCCTGCC GCCTTCCGG
 A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A P S F R
 217 GCCCTGGTG GCTCAGTGC CTGGTGTGC GTGCCCTGG GAGGCCAGA CCCCCCCA GCGGCCCT AGCTTCCGG
 Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V
 289 CAGGTGAGC TGCCTGAAG GAACTGGTG GCCAGAGTG CTGCAGCGG CTGTGCGAG AGAGGCGCC AAGAAGCTG
 L A F G F A L L D G A R G G P P E A F T T S V R
 361 CTGGCCTTC GGCTTCGCC CTGCTGGAC GCGGCCAGA GCGGCCCT CCGGAGGCC TTCACCACA AGCGTGGCG
 S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V
 433 AGCTACCTG CCCAACACC GTGACCGAC GCCCTGCGG GGCAGCGGC GCCTGGGGC CTGTGCTG AGAAGAGTG
 G D D V L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y
 505 GCGGACGAC GTGCTGGTG CACCTGTG GCCCGTGC GCCCTGTT C GTGCTGGTG GCCCCAGC TGGCCTAC
 Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P H A S G
 577 CAGGTGTGC GGCCACCC CTGTACCAG CTGGGAGCC GCCACCCAG GCCAGGCC CCACCCAC GCCAGCGGC
 P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L
 649 CCCAGACGG AACTGGGC TCGAGCGG GCCTGGAAC CACAGCGTG AGAGAGGCC GCGTGCCC CTGGGCTG
 P A P G A R R R G G S A S R S L P L P K R P R R
 721 CCAGCCCCT GCGCCAGA AGAAGAGC GGCAGCGC AGCCGAGC CTGCCCTG CCAAGCGG CCCAGAAGA
 G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G
 793 GCGCTGCC CCCGAGGCC GAGCGGACC CCCGTGGC CAGGGCAGC TGGGCCAC CCGGCAGA ACCAGAGCC
 P S D R G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A
 865 CCCAGCGAC CCGGCTTC TCGTGGTG AGCCCCGC AGACCCGC GAGGAGGCC ACAAGCCTG GAGGGGCC
 L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P S T S R
 937 CTGAGCGGC ACCCGCAC AGCCACCC AGCGTGGC GCGCAGCAC CAGCCGGA CCGCCAGC ACCAGAGA

FIG. 1A

P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G
 1009 CCCCCAGA CCCTGGGAC ACCCCCTGC CCCCTGTG TAGCCCGAG ACCAAGCAC TTCCTGTAC AGCAGCGGC
 D K E Q L R P S F L L S S L R P S L T G A R R L
 1081 GACAAGGAG CAGCTGGG CCCAGCTC CTGCTGAGC AGCCTGAGA CCCAGCCTG ACCGGGGCC AGGAGACTG
 V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q
 1153 GTGGAGACC ATCTTCCTG GGCAGCCGG CCCTGGATG CCCGGCACC CCCCGGAGA CTGCCCCGG CTGCCCCAG
 R Y W Q M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L
 1225 CGGTACTGG CAGATGGG CCCCTGTTCTG GAGAGCTG CTGGCAAC CAGCCCCAG TGCCCTAC GCGTGTCTG
 L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R E K P Q
 1297 CTGAAAACC CACTGCCCC CTGAGAGCC GCCGTGACC CCCGTGCC GCGTGTGC GCCAGAGAG AAGCCCCAG
 G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S
 1369 GGCAGCGTG GCCGCTCCC GAGGAGGAG GACACCGAC CCCAGACGC CTGGTGCAG CTGCTGGG CAGCACAGC
 S P W Q V Y G F V R A C L R R L V P P G L W G S
 1441 AGCCCTTGG CAGGTGTAC GGCCTCGTG CGGGCTGC CTGAGAAGG CTGGTCCC CTTGGCCTG TGGGCGAGC
 R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S
 1513 AGACACAAC GAGCGGGG TTCCTGGG AACACCAAG AAGTTCATC AGCCTGGG AAGCAGCC AAGCTGAGC
 L Q E L T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C
 1585 CTGCAGGAA CTGACCTGG AAGATGAGC GTGCGGGAC TGCGCCTGG CTGCGGGG AGCCTTGGC GTGGGCTGC
 V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L M S V Y
 1657 GTGCCAGCC GCCGAGCAC CGGCTGGG GAGGAGATC CTGGCCAAG TTCCTGCAC TGGTGTATG AGCGTGTAC
 V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y
 1729 GTGGTGGAA CTGCTGGG TCCTTCTTC TAGGTGACC GAAACCACC TTCCAGAAG AACCGGTG TTCTTCTAC
 R K S V W S K L Q S I G I R Q H L K R V Q L R E
 1801 CGGAAGAGC GTGTGGAGC AAGCTGAGC AGCATCGGC ATCAGGCAG CACCTGAAG AGAGTGCAG CTGCGGGAG
 L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I
 1873 CTGAGCGAG GCCGAAGTG AGACAGCAC CGGGAGGCC AGACCTGCC CTGCTGACC AGCCGGCTG CCGTTTCATC
 P K P D G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E
 1945 CCCAAGCCC GACGGCCTG CGGCCCATC GTGAACATG GACTACGTG GTGGGGCC AGAACCTTC CGGCGGGAG

FIG.1B

K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E R A R R
 2017 AAGCGGCC GAGCGGCTG ACCAGCAGA GTGAAGGCC CTGTTTCAGC GTGCTGAAC TACGAGCGG GCCAGGAGA
 P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R
 2089 CCCGGCCTG CTGGGCGCC AGCGTGCTG GGCCTGGAC GACATCCAC CGGGCCTGG CGGACCTTC GTGCTGAGA
 V R A Q D P P P E L Y F V K V A I T G A Y D T I
 2161 GTGCGGGCC CAGGACCCC CCACCCGAG CTGTACTTC GTGAAAGTG GCCATCACC GCGCCTAC GACACCATC
 P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y
 2233 CCCAGGAC CGGCTGACC GAAGTGATC GCCAGCATC ATCAAGCCC CAGAACACC TACTGCGTG CGGCGGTAC
 A V V Q K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D
 2305 GCCGTGGTG CAGAAGGCC GCCCAGGC CACGTCCGG AAGGCCTTC AAGAGCCAC GTGAGCACC CTGACCCGAC
 L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D A V V I
 2377 CTGCAGCCC TACATGCGG CAGTTCGTG GCCCACCTG CAGGAGACC AGCCCCCTG CGGGATGCC GTGGTGATC
 E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H
 2449 GAGCAGAC AGCAGCCTG AACGAGGCC AGCAGCGGC CTGTTTCGAC GTGTTTCCTG CGCTTCATG TGCCACCAC
 A V R I R G K S Y V Q C Q G I P Q G S I L S T L
 2521 GCCGTGGG ATCCGGGGC AAGAGCTAC GTGCAGTGC CAGGGCATC CCTCAGGCC AGCATCCTG AGCACACTG
 L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L
 2593 CTGTGCTCT CTGTGCTAC GGCACATG GAGAACAAG CTGTTTCGCC GGCATCCGG CGGGACGGA CTGTGCTG
 R L V D D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V
 2665 CGCCTGGTG GACGACTTC CTGCTGGTG ACCCCTCAC CTGACCCAC GCCAAGACC TTCCTGCGG ACCCTGGTG
 R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P V E D E
 2737 CGGGGCGTG CCCGAGTAC GGCTGTGTG GTGAACCTG CGCAAGACC GTGTTGAAC TTCCCGTG GAGGACGAG
 A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D
 2809 GCCCTGGCC GGCACAGCC TTCGTGCAG ATGCCCGCC CATGGCCTG TTCCTTGG TCGGGGCTG CTGCTGGAC
 T R T L E V Q S D Y S S Y A R T S I R A S L T F
 2881 ACCCGGACC CTGGAAGTG CAGAGCGAC TACGCCCGG ACCAGCATC CGGGCCAGC CTGACATTC
 N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S
 2953 AACCGCGGC TTCAAGGCC GGCAGAAC ATGGCGCGG AAGCTGTTT GGCGTGCTG CGGCTGAAG TGCCACAGC

FIG.1C

L F L D L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q
 3025 CTGTTTCTG GACCTGCAG GTGAACAGC CTGCAGACC GTGTGCACC AACATCTAC AAGATCCTG CTGCTGCAG
 A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N P T F F
 3097 GCCTACCGG TTCCACGGC TGCCTGCTG CAGCTGCC TTCCATCAG CAGGTGTGG AAGAACCC ACCTTCTTC
 L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A G M S L
 3169 CTGCGCGTG ATCTCTGAC ACCGCCAGC CTGTGCTAC AGCATTCTG AAGGCCAAG AACGCCGGC ATGAGCCTG
 G A K G A A G P L P S E A V Q W L C H Q A F L L
 3241 GCGCCCAAG GCGCTGCC GGACCCTG CCCAGCGAG GCCGTGCAG TGGCTGTGT CACCAGGCC TTTCTGCTG
 K L T R H R V T Y V P L L G S L R T A Q T Q L S
 3313 AAGCTGACC CGGCACCGC GTGACCTAC GTGCCCTG CTGGGAAGC CTGCGGACC GCCCAGACC CAGCTGAGC
 R K L P G T T L T A L E A A A N P A L P S D F K
 3385 CGGAAGCTG CCTGGCACC ACCCTGACA GCCCTGGAG GCCGCTGCC AACCCCGCC CTGCCTAGC GACTTCAAG
 T I L D S R A P Q S I T E L C S E Y R N T Q I Y
 3457 ACCATCCTG GACTCTAGA GCCCCTCAG AGCATCACC GAGCTGTGC AGCGAGTAC CGGAACACC CAGATTTAC
 T I N D K I L S Y T E S M A G K R E M V I I T F
 3529 ACCATCAAC GACAAGATC CTGAGCTAC ACCGAGTCT ATGCCCGGC AAGCGGGAG ATGGTGATC ATCACCTTC
 K S G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E
 3601 AAGAGCGGC GCCACCTTT CAGGTGGAA GTGCCCTGGC AGCCAGCAC ATCGACAGC CAGAAGAAG GCCATCGAG
 R M K D T L R I T Y L T E T K I D K L C V W N N
 3673 CGGATGAAG GACACCCTG CCGATCACC TACCTGACC GAGACCAAG ATCGACAAG CTGTGTGTG TGGAAACAAC
 K T P N S I A A I S M E N (SEC ID N°: 2)
 3745 AAGACCCCC AACAGCATC GCGCCATC TCTATGGAG AAC (SEC ID N°: 1)

FIG.1D

M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P S E
 1 ATGGATGCA ATGAAGAGG GGCCTGTGC TCGTGTGT GCGCCGTG TTTGTGAGC CCTAGCGAG
 I T R A P R C P A V R S L L R S R Y R E V W P L
 73 ATCACCAGA GCCCCAGA TGCCCTGCC GTGAGAAGC CTGCTCGG AGCCGGTAC AGAGAAGTG TGGCCCTG
 A T F V R R L G P E G R R L V Q P G D P K I Y R
 145 GCCACCTTT GTGAGGAGA CTGGGCCCT GAGGGCAGG AGACTGGT CAGCTGGC GACCCCAA ATCTACAGG
 T L V A Q C L V C M H W G S Q P P P A D L S F H
 217 ACCCTGGT GCCCAGTGT CTGGTGTGT ATGCACTGG GGCAGCCAG CCCCCTCC GCCGACCTG AGCTTCCAC
 Q V S S L K E L V A R V V Q R L C E R N E R N V
 289 CAGGTGTC AGCCTGAAG GAACTGGT GCCAGAGTG GTGCAGAGA CTGTGCGAG CGGAACGAG AGAAACGTG
 L A F G F E L L N E A R G G P P M A F T S S V R
 361 CTGGCCTTC GGTTCGAG CTGCTGAAC GAGGCCAGA GCGGCCCT CCCATGGCC TTCACCAGC TCTGTGAGG
 S Y L P N T V I E T L R V S G A W M L L L S R V
 433 AGCTACCTG CCCAACACC GTGATCGAG ACCCTGAGA GTGAGCGG GCCTGGATG CTGCTGCTG AGCAGAGTG
 G D D L L V Y L L A H C A L Y L L V P P S C A Y
 505 GCGGATGAC CTGCTGGTG TACCTGTG GCCCACTGC GCCCTGTAT CTGCTGGTG CCCCCAGC TGGCCCTAC
 Q V C G S P L Y Q I C A T T D I W P S V S A S Y
 577 CAGGTGTC GGATCCCC CTGTACCAG ATTTGGCC ACCACCGAC ATCTGGCC AGCGTGTG GCCAGCTAC
 R P T R P V G R N F T N L R F L Q Q I K S S S R
 649 AGACCCACC AGACCTGTG GCGCGGAAC TTCACCAAC CTGCGGTT CAGCAGCAG ATCAAGAGC AGCAGCAGA
 Q E A P K P L A L P S R G T K R H L S L T S T S
 721 CAGGAGGCC CCCAAGGCC CTGGCCCTG CCCAGCAGA GGCACCAAG AGACACCTG AGCCTGACC AGCACCAGC
 V P S A K K A R C Y P V P R V E E G P H R Q V L
 793 GTGCCCAGC GCCAAGAAA GCCAGATGC TACCCCGT CCTAGAGTG GAGGACGGC CCTCAGAGA CAGGTGCTG
 P T P S G K S W V P S P A R S P E V P T A E K D
 865 CCCACCCCC AGCGGCAAG AGCTGGGTG CCCAGCCCC GCCAGAAGC CCCGAAGTG CCCACCGCC GAGAAGGAC
 L S S K G K V S D L S L S G S V C C K H K P S S
 937 CTGAGCAGC AAGGGCAAA GTGAGCGAC CTGTCTCTG AGCGGCAGC GTGTGTGTC AAGCACAAG CCCAGCAGC

FIG.2A

T S L L S P P R Q N A F Q L R P F I E T R H F L
 1009 ACCAGCCTG CTGAGCCCC CCCAGACAG AACGCCTTC CAGCTGAGG CCTTTCATC GAGACCCGG CACTTCTCTG
 Y S R G D G Q E R L N P S F L L S N L Q P N L T
 1081 TACAGCAGA GCGGATGGC CAGGAGAGA CTGAACCCC AGCTTCTCTG CTGAGCAAC CTGCAGCCT AACCTGACC
 G A R R L V E I I F L G S R P R T S G P L C R T
 1153 GCGGCCAGA GGCCTGGTG GAGATCATC TTCCTGGC AGCAGACC AGAACCCAGC GGCCTCTG TGCAGAACC
 H R L S R R Y W Q M R P L F Q Q L L V N H A E C
 1225 CACCGGCTG AGCAGGCGG TACTGGAAG ATGAGACC CTGTTCCAG CAGCTGCTG GTGAACCAC GCCGAGTGC
 Q Y V R L L R S H C R F R T A N Q Q V T D A L N
 1297 CAGTATGTG CGGCTGCTG AGGAGCCAC TGCAGATTC AGGACCGC AACCCAGCAG GTGACCCGAC GCCCTGAAC
 T S P P H L M D L L R L H S S P W Q V Y G F L R
 1369 ACCAGCCCC CCTCACCTG ATGGATCTG CTGAGGCTG CACAGCAGC CCCTGGCAG GTGTACGGC TTCCTGAGA
 A C L C K V V S A S L W G T R H N E R R F F K N
 1441 GCCTGCCTG TGCAAAGTG GTGTCCGCC AGCCTGTGG GGCACCAGA CACAACGAG CCGCGGTTT TCAAGAAT
 L K K F I S L G K Y G K L S L Q E L M W K M K V
 1513 CTGAAGAAG TTCATCAGC CTGGGCAAG TACGGCAAG CTGAGCCTG CAGGAAGTG ATGTGGAAG ATGAAAGTG
 E D C H W L R S S P G K D R V P A A E H R L R E
 1585 GAGGACTGC CACTGGCTG AGAAGCAGC CCCGGCAAG GACAGAGTG CCTGCCGCC GAGCACAGA CTGAGGGAG
 R I L A T F L F W L M D T Y V V Q L L R S F F Y
 1657 AGAATCCTG GCCACATTC CTGTTCTGG CTGATGGAC ACCTAGCTG GTGCAGCTG CTGCGGTCC TTCTTCTAC
 I T E S T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S
 1729 ATCACCGAG AGCACCTTC CAGAAGAAC CCGCTGTTT TTCTACCGG AAGTCTGTG TGGAGCAAG CTGCAGAGC
 I G V R Q H L E R V R L R E L S Q E E V R H H Q
 1801 ATCGGAGTG AGACAGCAC CTGGGAGAGA GTGAGGCTG AGAGAGCTG AGCCAGGAG GAAGTGAGA CACCACCAG
 D T W L A M P I C R L R F I P K P N G L R P I V
 1873 GATACCTGG CTGGCCATG CCCATCTGC CCGTGTGAGA TTCATCCCC AAGCCCAAC GGCCTGAGA CCCATCGTG
 N M S Y S M G T R A L G R R K Q A Q H F T Q R L
 1945 AACATGAGC TACAGCATG GGCACAAGA GGCCTGGC AGAAGAAG CAGGCCCCAG CACTTCACC CAGCGGCTG

FIG.2B

K T L F S M L N Y E R T K H P H L M G S S V L G
 2017 AAAACCCGT TTCTCCATG CTGAACTAC GAGGGACC AAGCACCCA CACCTGATG GGCAGCAGC GTGCTGGGC
 M N D I Y R T W R A F V L R V R A L D Q T P R M
 2089 ATGAACGAC ATCTACCGG ACCTGGAGA GCCTTCGTG CTGAGAGTG CGGGCCCTG GACCAGACC CCTCGGATG
 Y F V K A A I T G A Y D A I P Q G K L V E V V A
 2161 TACTTCGTG AAGGCCGCC ATCACCGC GCCTACGAC GCCATCCCC CAGGGCAAA CTGGTGGAA GTGGTGGCC
 N M I R H S E S T Y C I R Q Y A V V R R D S Q G
 2233 AACATGATC AGGCACAGC GAGTCCACC TACTGCATC AGGCAGTAC GCCGTGGTG AGAAGAGAC AGCCAGGGC
 Q V H K S F R R Q V T T L S D L Q P Y M G Q F L
 2305 CAGGTGCAC AAGAGCTTC CGGAGACAG GTGACCACC CTGAGCGAT CTGCAGCCT TACATGGGC CAGTTCCTG
 K H L Q D S D A S A L R N S V V I E Q S I S M N
 2377 AAGCACCTG CAGGATAGC GAGCCAGC GCCCTGAGA AATAGCGTG GTGATCGAG CAGAGCATC AGCATGAAC
 E S S S L F D F F L H F L R H S V V K I G D R
 2449 GAGTCCAGC AGCAGCCTG TTCGACTTC TTCCTGCAC TTCCTGAGG CACAGCGTG GTGAAGATC GGCAGACAGA
 C Y T Q C Q G I P Q G S S L S T L L C S L C F G
 2521 TGCTACACC CAGTGTGAG GGCATCCCT CAGGGTCT AGCCTGAGC ACCCTGCTG TGTAGCCTG TGCTTCGGC
 D M E N K L F A E V Q R D G L L L R F V D D F L
 2593 GACATGGAG AATAAGCTG TTCGCCGAA GTGCAGAGA GATGGCCTG CTGCTGCGC TTCGTGGAC GATTCCTG
 L V T P H L D Q A K T F L S T L V H G V P E Y G
 2665 CTGGTGACC CCACACCTG GACCAGGCC AAGACCTC CTGAGCACA CTGGTGCAC GGCCTGCCC GAGTACGGC
 C M I N L Q K T V V N F P V E P G T L G G A A P
 2737 TGCATGATC AATCTGCAG AAAACCGTG GTGAACCTC CCTGTGGAG CCCGGCACC CTGGGCGGA GCCGCCCTC
 Y Q L P A H C L F P W C G L L L D T Q T L E V F
 2809 TACCAGCTG CCCGCCAC TGCCTGTTT CCCTGGTGC GGACTGCTG CTGGATAACC CAGACCCTG GAAGTGTTC
 C D Y S G Y A Q T S I K T S L T F Q S V F K A G
 2881 TGGGACTAC AGCGGCTAC GCCCAGACC AGCATCAAG ACCAGCCTG ACCTCCAG AGCGTGTTC AAGGCCGGC
 K T M R N K L L S V L R L K C H G L F L D L Q V
 2953 AAGACCATG AGGAACAAG CTGCTGAGC GTGCTGAGA CTGAAGTGC CACGGCCTG TTCCTGGAT CTGCAGGTG

FIG.2C

N S L Q T V C I N I Y K I F L L Q A Y R F H A C
 3025 AACAGCCTG CAGACCGTG TGTATCAAC ATCTACAAG ATTTTCCTG CTGCAGGCC TACAGATTC CACGCCTGC
 V I Q L P F D Q R V R K N L T F F L G I I S S Q
 3097 GTGATCCAG CTGCCCTTC GACCAGAGA GTGGGAAG AACCTGACC TTCTTCCTG GGGATCATC AGCAGCCAG
 A S C C Y A I L K V K N P G M T L K A S G S F P
 3169 GCCAGCTGC TGCTAGGCC ATCCTGAAA GTGAAGAAC CCCGGCATG ACCCTGAAG GCCAGCGGC AGCTTCCCT
 P E A A H W L C Y Q A F L L K L A A H S V I Y K
 3241 CCCGAGGCC GCCCACTGG CTGTGCTAC CAGGCCTTT CTGCTGAAG CTGGCCGCC CACAGCGTG ATCTACAAG
 C L L G P L R T A Q K L L C R K L P E A T M T I
 3313 TGCCTGCTG GGCCCTCTG AGAACC GCCAGCTG CAGAAGCTG CTGTGCCGG AAGCTGCC GAGGCCACC ATGACCATT
 L K A A A D P A L S T D F Q T I L D S R A P Q S
 3385 CTGAAAGCC GCCGCCGAC CCCGCCCTG AACACCCAG ATTTACACC ATCAACGAC AAGATCCTG AGCTACACC
 I T E L C S E Y R N T Q I Y T I N D K I L S Y T
 3457 ATCACCAG CTGTGCAGC GAGTACCGG AACACCCAG ATTTACACC ATCAACGAC AAGATCCTG AGCTACACC
 E S M A G K R E M V I I T F K S A G T F Q V E V
 3529 GAGTCTATG GCCGGCAAG CGGGAGATG GTGATCATC ACCTTCAAG AGCGCGCC ACCTTTCAG GTGGAAGTG
 P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I T Y
 3601 CCTGGCAGC CAGCACATC GACAGCCAG AAGAAGGCC ATCGAGCGG ATGAAGGAC ACCCTGCGG ATCACCTAC
 L T E T K I D K L C V W N N K T P N S I A A I S
 3673 CTGACCCGAG ACCAAGATC GACAAGCTG TGTGTGTGG AACAAACAAG ACCCCCAAC AGCATCGCC GCCATCTCT
 M E N (SEC ID N°: 4)
 3745 ATGGAGAAC (SEC ID N°: 3)

FIG.2D

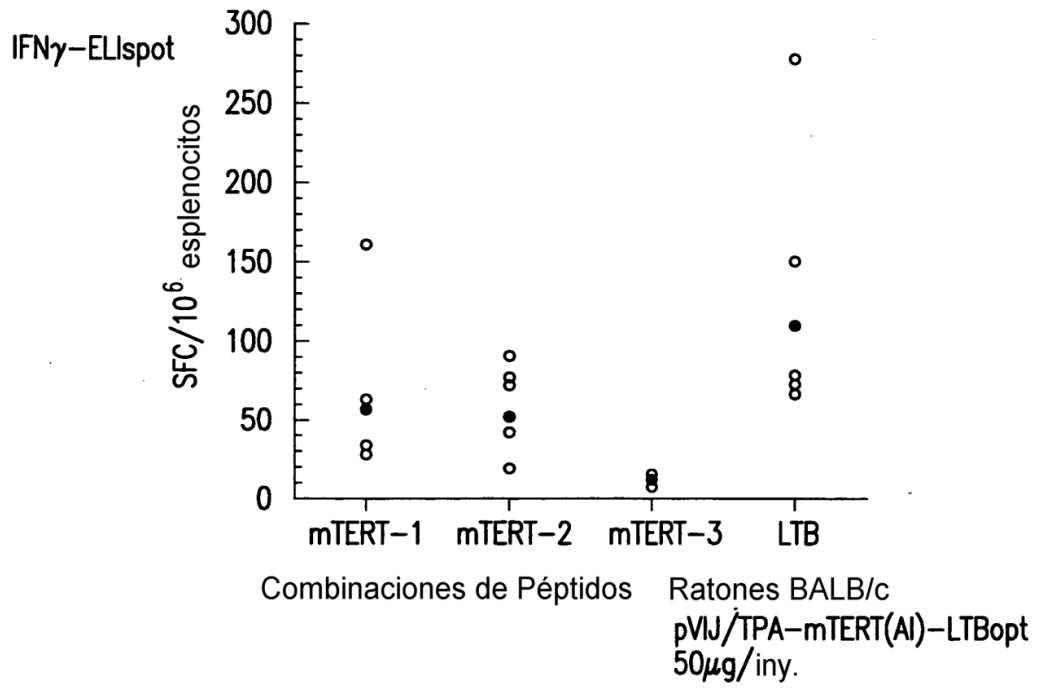


FIG.3

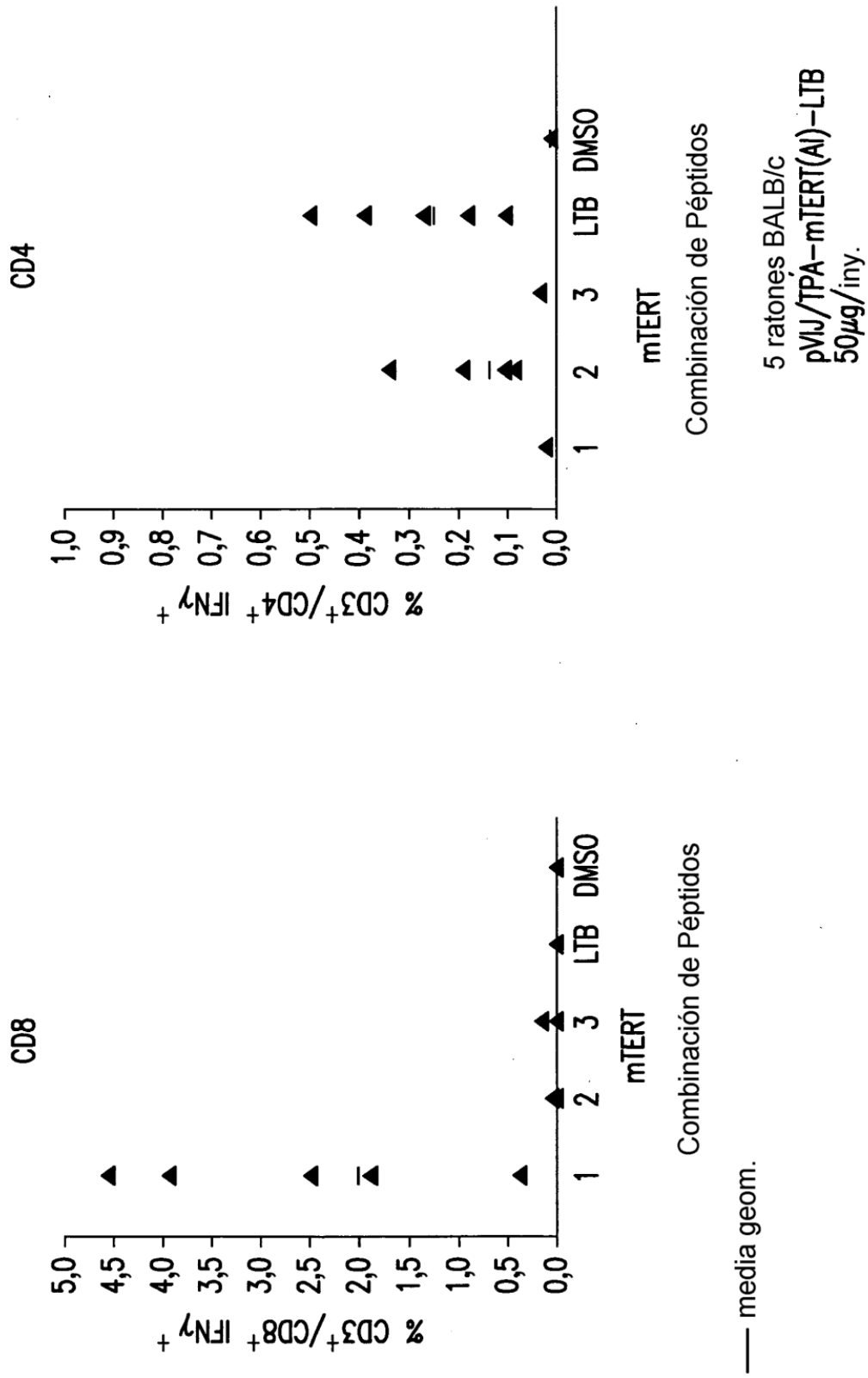


FIG.4

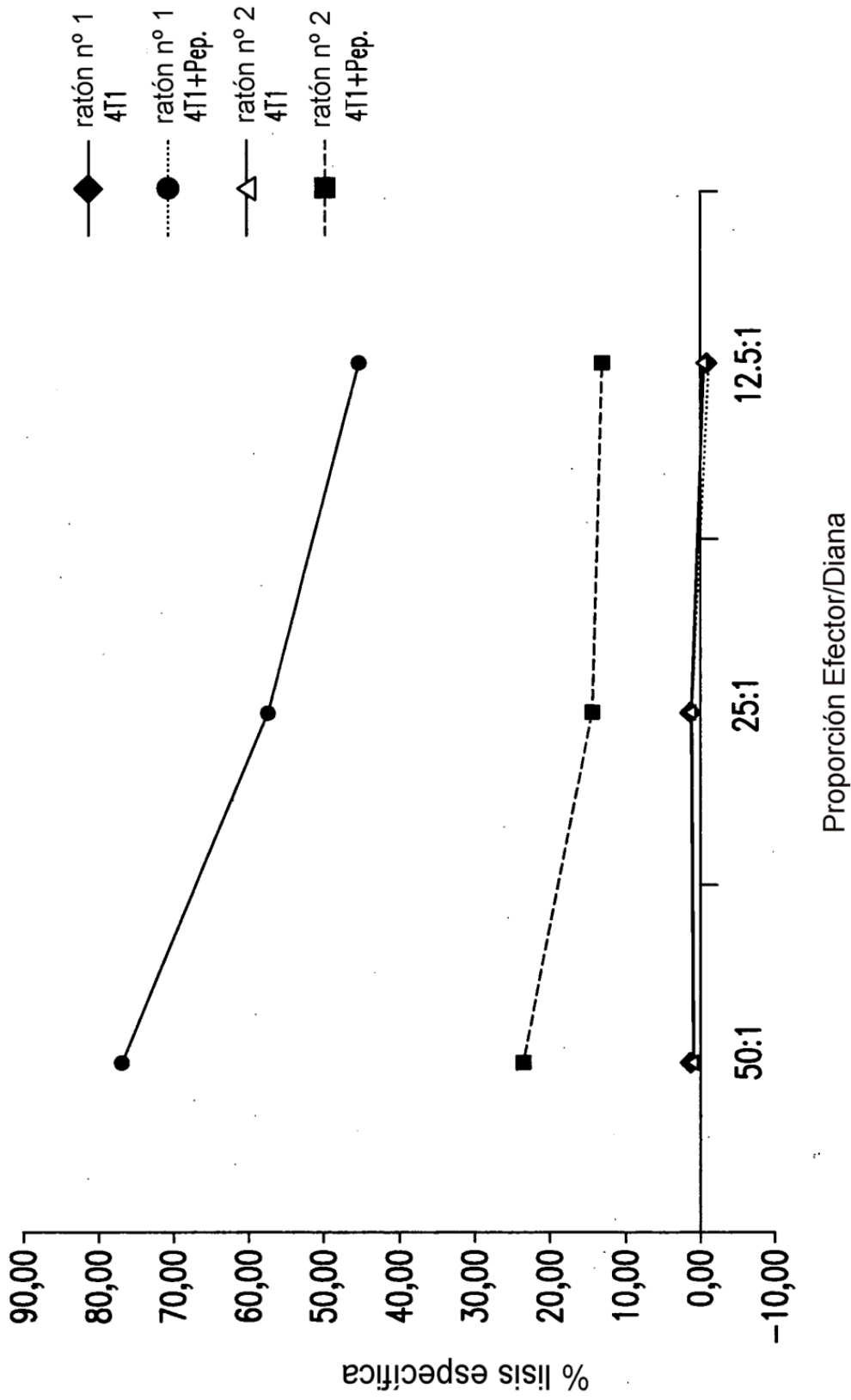
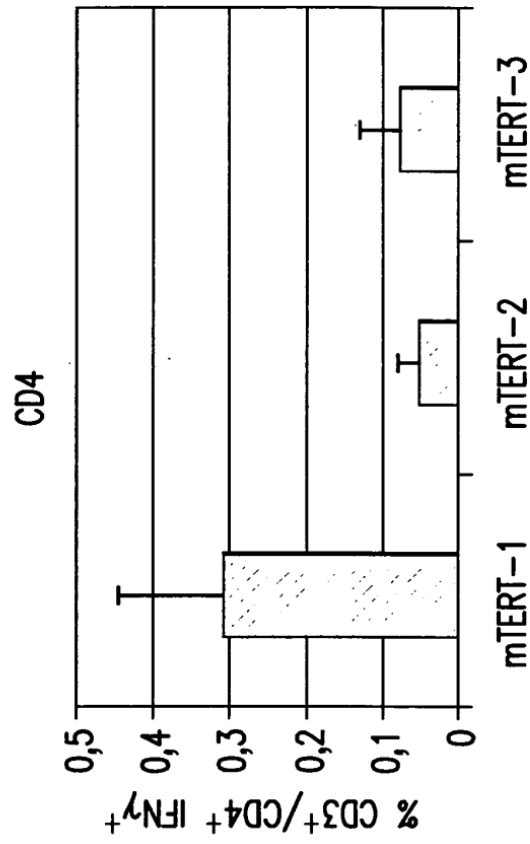
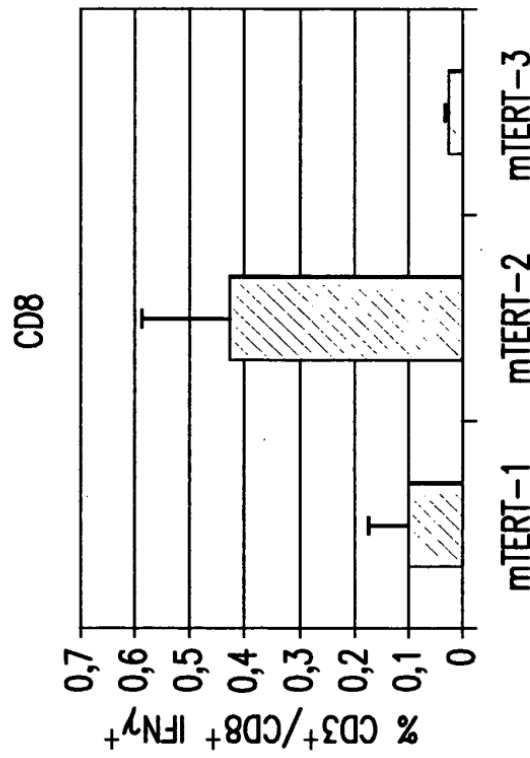


FIG.5



Combinación de Péptidos

FIG.6B



Combinación de Péptidos

FIG.6A

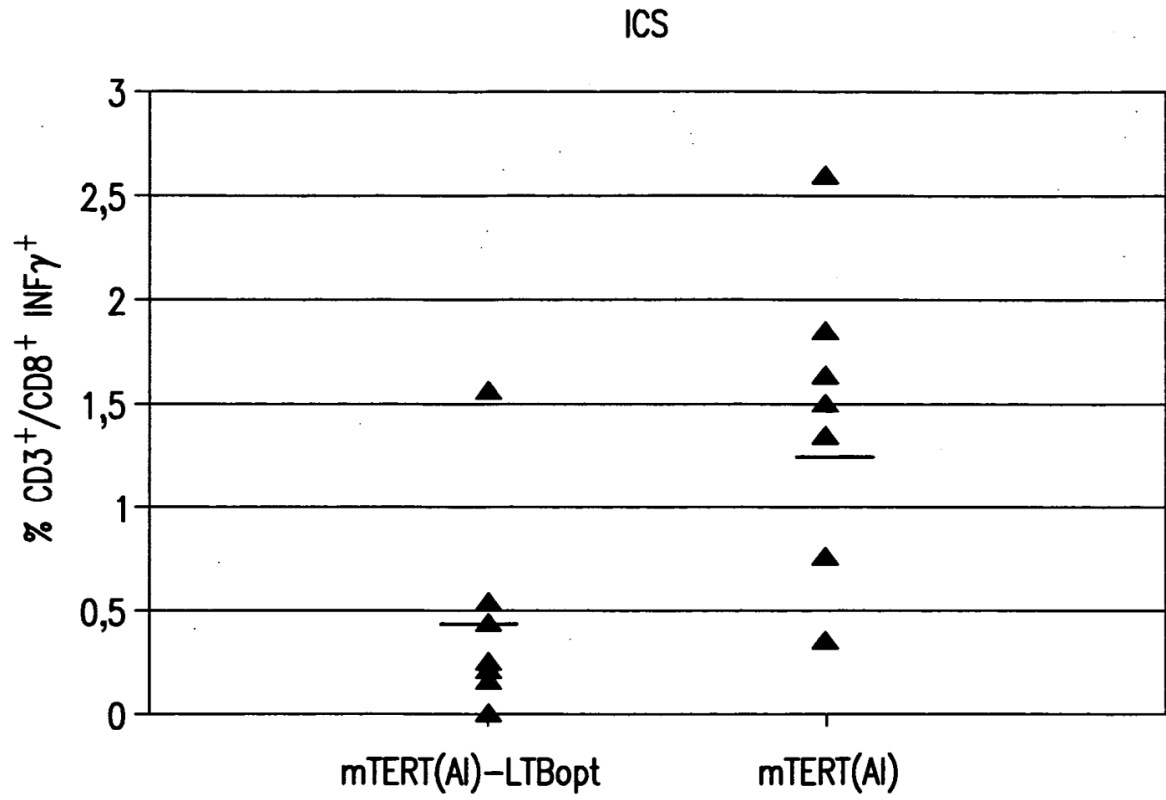
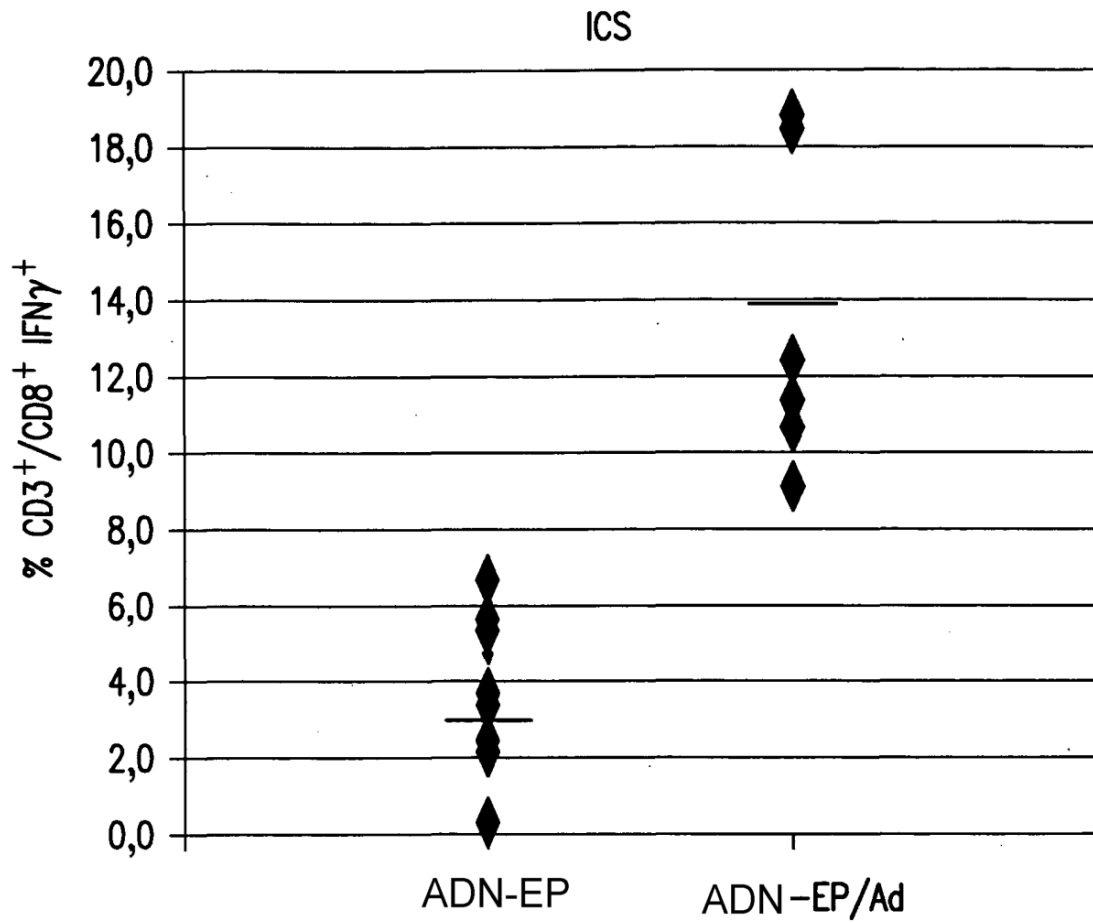


FIG.7



$P < 0,0001$ (Prueba *t* de Student)

FIG.8

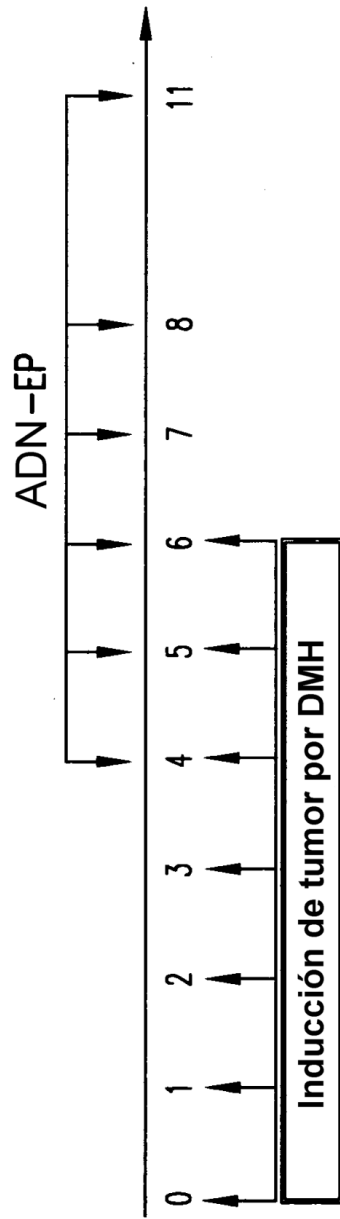


FIG.9

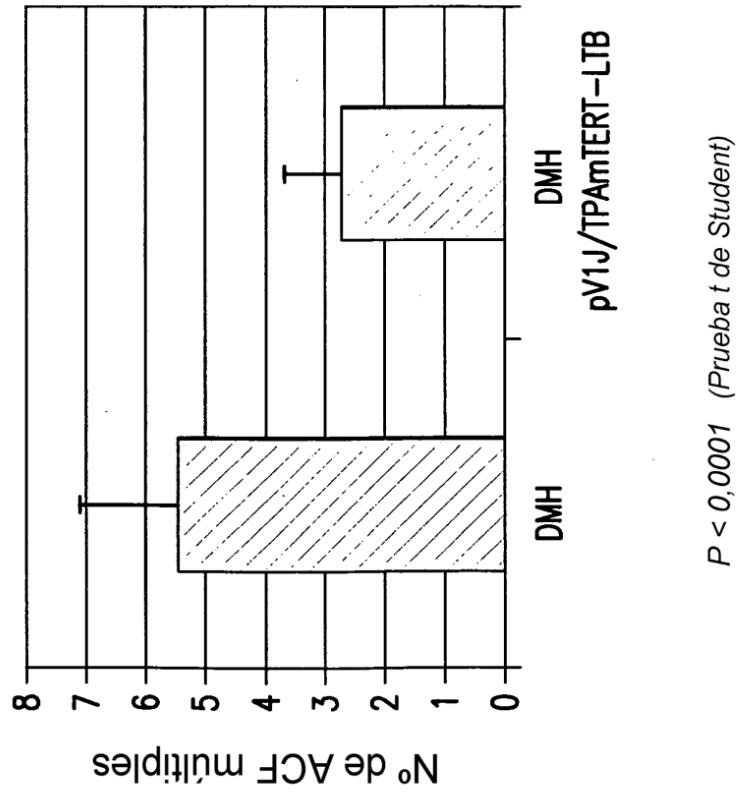
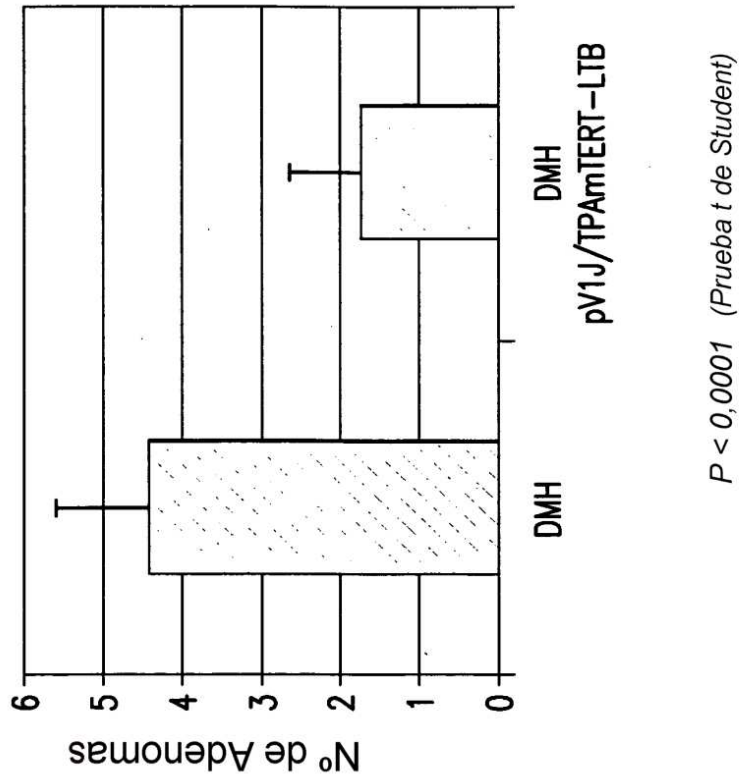


FIG.10

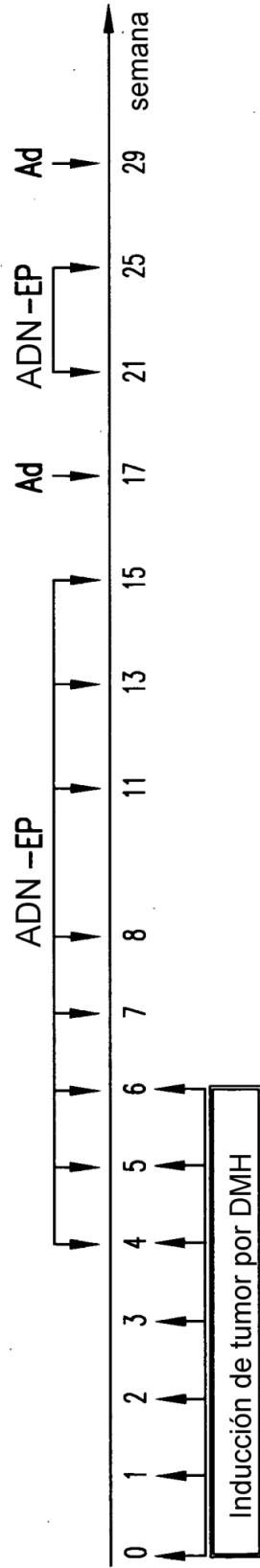
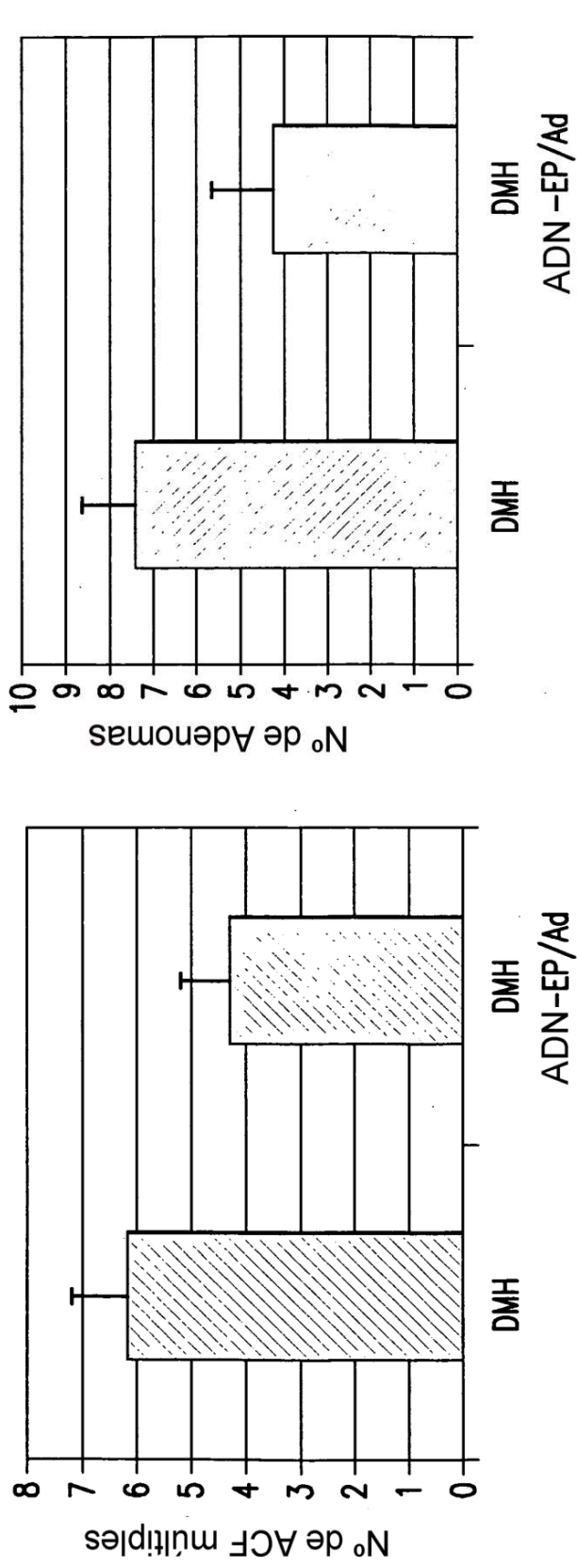
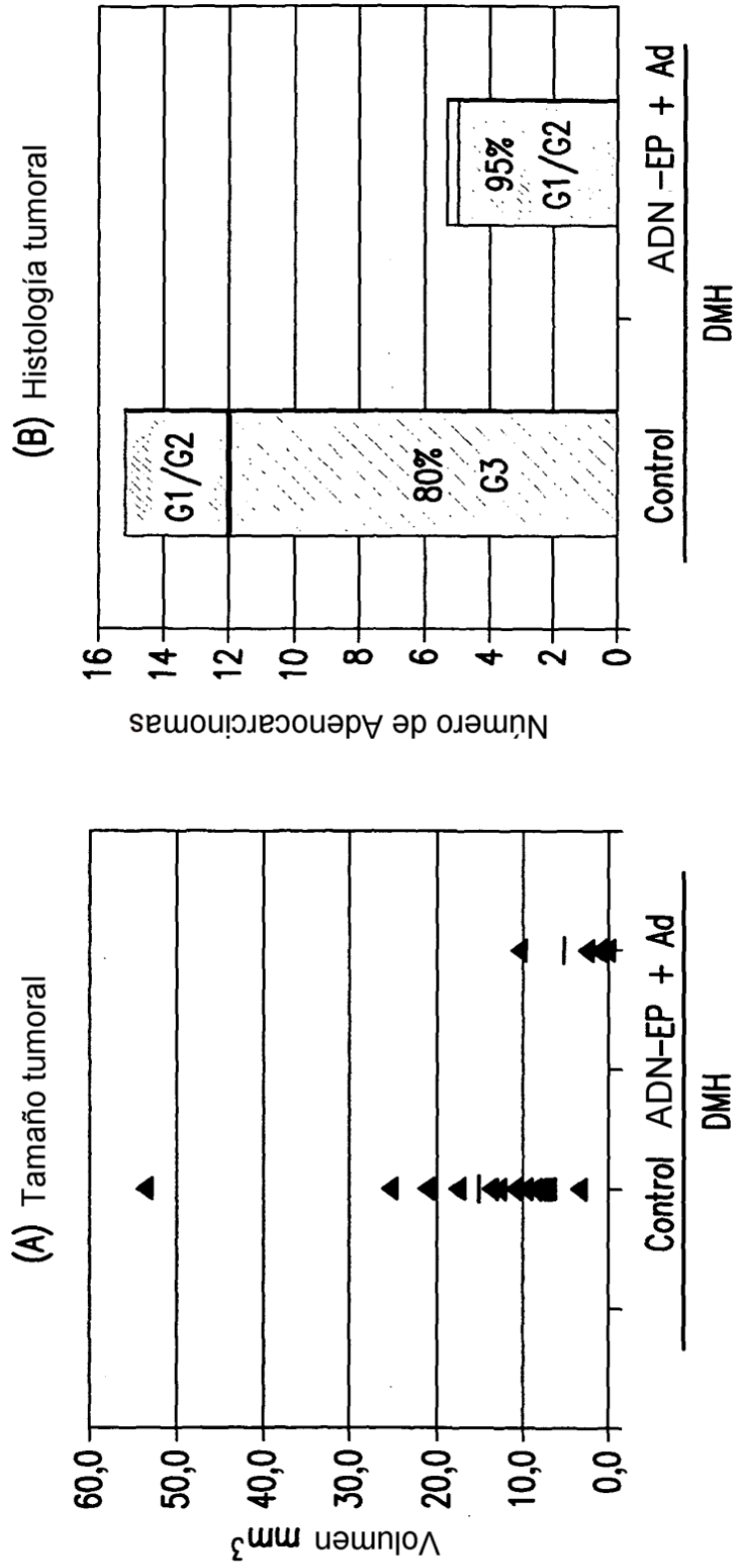


FIG.11



Prueba de Poisson valora valor p unilateral = 0,002 Prueba de Poisson valora valor p unilateral = 0,00003

FIG.12



Prueba de Wilcoxon de medianas de valor p unilateral = 0,016 Prueba de Poisson valora valor p unilateral = 0,033

FIG.13

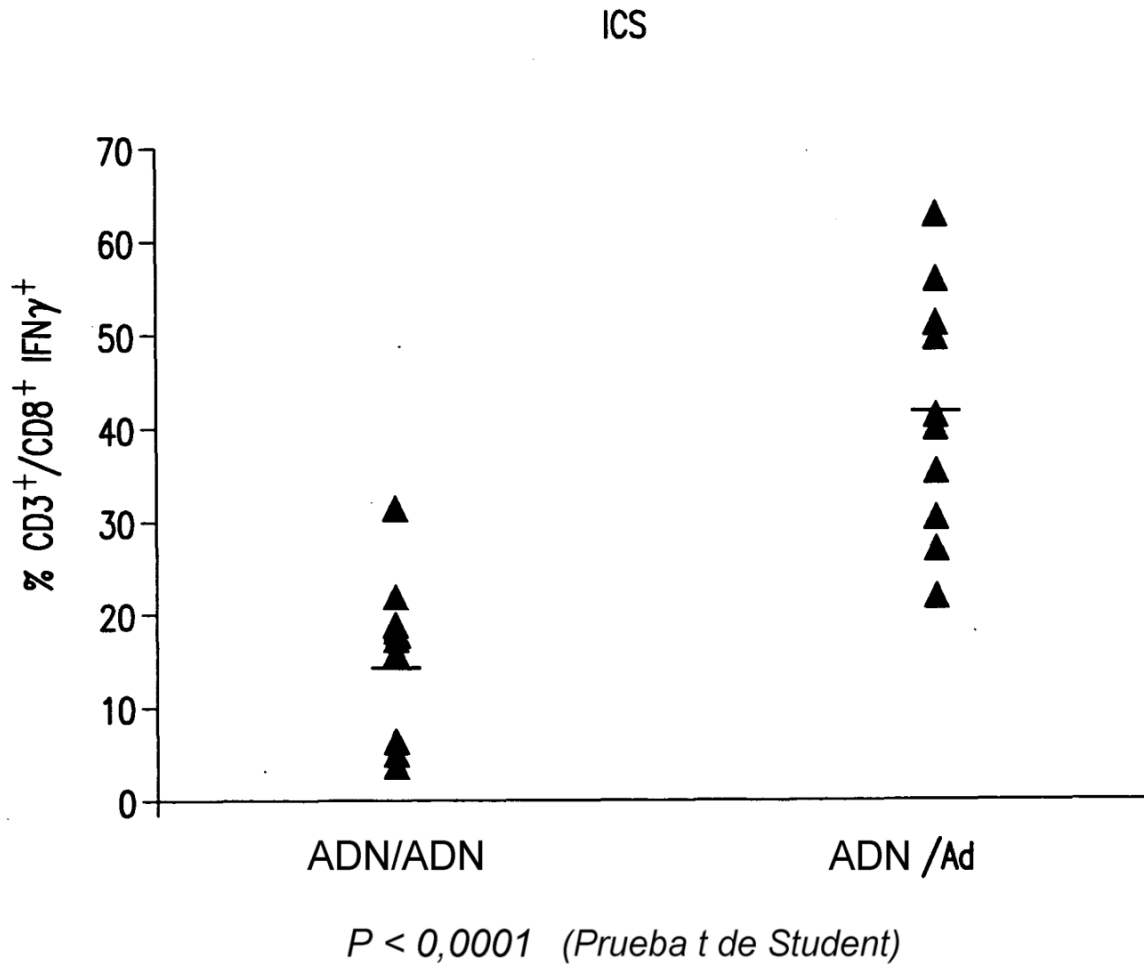


FIG.14

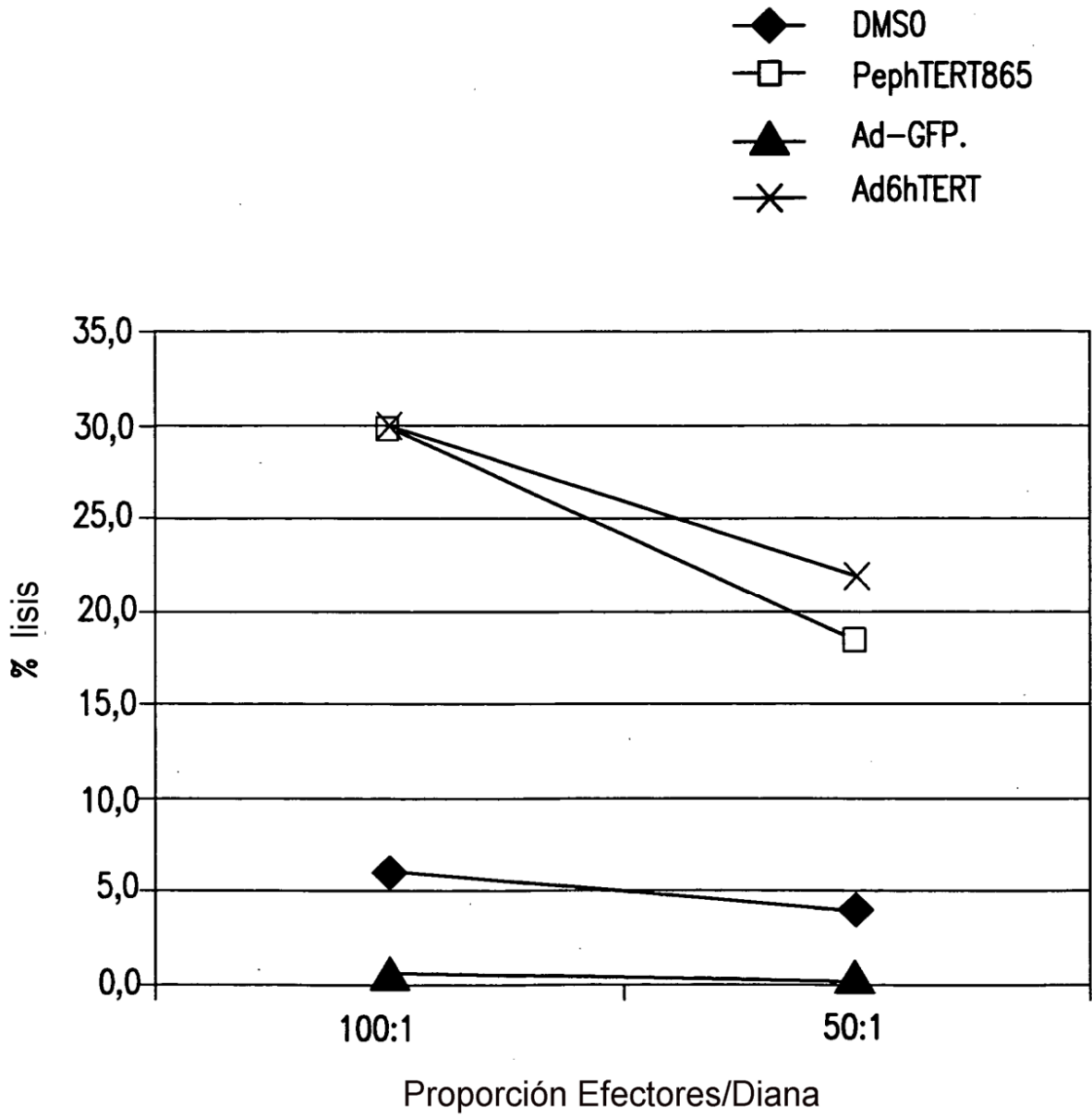


FIG.15

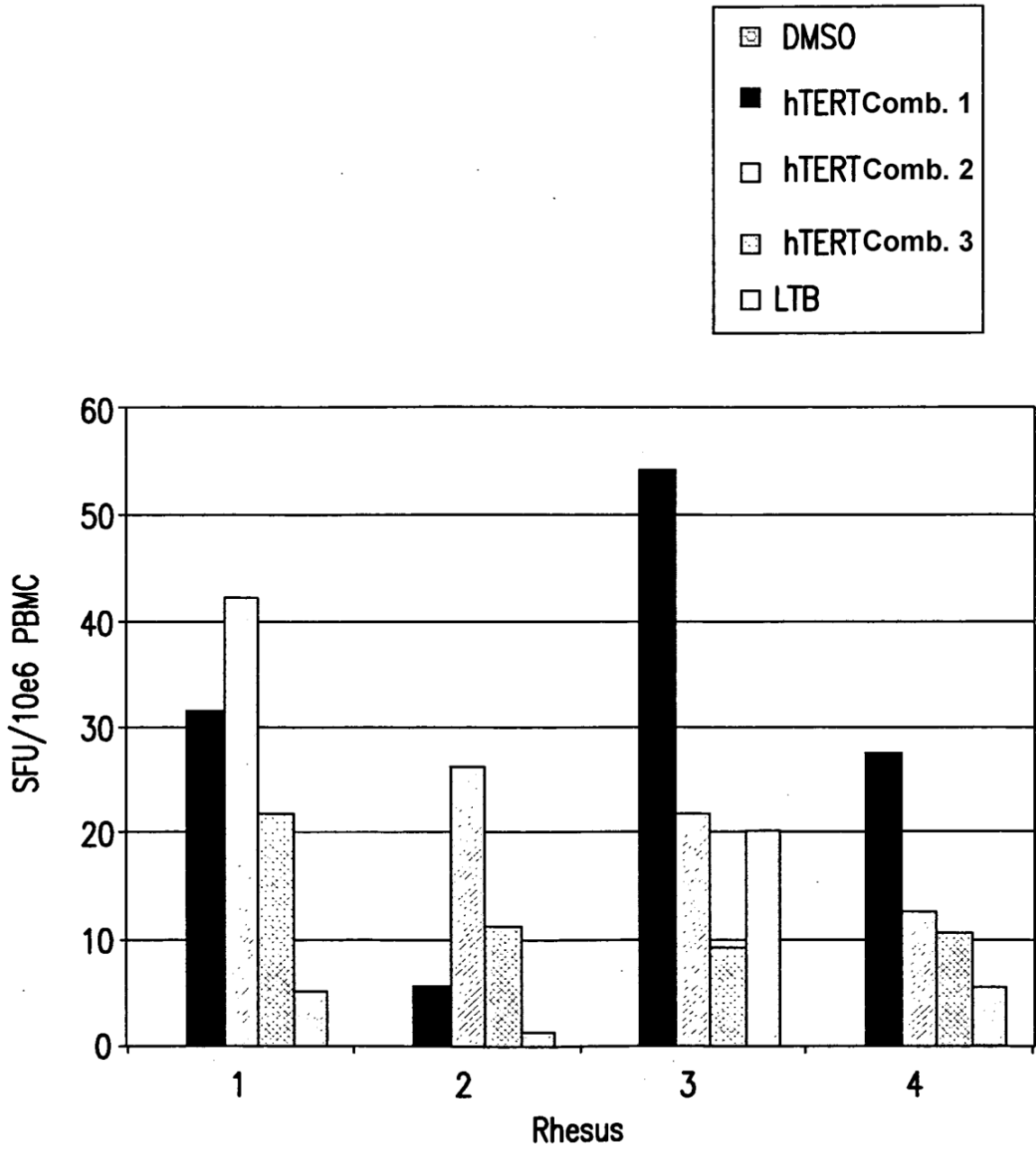


FIG.16A

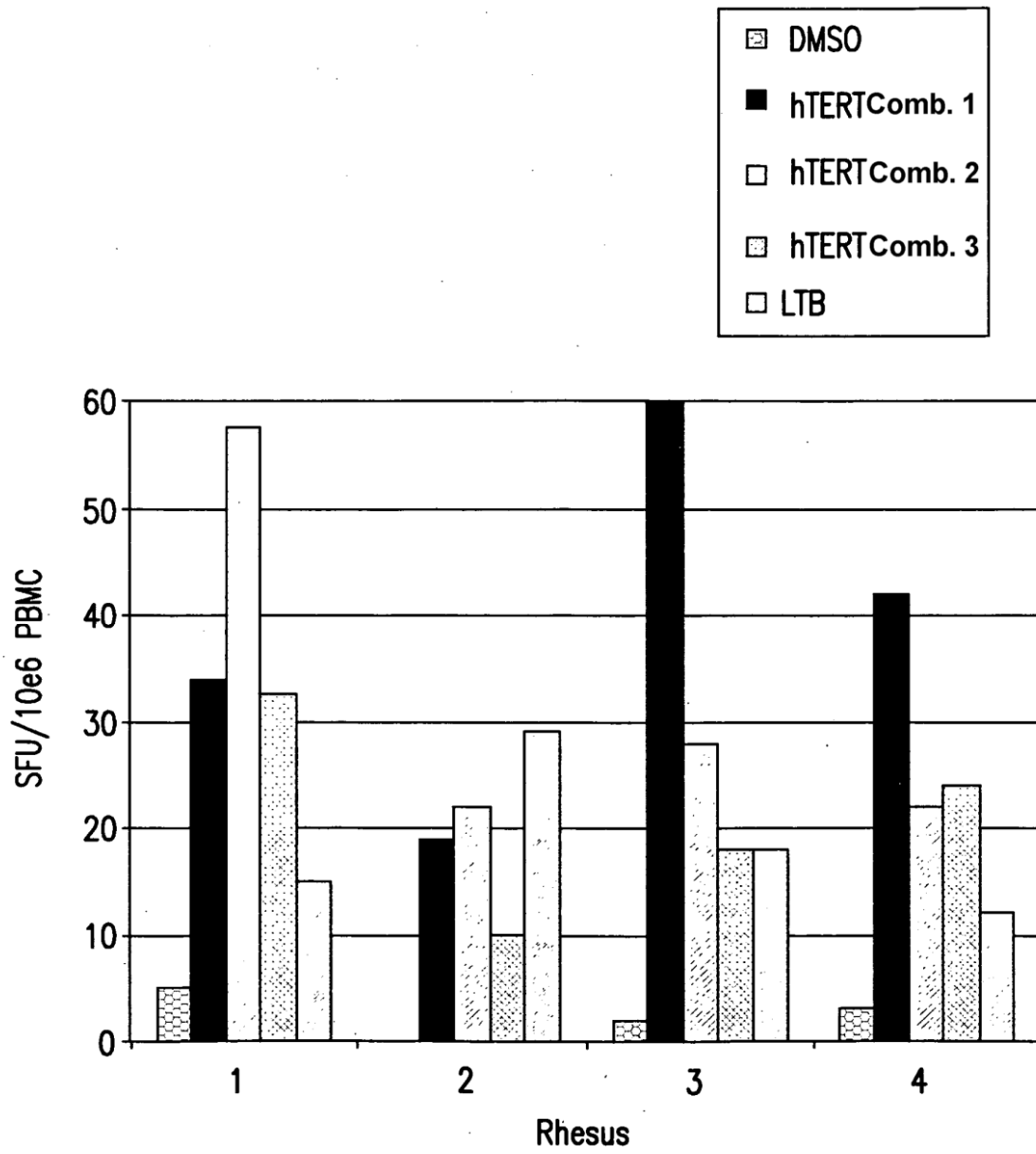


FIG. 16B

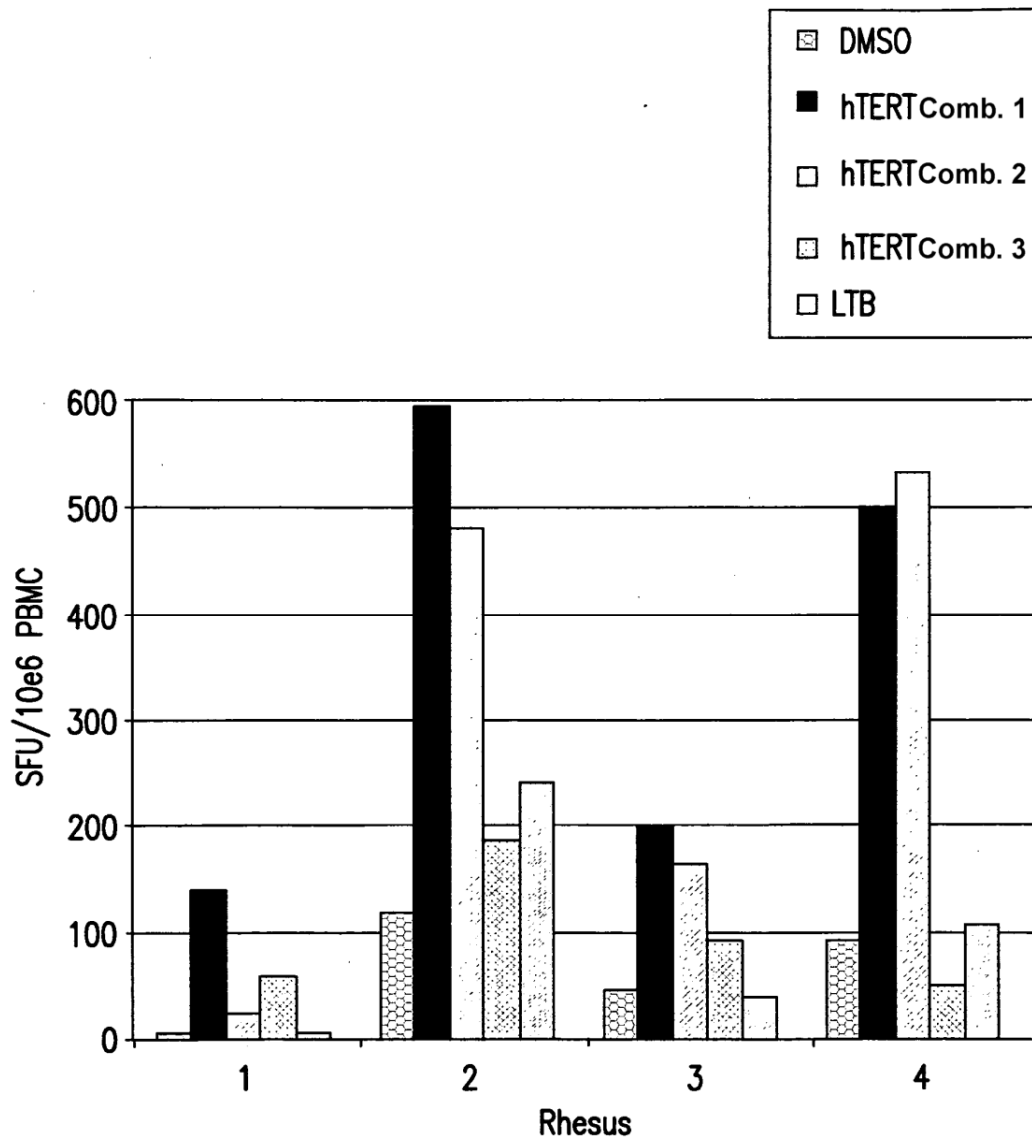


FIG. 17