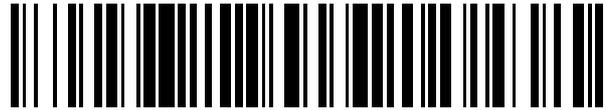


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 372**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07796305 .6**

96 Fecha de presentación: **21.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2035581**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

54 Título: **Composición de ADN contra el antígeno tumoral estromal FAP y métodos de utilización de la misma**

30 Prioridad:

**21.06.2006 US 815316 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**20.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**20.12.2012**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)  
10550 NORTH TORREY PINES ROAD  
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**REISFELD, RALPH, A.;  
LOEFFLER, MARKUS;  
KRÜGER, JÖRG, A. y  
NIETHAMMER, ANDREAS, G.**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 393 372 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

Composición de ADN contra el antígeno tumoral estromal FAP y métodos de utilización de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) codificantes de moléculas adecuadas que resulten eficaces para inducir una respuesta inmunitaria contra las células fibroblásticas estromales en los tumores. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones de ADN codificantes del antígeno estromal conocido como la proteína de activación fibroblástica (FAP). La presente invención se refiere asimismo a métodos de utilización de la composición de ADN para inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis tumorales y para incrementar la incorporación celular de los agentes quimioterapéuticos.

15 **Antecedentes de la invención**

Es cada vez más claro que los antígenos tumorales son dianas evasivas para la terapia del cáncer. Lo anterior puede explicarse a partir una diversidad de características que son únicas de las células tumorales, incluyendo las mutaciones de sus antígenos y una presentación inadecuada de los mismos debido a la regulación negativa de la expresión del antígeno de MHC. Además, los defectos en las rutas de señalización de la apoptosis, así como la regulación positiva de los inhibidores de apoptosis, tales como la survivina, XIAP o los miembros antiapoptóticos de la familia de bcl-2, no sólo proporcionan resistencia frente a la eliminación mediada por células T, sino también un efecto inductor de la apoptosis de los agentes quimioterapéuticos.

Existe un reconocimiento creciente de que el compartimento estromal desempeña un papel crucial en la tumorigénesis y en la invasión tumoral. Se ha demostrado que las células estromales estimulan la transformación de las células epiteliales normales y que intercambian factores de crecimiento, citoquinas y quimioatrayentes para activar la matriz extracelular circundante y para inducir la selección y expansión de las células neoplásicas. En un estudio, las células tumorales inyectadas en los ratones en forma de una suspensión se indica que no son tumorigénicas, mientras que la inyección de fragmentos de tumores sólidos que contienen su estroma se indica que condujo al crecimiento tumoral (ver Singh *et al.*, J. Exp. Med. 175:139-146, 1992). La matriz extracelular activada aparentemente proporciona quimiorresistencia mediada por las integrinas  $\beta 1$ , las cuales se adhieren a la fibronectina, conduciendo a la activación de la tirosina quinasa estimulada por integrina  $\beta 1$ , que a su vez suprime la apoptosis inducida por quimioterapia. Se ha informado de este fenómeno en células de mieloma sensibles a la doxorubicina, las cuales desarrollan resistencia tras adherirse a la fibronectina. Algunos informes recientes indican que el rechazo tumoral puede conseguirse mediante modulación de los fibroblastos estromales tumorales o distribuyendo la red estromal tumoral. Además, los macrófagos y fibroblastos asociados a tumor se informa que contribuyen al ambiente inmunosupresor local debido a su capacidad de sintetizar proteínas, tales como VEGF, TGF- $\beta 1$  e IL-10. El VEGF funciona como inhibidor de la maduración de las células dendríticas y de esta manera conduce a células T tolerantes. El VEGF también es un factor primario implicado en la angiogénesis tumoral. La activación del VEGF conduce a la regulación positiva de la survivina y de muchas otras proteínas inhibitoras de la apoptosis en las células endoteliales tumorales, protegiéndolas de los efectos apoptóticos de la quimioterapia. En contraste, la inhibición de TGF- $\beta 1$  puede resultar en la erradicación tumoral y en la protección frente a la metástasis. IL-10 inhibe la maduración de las células dendríticas y de esta manera suprime las respuestas antitumorales mediadas por las células Th1. Este efecto desplaza las células dendríticas hacia respuestas inmunitarias humorales ineficaces.

Los fibroblastos son células del tejido conectivo que secretan una matriz extracelular rica en colágeno y en otras macromoléculas. Los fibroblastos en el estroma tumoral (es decir, el tejido de soporte al tumor) sintetizan proteína de activación fibroblástica (FAP), una proteína transmembranal de tipo II que funciona como serina proteasa. FAP se sobreexpresa selectivamente en más del 90% de los fibroblastos estromales asociados a carcinomas de colon, mama y pulmón. La sobreexpresión transitoria de FAP también puede observarse durante la cicatrización de heridas y en algunos tejidos mesenquimales fetales. Además, dicho enzima se informa que corta la gelatina y el colágeno de tipo I, y se cree que participa en el remodelado de la matriz extracelular. Se informa de que la sobreexpresión de FAP conduce a la estimulación del crecimiento tumoral e incrementa el potencial metastásico, mientras que el tratamiento con anticuerpos anti-FAP inhibe el crecimiento tumoral. Además, la expresión estromal tumoral de colágeno de tipo I, que es producido principalmente por los fibroblastos, presenta una correlación inversa con la incorporación intratumoral de diversos compuestos, incluyendo agentes quimioterapéuticos, sosteniendo de esta manera la participación del compartimento estromal en la resistencia a la quimioterapia.

Se han utilizado vacunas para proporcionar una protección a largo plazo frente a varias enfermedades mediante la administración muy limitada de un agente profiláctico que estimula el sistema inmunitario de un organismo a la destrucción de patógenos de la enfermedad antes de que puedan proliferar y provocar un efecto patológico. Se describen diversos enfoques a las vacunas y vacunaciones en Bernard R. Glick y Jack J. Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, segunda edición, ASM Press, páginas 253 a 276, 1998.

5 La vacunación es un medio para inducir que el propio sistema inmunitario del cuerpo busque y destruya un agente infeccioso antes de que provoque una respuesta patológica. Típicamente las vacunas son agentes infecciosos (virus o bacterias) vivos, aunque atenuados, o una forma muerta del agente. Una vacuna que consista de bacterias o virus vivos debe ser no patogénica. Típicamente un cultivo bacteriano o vírico se atenúa (debilita) mediante tratamiento físico o químico. Aunque el agente es no virulento, todavía puede inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto tratado con la vacuna.

10 Una respuesta inmunitaria resulta inducida por antígenos, que pueden ser macromoléculas específicas o un agente infeccioso. Estos antígenos son generalmente proteínas, polisacáridos, lípidos o glucolípidos, que resultan reconocidos como "foráneos" por los linfocitos conocidos como células B y células T. La exposición de ambos tipos de linfocito a un antígeno induce una rápida división celular y respuesta de diferenciación, resultando en la formación de clones de los linfocitos expuestos. Las células B producen células plasmáticas, que a su vez producen proteínas denominadas anticuerpos (Ab), que se unen selectivamente a los antígenos presentes sobre el agente infeccioso, neutralizando o inactivando de esta manera el patógeno (inmunidad humoral). En algunos casos, las células B requieren la ayuda de las células T ayudantes CD4.

20 El clon de células T especializadas que se forma en respuesta a la exposición al antígeno es un linfocito T citotóxico (CTL), que es capaz de unirse y eliminar patógenos y tejidos que presentan el antígeno (inmunidad celular o mediada por células). En algunos casos, una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica, envolverá un patógeno u otra célula foránea mediante endocitosis. La APC seguidamente procesa los antígenos de las células y presenta estos antígenos en forma de un complejo de molécula de histocompatibilidad:péptido al receptor de células T (TCR) sobre las CTL, estimulando de esta manera una respuesta inmunitaria.

25 La inmunidad humoral, caracterizada por la formación de anticuerpos específicos, generalmente resulta más eficaz contra infecciones bacterianas agudas e infecciones repetidas de virus, mientras que la inmunidad mediada por células resulta más eficaz contra la infección vírica, la infección bacteriana intracelular crónica y la infección fúngica. La inmunidad celular también es conocida que protege frente a determinados cánceres y es responsable del rechazo de los trasplantes de órganos.

30 Los anticuerpos de antígenos de infecciones anteriores siguen siendo detectables en la sangre durante periodos de tiempo muy largos, proporcionando de esta manera un medio para determinar la exposición previa a un patógeno. Tras la reexposición al mismo patógeno, el sistema inmunitario impide eficazmente la reinfección mediante la eliminación del agente patogénico antes de que pueda proliferar y producir una respuesta patogénica.

35 La misma respuesta inmunitaria que resultaría inducida por un patógeno en ocasiones puede ser producida por un agente no patogénico que presente el mismo antígeno que el patógeno. De esta manera, el sujeto puede protegerse frente a la exposición posterior al patógeno sin que se haya enfrentado previamente a la infección.

40 Sin embargo, no todos los agentes infecciosos pueden cultivarse e inactivarse con facilidad, tal como se requiere para la formulación de una vacuna. Las técnicas modernas de ADN recombinante han permitido construir nuevas vacunas, buscando superar dicha limitación. Pueden crearse agentes infecciosos que no presentan los genes patogénicos, permitiendo de esta manera utilizar como vacuna una forma viva no virulenta del organismo. También resulta posible construir un organismo relativamente no patogénico, tal como *E. coli*, para presentar los antígenos de superficie celular de un portador patogénico. El sistema inmunitario de un sujeto vacunado con dicho portador transformado se "engaña" para que produzca anticuerpos contra el patógeno. Las proteínas antigénicas de un agente patogénico pueden modificarse y expresarse en una especie no patogénica, y las proteínas antigénicas pueden aislarse y purificarse para producir una "vacuna de subunidades". Las vacunas de subunidades presentan la ventaja de ser estables, seguras y químicamente bien definidas; sin embargo, su producción puede presentar un coste prohibitivo.

50 En los últimos años ha surgido un nuevo enfoque a las vacunas, denominado ampliamente "inmunización genética". En este enfoque, un ácido nucleico (polinucleótido) codificante de un antígeno de un agente patogénico se inserta operablemente en las células en el sujeto que debe inmunizarse. Las células tratadas, preferentemente células presentadoras de antígenos (APC), tales como las células dendríticas, se transforman y producen las proteínas antigénicas del patógeno. Estos antígenos producidos *in vivo* seguidamente pueden desencadenar la respuesta inmunitaria deseada en el huésped. El material genético utilizado en dichas vacunas genéticas puede ser un constructo de ADN o de ARN. Con frecuencia, el polinucleótido codificante del antígeno se introduce en combinación con otras secuencias polinucleótidas promotoras para incrementar la inserción, replicación o expresión del gen.

60 Las vacunas de ADN codificantes de genes de antígeno pueden introducirse en las células huésped del sujeto mediante una diversidad de sistemas de administración. Entre estos sistemas de administración se incluyen los sistemas de administración procarióticos y víricos. Por ejemplo, un enfoque es utilizar un vector vírico, tal como el virus Vaccinia, que incorpore el nuevo material genético para inocular las células huésped. Alternativamente, el material genético puede incorporarse en un vector plásmido o puede administrarse directamente en las células huésped en forma de polinucleótido "desnudo", es decir, simplemente como ADN purificado. Además, el ADN puede transfectarse establemente en bacterias atenuadas, tales como *Salmonella typhimurium*. Al vacunar oralmente un

paciente con la *Salmonella* transformada, las bacterias se transportan a las placas de Peyer en el intestino (es decir, tejidos linfoides secundarios), que seguidamente estimulan una respuesta inmunitaria.

Las vacunas de ADN proporcionan una oportunidad de inmunización frente a enfermedades que no son causadas por patógenos tradicionales, tales como enfermedades genéticas y el cáncer. Típicamente, una vacuna genética para el cáncer introduce en las APC un gen que codifica un antígeno, y las APC transformadas de esta manera producen antígenos de un tipo específico de célula tumoral. Una vacuna general eficaz contra varios tipos de cáncer puede implicar, de esta manera, numerosas vacunas individuales para cada tipo de célula cancerosa contra la que se debe inmunizar.

Sigue existiendo una necesidad de una composición de ADN generalmente eficaz, tal como una vacuna, para la inmunización contra diversas formas de cáncer. La presente invención satisface esta necesidad.

### Sumario de la invención

Una composición de ADN eficaz para inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis tumorales que comprende un constructo de ADN que codifica por lo menos un epítipo de proteína de activación fibroblástica (FAP), que es expresable en células inmunitarias de un sujeto en el que se ha administrado el constructo de ADN. El constructo de ADN se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable. La composición puede codificar un único epítipo de FAP, un polipéptido que comprende dos o más epítipos de FAP, la proteína FAP completa, o cualquier parte de la misma que induzca la respuesta inmunitaria deseada contra células tumorales estromales. Preferentemente, el constructo de ADN codifica FAP humana que presenta la secuencia de residuos aminoácidos que consiste de la secuencia SEC ID nº 2 ó una proteína que presenta una similitud de secuencias de por lo menos 80% con la SEC ID nº 2 y que incluye por lo menos un epítipo de FAP.

El constructo de ADN puede ser un constructo de ADN desnudo, preferentemente en forma de un plásmido. Dichos constructos de ADN desnudo pueden incorporarse en un vehículo de administración de liposomas, un vehículo de administración polimérico, mediante electroporación, con pistola génica y similares, si se desea. En algunas formas de realización preferidas, el constructo de ADN se incorpora en un vector vírico atenuado o en un vector bacteriano atenuado.

En una forma de realización preferida, el constructo de ADN se incorpora en un vector bacteriano atenuado, tal como una *Salmonella typhimurium* atenuada, más preferentemente la cepa doblemente atenuada (AroA<sup>-</sup>, dam<sup>-</sup>) de *Salmonella typhimurium*.

Opcionalmente, la composición de ADN también puede comprender un constructo de ADN codificante de una proteína efectora inmunitaria, tal como una citoquina. Entre las citoquinas preferentes se incluyen CCL21, IL-2 y CD40LT.

Las composiciones de ADN de la presente invención pueden actuar como vacunas dirigidas al antígeno fibroblástico tumoral estromal FAP, que sirve como diana para la inmunoterapia del cáncer mediada por células T. Los fibroblastos estromales son células no transformadas presentes en el ambiente tumoral, que proporcionan soporte al crecimiento del tumor. El enfoque de utilizar como diana FAP expresada por células fibroblásticas estromales presenta varias ventajas frente a las terapias dirigidas contra antígenos que únicamente expresan las células tumorales. En primer lugar, los fibroblastos estromales son genéticamente más estables que las poblaciones celulares tumorales heterogéneas de mutación frecuente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la expresión del antígeno diana sigue siendo más estable y sirve como diana más fiable para la inmunoterapia. En segundo lugar, la presentación de antígeno por los fibroblastos estromales al complejo de receptor de células T no resulta alterada por la regulación negativa de la expresión de antígeno del MHC, tal como ocurre con frecuencia en las células tumorales. En tercer lugar, las células tumorales con frecuencia adquieren resistencia a la eliminación mediada por células T debido a defectos en la rutas de señalización de la apoptosis, la regulación positiva de las proteínas antiapoptóticas o los efectos inmunosupresores de las CTL. Además, con la diana en FAP, que se sobreexpresa específicamente en el compartimiento estromal en más de 90% de los carcinomas de colon, mama y pulmón, permite producir una composición terapéutica para tratar varios tumores malignos diferentes, en contraste con las terapias que incluyen antígenos que únicamente expresan tipos tumorales específicos.

En una forma de realización preferida, las composiciones de ADN de la presente invención rompen la tolerancia periférica de las células T frente al autoantígeno FAP mediante la administración de su ADNc en forma de una composición oral de ADN con un vector de administración bacteriano atenuado (por ejemplo una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*) a células presentadoras de antígenos en un órgano linfoide secundario, es decir en las placas de Peyer del intestino delgado. En un enfoque profiláctico, la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por células T inducida por la vacunación con una composición de ADN de la invención inhibió el crecimiento tumoral en dos modelos de tumor murino diferentes: en carcinoma de colon CT26 resistente a múltiples fármacos y en carcinoma de mama D2F2 resistente a múltiples fármacos. Las presentes composiciones de ADN también suprimieron significativamente la diseminación de las metástasis pulmonares establecidas en un modelo terapéutico de carcinoma de colon CT26.

Una composición de ADN preferente comprende un portador atenuado de *Salmonella*, que es la cepa doblemente atenuada de *S. typhimurium* denominada RE 88 y que incluye las mutaciones *dam*<sup>-</sup> y *AroA*<sup>-</sup>, disponibles de Remedyne Corporation (Santa Barbara, CA). El portador *Salmonella* atenuado incluye ADN codificante de por lo menos un epítipo de FAP que es expresable en células inmunitarias. La bacteria misma no expresa FAP sino que más bien transporta el ADN de FAP hasta las células inmunitarias (por ejemplo macrófagos y células dendríticas), que a su vez expresan la FAP. Dichas composiciones pueden prolongar los efectos antitumorales durante hasta 10 meses y también pueden conseguir una acusada regulación positiva de marcadores de activación de las células T, NK y DC en modelos murinos. Además, algunos experimentos *in vivo* de reducción de las células T han apuntado a una participación de únicamente las células T CD8<sup>+</sup> pero no de las células T CD4<sup>+</sup>. El efecto citotóxico *in vitro* mediado por las células T CD8<sup>+</sup> se dirigen específicamente contra células diana que sobreexpresan el antígeno FAP. Por ejemplo, en un experimento de prueba de concepto, las células T CD8<sup>+</sup> de ratones vacunados con una composición de la invención indujeron *in vitro* la lisis citotóxica de células tumorales manipuladas para sobreexpresar FAP, lo que indica una respuesta inmunitaria específica contra FAP. Inesperadamente, aunque también se ha observado que FAP puede sobreexpresarse transitoriamente durante la cicatrización de heridas, no se observó ninguna alteración de la cicatrización de heridas provocada por la vacunación con las composiciones de ADN de la invención.

Las composiciones de ADN de la presente invención también pueden incorporar constructos de ADN que codifican moléculas efectoras inmunitarias como adyuvantes para la composición. Entre dichas moléculas efectoras inmunológicas se incluyen, por ejemplo, IL-2, un inductor de la proliferación de las células, CCL21, una quimoquina que atrae químicamente las células dendríticas maduras y células T no expuestas, y CD40LT, un inductor conocido de la maduración de las células dendríticas. Los ácidos nucleicos codificantes de la proteína efectora inmunitaria preferentemente se incorporan en un plásmido. Los constructos de FAP y ADN de proteína efectora inmunitaria pueden incorporarse en el mismo plásmido o en dos plásmidos separados. La respuesta de CTL inducida contra los fibroblastos tumorales estromales puede inhibir el crecimiento de una diversidad de tumores y no es específica de un tipo tumoral particular.

La presente invención proporciona además un método para inhibir el crecimiento tumoral y las metástasis tumorales en un mamífero, que comprende administrar en un mamífero una composición de ADN de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra las células tumorales estromales que presentan el antígeno FAP.

Otro aspecto de la presente invención es un régimen terapéutico de una combinación eficaz que implica administrar un agente quimioterapéutico conjuntamente con una composición de ADN de la invención. En dicha forma de realización de un método de la presente invención, diversos agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina, paclitaxel y/o ciclofosfamida, que no provocan la supresión de la médula ósea al administrarlos a la dosis máxima tolerable (DMT), se administran en el paciente conjuntamente con una composición de ADN de la invención que comprende un constructo de ADN que codifica FAP o una parte inmunogénica de la misma. La combinación de una composición de ADN de FAP de la invención con dicho fármacos ofrece una ventaja adicional, que es la regulación negativa de la expresión del colágeno de tipo I y en consecuencia la mayor incorporación intratumoral de diversos agentes quimioterapéuticos y de otros compuestos. Las composiciones de ADN de la presente invención conducen a una mayor incorporación por parte de las células tumorales de una diversidad de moléculas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los agentes quimioterapéuticos antitumorales. Por ejemplo, el pigmento de bajo peso molecular fluoresceína (376 Da), el compuesto de alto peso molecular albúmina-azul de Evans (68.500 Da) y el agente quimioterapéutico antitumoral 5-fluorouracilo (5-FU, 130 Da), fueron todos incorporados por células tumorales a niveles mucho mayores en ratones tratados con una composición de ADN de la invención que los ratones tratados con una composición de control inactiva. La combinación de una composición de ADN de la invención y el fármaco antitumoral doxorubicina indujo el rechazo completo de tumores de mama cultivados ortotópicamente en 50% de los ratones tratados con la presente terapia de combinación. El rechazo completo de los tumores no se observó en los ratones tratados con una composición de ADN sola o de doxorubicina sola.

Un método preferido proporciona medios para incrementar la incorporación de un agente quimioterapéutico en un mamífero. El método comprende administrar en un mamífero una composición de ADN de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra células en el mamífero que presentan el antígeno FAP y después administrar en el mamífero una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

Otra forma de realización preferida de método es un método de inhibición del crecimiento tumoral o de las metástasis tumorales en un mamífero, que comprende las etapas de administrar en un mamífero una composición de ADN de la invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra células en el mamífero que presentan el antígeno FAP y posteriormente administrar en el mamífero una cantidad eficaz antitumoral de un agente quimioterapéutico antitumoral.

Preferentemente, los mamíferos tratados mediante los métodos de la presente invención son seres humanos.

En las formas de realización de métodos de la presente invención, las composiciones de ADN pueden administrarse

por vía entérica, tal como mediante administración oral, o por vía parenteral, tal como mediante inyección o mediante infusión intravenosa. Preferentemente las composiciones se administran por vía oral. Las composiciones pueden empaquetarse en recipientes sellados y etiquetarse con información útil para el médico para la administración efectiva de la composición.

5 Las composiciones de ADN de la presente invención resultan útiles para el tratamiento y la prevención de varios estados de enfermedad. Por ejemplo, un paciente que sufre cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, y similares, puede beneficiarse de la inmunización con las composiciones de la presente invención.

## 10 Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 es una caracterización de un constructo de ADN de FAP murina y de líneas celulares tumorales quimiorresistentes. El panel A ilustra un ADNc plasmídico codificante de la FAP murina completa, insertada en el sitio EcoRI del vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO (pFAP). El panel B muestra que la expresión de la proteína FAP se demostró mediante transferencia western tras la transfección transitoria de las células CT26. El panel C muestra células de carcinoma de colon CT26 y de mama D2F2 tratadas con diversos agentes quimioterapéuticos a las concentraciones indicadas. Tras 48 horas de incubación, se evaluó la apoptosis nuclear mediante tinción con el pigmento Hoechst-33342. Las barras indican medias más desviación estándar de 3 ensayos.

20 Las figs. 2a a 2c ilustran el efecto de la composición de ADN basada en FAP sobre el crecimiento tumoral. Contexto profiláctico: 10 días después de las últimas 3 vacunaciones a intervalos de 1 semana, llevadas a cabo tal como se indica en la sección de Materiales y Métodos, se retaron ratones BALB/c (n=8) mediante inyección subcutánea (s.c.) con una dosis letal de  $3 \times 10^4$  células CT26 (figura 2a) u ortotópicamente (o.t.) con una dosis letal de  $3 \times 10^5$  células D2F2 (figura 2b). Se ilustra el crecimiento tumoral medio de 8 ratones, media  $\pm$  SE,  $P < 0,01$ . Contexto terapéutico: en primer lugar los ratones BALB/c (n=8) recibieron inyecciones intravenosas (i.v.) de  $10^5$  células CT26 y se trataron 3 y 10 días después, tras el establecimiento de metástasis pulmonares. Tras 18 días, se extirparon los pulmones y se pesaron (el peso pulmonar normal era de aproximadamente 0,2 g), se examinaron para metástasis y se puntuaron en una evaluación visual. Se evaluó el porcentaje de superficie pulmonar cubierto con metástasis fusionadas, del modo siguiente: 0=0%, 1= $<20\%$ , 2= $20$  a  $50\%$ , 3= $>50\%$ ,  $P < 0,01$  (figura 2c).

30 La figura 3 ilustra la citotoxicidad inducida por las células T CD8<sup>+</sup>. (A) Se ilustra el efecto sobre la duración de vida, de la reducción mediada por anticuerpos durante la etapa efectora en ratones tratados (\* indica significancia estadística en comparación con el grupo de control,  $p < 0,01$ ). (B) Se purificaron células T CD8<sup>+</sup> a partir de bazo de ratones tratados, estimulados con células diana tumorales irradiadas con rayos  $\gamma$  y después se incubaron durante 48 horas con células CT26 transfectadas con pGFP o con pGFP/pFap. Se evaluó la apoptosis nuclear mediante tinción con el pigmento Hoechst-33342, del modo siguiente: estadio 0 de apoptosis nuclear: apoptosis nula; estadio 1: condensación a gran escala de la cromatina; estadio 2a: fragmentación de la cromatina; estadio 2b: cuerpos apoptóticos. (C, D) Los esplenocitos de ratones inmunizados con pFap y con vector vacío (n=3) se estimularon durante 5 días con fibroblastos A31 transfectados con pFap y después se sometieron a un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr. (D) Se coincubaron células efectoras y células diana con anticuerpos anti-MHC de clase I (media  $\pm$  SD, \* indica significancia estadística en una comparación con el vector vacío,  $p < 0,05$ ). (E) Análisis de FACS de suspensiones de células individuales de tumores CT26 de ratones tratados (n=2) y teñidos con anticuerpos PerCP-Cy5.5 anti-CD3<sup>+</sup> y FITC anti-CD8<sup>+</sup>. Se ilustra uno de los dos experimentos. (F) Secciones representativas de tumores CT26 de ratones tratados con pFap y con vector vacío y teñidos con anticuerpos FITC anti-CD8 y tinción nuclear DAPI.

45 La figura 4 demuestra la expresión de FAP/colágeno de tipo I y la incorporación intratumoral de fluoresceína/albúmina/5-FU. (A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de FAP (panel superior) y de colágeno de tipo I (panel inferior) en tumores CT26 s.c. de ratones tratados. (B) Inmunotransferencias de FAP y colágeno de tipo I en tumores CT26 s.c. de ratones tratados. (C, D, E) Los gráficos de barras indican medias  $\pm$  SE de las mediciones de densidad óptica o de centelleo de homogenados de tumores CT26 s.c. procedentes de ratones BALB/c tratados (n=4) tras la inyección i.p. de fluoresceína, la inyección i.v. de albúmina-azul de Evans o la inyección i.v. de C-5-fluorouracilo.  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , respectivamente.

55 La figura 5 ilustra los efectos antimetastásicos de una terapia combinada biológica y quimioterapéutica y los efectos secundarios. (A) Contexto profiláctico: 10 días después de la última de las 3 vacunaciones a intervalos de 1 semana con vacuna de control, PBS o vacuna de la invención, se retaron ratones BALB/c (n=8, media  $\pm$  SE) o.t. con  $3 \times 10^5$  células D2F2. Tras 5, 10 y 15 días, los ratones indicados se trataron con doxorubicina. (B) Contexto terapéutico: 5 días después de la inyección i.v. de  $10^5$  células tumorales D2F2, los ratones BALB/c (n=8) se trataron semanalmente con vacuna pFap o vacuna de control. Un día después de cada inmunización, los ratones se trataron con doxorubicina i.v. tal como se indica (\* ilustra una significancia significativa en comparación con el grupo de control,  $p < 0,0001$ , \*\* ilustra significancia en comparación con los grupos de control, control/Dox, pFap y pFap/Dox,  $p < 0,0001$ ).

65 Figura 6 (A) Concentración intratumoral de doxorubicina: los ratones BALB/c tratados (n=4) se retaron s.c. con  $5 \times 10^5$  células D2F2 y tras 16 días se determinó la concentración de doxorubicina en lisados tumorales agrupados, mediante CL-EM (representativo de dos experimentos, media  $\pm$  SD,  $p < 0,0001$ ). (B) Se realizaron heridas circulares

de 3 mm de diámetro en la parte superior de la espalda de los ratones tratados (n=4) y se midió el tiempo medio transcurrido hasta el cierre completo de la herida (media  $\pm$  SD).

La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 1) de un ácido nucleico codificante de la FAP humana.

La figura 8 ilustra la secuencia de residuos aminoácidos de la FAP humana (SEC ID nº 2).

La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 3) de un ácido nucleico codificante de la FAP murina.

La figura 10 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de la FAP murina (SEC ID nº 4).

La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 5) de un ácido nucleico codificante de IL-2.

La figura 12 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de la IL-2 humana (SEC ID nº 6).

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 7) de un ácido nucleico codificante de la IL-2 murina.

La figura 14 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de la IL-2 murina (SEC ID nº 8).

La figura 15 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 9) de un ácido nucleico codificante de CCL21 humano.

La figura 16 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CCL21 humano (SEC ID nº 10).

La figura 17 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 11) de un ácido nucleico codificante de CCL21b murino.

La figura 18 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CCL21b murino (SEC ID nº 12).

La figura 19 ilustra la similitud entre las secuencias de aminoácidos de CCL21 humano y CCL21b murino.

La figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 13) de un ácido nucleico codificante de CCL21a murino.

La figura 21 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CCL21a murino (SEC ID nº 14).

La figura 22 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 15) de un ácido nucleico codificante de CD40L humano.

La figura 23 muestra la secuencia de residuos aminoácidos de CD40L humano (SEC ID nº 16).

#### **Descripción detallada de las formas de realización preferidas**

La presente invención proporciona una composición de ADN eficaz para inhibir el crecimiento tumoral o las metástasis tumorales, con diana en el antígeno tumoral estromal conocido como proteína activadora de fibroblastos (FAP). La composición de ADN comprende un constructo de ADN que codifica por lo menos un epítipo de FAP, que es expresable en células inmunitarias, y que se incorpora en un portador farmacéuticamente aceptable. El constructo de ADN puede codificar un único epítipo de FAP, un polipéptido que comprende dos o más epítipos de FAP, la proteína FAP completa, o cualquier parte de la misma que induzca la respuesta inmunitaria deseada frente a células que expresan FAP, tales como las células tumorales estromales. La respuesta inmunitaria inducida por las composiciones de la invención conduce a la inhibición del crecimiento tumoral y a metástasis tumorales.

La expresión "constructo de ADN" tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas se refiere a una estructura de ADN que codifica una proteína o polipéptido de interés, tal como un epítipo de FAP, una proteína FAP, IL-2, CCL21, y similares. Entre los constructos de ADN se incluyen cualesquier ADN que pueda transcribirse en las células diana, incluyendo ADN lineal y ADN plasmídico, así como ADN que ha sido incorporado en el material genético de una célula o virus. Preferentemente, el constructo de ADN es un ADN que ha sido incorporado en un vector de administración vírico o bacteriano, por ejemplo un vector vírico o bacteriano atenuado que es no patogénico. Al tratar un sujeto con una composición de la invención, el ADN codificante de FAP se administra en células inmunitarias (por ejemplo macrófagos y células dendríticas) que seguidamente expresan la proteína FAP. Los portadores víricos y bacterianos del ADN de FAP no expresan FAP por sí mismos.

Las composiciones de ADN de la presente invención estimulan la formación de CTL que son activos contra células que presentan el antígeno FAP, tales como las células tumorales estromales (por ejemplo las células fibroblásticas estromales). Dichas células tumorales estromales son dianas que atraen selectivamente las CTL que se producen en respuesta a la inmunización con las composiciones de ADN de la invención. Las composiciones de la invención pueden reducir además la expresión tumoral estromal del colágeno de tipo I, que a su vez incrementa la

incorporación de los agentes quimioterapéuticos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunidad" se refiere a la protección inmunológica a largo plazo frente a células que expresan un antígeno. El término "inmunización" se refiere a la exposición a un antígeno, lo que resulta en inmunidad frente a las células que expresan el antígeno en el sujeto tratado.

La expresión "proteína FAP" se refiere a la FAP humana o a un polipéptido que presenta una similitud de secuencias de por lo menos 80% respecto a la FAP humana y que incluye por lo menos un epítipo de la FAP humana. La expresión "ADN de FAP" se refiere al ADN codificante de la FAP humana o codificante de un polipéptido que presenta una similitud de secuencias de por lo menos 80% respecto a la FAP humana y que incluye por lo menos un epítipo de la FAP humana.

Un constructo de ADN útil en una composición de ADN de la presente invención preferentemente comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende uno o más epítopos de FAP y que se encuentra operablemente ligado a elementos reguladores necesarios para la expresión génica en células inmunitarias. Preferentemente, el constructo de ADN codifica una proteína FAP de longitud completa o un polipéptido que presenta un grado elevado de similitud de secuencias, de por lo menos 80% con el mismo, y que incluye por lo menos un epítipo de FAP. Entre los constructos de ADN útiles preferentemente se incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión de nucleótidos en las células inmunitarias. Entre dichos elementos se incluyen, por ejemplo, un promotor, un codón de inicio, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Además, con frecuencia se requieren intensificadores para la expresión de una secuencia que codifica una proteína diana inmunogénica. Tal como es conocido de la técnica, dichos elementos preferentemente se encuentran operablemente ligados a la secuencia que codifica la proteína deseada. Preferentemente se seleccionan los elementos reguladores que son operables en la especie en la que deben administrarse. Preferentemente, el constructo de ADN se encuentra en forma de plásmido o se incorpora en un vector vírico o bacteriano. El constructo de ADN codificante de la proteína FAP inicialmente puede incorporarse en un vector bacteriano mediante transfección, utilizando métodos bien conocidos de la técnica. Posteriormente, las bacterias transformadas pueden cultivarse para proporcionar una reserva lista para utilizar de bacterias, que incluya ADN de FAP dentro del material genético de las bacterias. Los cultivos de dichas bacterias transformadas proporcionan una fuente fácil de utilizar de las composiciones de ADN de la presente invención.

Los codones de inicio y los codones de parada preferentemente se incluyen como parte de una secuencia de nucleótidos que codifica FAP en una composición de ADN de la presente invención. Los codones de inicio y de parada deben encontrarse en el mismo marco de lectura que la secuencia codificante.

Los promotores y señales de poliadenilación incluidos en una composición de la presente invención preferentemente se seleccionan para que sean funcionales dentro de las células del sujeto que debe inmunizarse.

Entre los ejemplos de promotores útiles en las composiciones de la presente invención, especialmente en la producción de una composición de ADN de vacuna genética para seres humanos, se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los promotores del virus 40 del simio (SV40), el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del VIH, el virus de Moloney, el citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato del CMV, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos, tales como la actina humana, la miosina humana, la hemoglobina humana, la creatina muscular humana y la metalotioneína humana.

Entre los ejemplos de señales de poliadenilación útiles en las composiciones de ADN de la presente invención, especialmente en la producción de una composición de ADN para seres humanos, se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, las señales de poliadenilación del SV40 y las señales de poliadenilación LTR.

Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión de ADN, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN. Entre dichos elementos adicionales se incluyen intensificadores. El intensificador puede ser, por ejemplo, actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana e intensificadores víricos, tales como los de los virus CMV, RSV y EBV.

Las secuencias reguladoras y codones generalmente son dependientes de la especie, de manera que, a fin de maximizar la producción de proteína, las secuencias reguladoras y codones preferentemente se seleccionan para que resulten efectivas en la especie que debe inmunizarse. El experto ordinario en la materia podrá producir constructos de ADN que son funcionales en una especie dada.

Los constructos de ADN útiles en las presentes composiciones pueden ser ADN "desnudo", tal como se define en Restifo *et al.*, Gene Therapy 7:89-92, 2000, la exposición relevante de la cual se incorpora como referencia. Preferentemente, el constructo de ADN se encuentra en forma de plásmido o ADN que se incorpora en el material genético de un virus atenuado o de una bacteria atenuada. Entre los vehículos de administración o portadores útiles se incluyen microcápsulas biodegradables, complejos inmunoestimuladores (ISCOM) y liposomas para constructos de ADN desnudo, y diversos tampones fisiológicamente aceptables para virus o bacterias vivos atenuados

genéticamente manipulados.

Entre los ejemplos de vectores bacterianos vivos atenuados adecuados que pueden transformarse para incorporar un constructo de ADN de FAP se incluyen *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, especies de *Shigella*, especies de *Bacillus*, especies de *Lactobacillus*, Bacille Calmette-Guerin (BCG), *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, especies de *Campylobacter*, especies de *Listeria*, o cualquier otro vector bacteriano adecuado, tal como es conocido de la técnica. Preferentemente, el vector es un vector *Salmonella typhimurium* vivo atenuado, particularmente en el caso de que la composición esté destinada a la administración oral. Entre las *Salmonella typhimurium* vivas atenuadas preferentes se incluyen las cepas AroA<sup>-</sup>, tales como SL7207, o las cepas doblemente atenuadas AroA<sup>-</sup> dam<sup>-</sup>, tales como RE88. El vector particularmente preferente es *Salmonella typhimurium* doblemente atenuado AroA<sup>-</sup> dam<sup>-</sup>.

Los métodos para transformar los vectores bacterianos vivos con un constructo de ADN exógeno se encuentran bien descritos en la técnica. Ver, por ejemplo, Joseph Sambrook y David W. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001 (Sambrook y Russell). Tras la transformación, el material genético exógeno se incorpora en el material genético de la bacteria, de manera que, a medida que se reproduce la bacteria, se replica el ADN exógeno conjuntamente con el ADN nativo del organismo. De esta manera, tras la transformación de la bacteria, los procesos reproductivos normales del organismo proporcionan un suministro continuo del ADN exógeno.

Entre los vectores víricos preferentes se incluyen bacteriófagos, virus herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus Sindbis, virus polio, virus Vaccinia y Avipox. Los métodos para transformar un vector vírico con un constructo de ADN exógeno también se encuentran bien descritos en la técnica. Ver Sambrook y Russell, anteriormente.

Los vehículos portadores liposómicos que resultan útiles son las vesículas unilamelares o multilamelares que presentan una parte de membrana formada de material lipofílico y una parte acuosa interior. La parte acuosa se utiliza en la presente invención para contener el material polinucleótido que debe administrarse en la célula diana. Resulta generalmente preferente que los materiales formadores de liposoma presenten un grupo catiónico, tal como un grupo de amonio cuaternario, y uno o más grupos lipofílicos, tales como grupos alquilo saturado o insaturado que presentan entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 átomos de carbono. Se describe un grupo de materiales adecuados en la publicación de patente europea n° 0187702, y se comenta adicionalmente en la patente US n° 6.228.844 de Wolff *et al.*, las exposiciones relevantes de las cuales se incorporan como referencia. En la literatura se describen muchos otros compuestos lipídicos catiónicos formadores de liposoma adecuados. Ver, por ejemplo, Stamatou *et al.*, *Biochemistry* 27:3917-3925, 1988, y H. Eibl *et al.*, *Biophysical Chemistry* 10:261-271, 1979. Alternativamente, puede utilizarse una microesfera, tal como una microesfera biodegradable de poliláctido-coglicólido. Un constructo de ácidos nucleicos se encapsula o acompleja de otro modo con el liposoma o microesfera para la administración del ácido nucleico en un tejido, tal como es conocido de la técnica.

Entre otros vehículos portadores útiles se incluyen microesferas poliméricas que comprenden materiales poli(ortoéster) biodegradables, tal como describen Wang *et al.*, *Nat. Mater.* 3(3):190-6, 2004, publicación electr. 15 de feb., 2004, las exposiciones relevantes de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia.

Preferentemente, las composiciones para la presente invención comprenden constructos de ADN que codifican FAP humana o un homólogo funcional de la misma. Los homólogos funcionales de FAP preferentemente presentan una similitud de secuencias de residuos aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la FAP humana, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, todavía más preferentemente una similitud de secuencias de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la FAP humana.

GenBank es una base de datos de secuencias genéticas del National Institutes of Health (NIH), que es una colección comentada de todas las secuencias de ADN públicamente disponibles. GenBank es parte de la International Nucleotide Sequence Database Collaboration, un esfuerzo conjunto del DNA DataBank of Japan (DDBJ), la European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y el GenBank en el National Center for Biotechnology Information.

La secuencia de ácidos nucleicos de un ADN codificante de la FAP humana, SEC ID n° 1 (figura 7) ha sido publicada en GenBank, n° de acceso B026250, la exposición de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria. La secuencia de residuos aminoácidos correspondiente de la FAP humana es la SEC ID n° 2 (figura 8).

La secuencia de ácidos nucleicos de un ADN codificante de la FAP murina, la SEC ID n° 3 (figura 9), ha sido publicada en GenBank, n° de acceso BC019190, la exposición de la cual se incorpora en la presente memoria como referencia. La secuencia de residuos aminoácidos correspondiente de la FAP murina es la SEC ID n° 4 (figura 10).

Debido a la degeneración inherente del código genético, en la práctica de la invención pueden utilizarse otras secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de la FAP humana. Entre estas secuencias de ADN se incluyen también aquellas que son capaces de hibridarse con la FAP humana.

Entre las secuencias de ADN que codifican la FAP humana que pueden utilizarse según la invención se incluyen los

ácidos nucleicos que presentan deleciones, adiciones o sustituciones de diferentes residuos nucleotídicos por los de la SEC ID nº 1, resultando en una secuencia que codifica el mismo producto génico FAP. Las moléculas de ADN codificantes de homólogos funcionalmente equivalentes de la FAP humana también pueden utilizarse en las composiciones de ADN de la presente invención.

El producto génico codificado por el ácido nucleico también puede contener deleciones, adiciones o sustituciones de residuos aminoácidos dentro de la secuencia de residuos aminoácidos de FAP, lo que resulta en un cambio silencioso, produciendo de esta manera una FAP funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden realizarse basándose en las similitudes de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos de carga negativa se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos de carga positiva se incluyen la lisina y la arginina; entre los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que presentan valores de hidrofiliidad similares se incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Tal como se utiliza en la presente memoria, una FAP funcionalmente equivalente se refiere a una proteína que incluye uno o más epítopos, que al resultar reconocidos por las células T, permiten que estas mismas células T reconozcan epítopos de FAP expresados sobre las células expresantes de FAP. En formas de realización preferidas, una FAP funcionalmente equivalente presenta una secuencia de residuos aminoácidos con una similitud de secuencias de por lo menos aproximadamente 80% respecto a la secuencia de residuos aminoácidos de la FAP humana (SEC ID nº 2), por ejemplo una similitud de secuencias de por lo menos aproximadamente 90% o una similitud de secuencias de por lo menos aproximadamente 95% respecto a la FAP humana.

Los constructos de ADN codificantes de FAP pueden manipularse para alterar la secuencia codificante de FAP (respecto al ADNc de la FAP nativa, SEC ID nº 1) para una diversidad de objetivos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, alteraciones que modifican el procesamiento y expresión del producto génico FAP. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en el ADN utilizando técnicas que son bien conocidas de la técnica, por ejemplo la mutagénesis sitio-dirigida, para insertar nuevos sitios de restricción, para alterar los patrones de glucosilación, la fosforilación, etc.

En una forma de realización preferida, la composición de ADN de la invención comprende un constructo de ADN codificante de FAP y un constructo de ADN operablemente codificante de por lo menos una proteína efectora inmunitaria, siendo las dos expresables en células inmunitarias. Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, la expresión "proteína efectora inmunitaria" se refiere a una proteína que participa en la regulación de una ruta del sistema inmunitario. Preferentemente, la proteína efectora inmunitaria es una citoquina.

Las citoquinas son proteínas y polipéptidos producidos por las células que pueden afectar al comportamiento de otras células, tales como la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación de las respuestas inmunitarias, la hematopoyesis y las respuestas inflamatorias. Las citoquinas han sido clasificadas en varias familias, entre ellas las quimoquinas, las hematopoyetinas, las inmunoglobulinas, los factores de necrosis tumoral y una diversidad de moléculas no clasificadas. Ver de manera general el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, edición revisada, Oxford University Press, 2000, y C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport y M. Schlomchik, Immunobiology, quinta edición, Garland Publishing, 2001 (en lo sucesivo, "Janeway y Travers"). Se presenta una clasificación concisa de las citoquinas en Janeway y Travers, apéndice III, páginas 677 a 679, las exposiciones relevantes de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia.

Entre las hematopoyetinas se incluyen, por ejemplo, la eritropoyetina, la interleuquina-2 (IL-2, una proteína de 133 aminoácidos producida por las células T e implicada en la proliferación de las mismas), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, L-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-15 (una proteína similar a IL-2 de 114 aminoácidos que estimula el crecimiento del epitelio intestinal, las células T y las células NK), el factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la oncostatina M (OSM) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF).

Entre los interferones se incluyen, por ejemplo, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (una proteína homodimérica de 143 aminoácidos producida por las células T y NK que participa en la activación de los macrófagos, en la expresión incrementada de las moléculas del MHC y en los componentes del procesamiento de los antígenos, el cambio de clase de Ig y la supresión de T<sub>H2</sub>).

Entre las inmunoglobulinas se incluyen, por ejemplo, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), coestimulando ambas las respuestas de células T.

La familia del factor de necrosis tumoral (TNF) incluye, por ejemplo, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (linfotóxina), linfotóxina- $\beta$  (LT- $\beta$ ), ligandos de CD40, ligando Fas, ligando de CD27, ligando de CD30, ligando de 4-1BB, Trail y ligando de OPG.

Las funciones biológicas del ligando de CD40 (CD40L), particularmente su interacción con CD40 expresado sobre las células presentadoras de antígeno durante la coestimulación de la activación de las células T, son bien conocidas de la técnica. CD40 es una glucoproteína de 48 kDa expresada sobre la superficie de todas las células B

5 maduras, la mayoría de los tumores malignos de células B maduras y algunas leucemias linfocíticas agudas de células B tempranas, pero no se expresa sobre las células plasmáticas, Clark, Tissue Antigens 35:33-36, 1990. CD40L, una proteína membranal de tipo II de aproximadamente 35 kDa, se expresa sobre la superficie de las células T al reconocerse el antígeno. Los miembros de la familia de TNF son biológicamente más activos al expresarse como homotrímeros. CD40L no es una excepción a este respecto y puede expresarse como homotrímero (CD40LT) mediante la modificación de un motivo cremallera de leucinas de 33 aminoácidos fusionado con el extremo N-terminal del dominio extracelular completo de este ligando. Gurunathan *et al.*, J. Immunol. 161:4563, 1998, han informado de que el ADN de CD40LT incrementa las respuestas inmunitarias celulares, tales como la inducción de IFN- $\gamma$  y la actividad de células T citotóxicas al tratar ratones con ADN codificante del antígeno modelo altamente inmunogénico  $\beta$ -galactosidasa.

15 CD40LT es un factor importante en la activación de las células T necesario para inducir una inmunidad protectora efectiva contra los autoantígenos tumorales. Tras la incorporación de los complejos de MHC de clase I cargados de antígenos por parte de las células dendríticas (DC) y su presentación a las células T no expuestas, se envía la primera señal antigénica a través de los receptores de células T (TCR), seguido de la regulación positiva de CD40LT. Sobre la superficie de las células T, a continuación CD40LT induce actividad coestimuladora en las DC a través de las interacciones CD40-CD40LT. Tras ser expuestas de esta manera, estas APC pueden expresar moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), que envían una segunda señal coestimuladora a las células T a través de la interacción con CD28, un suceso que conduce a la activación completa de las células T para producir concurrentemente las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  e IL12, y a la realización de funciones efectoras.

20 Entre diversas citoquinas que no han sido clasificadas a una familia particular se incluyen, por ejemplo, el factor  $\beta$  de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 RA, IL-10, IL-12 (factor estimulador de células asesinas naturales, un heterodímero que presenta una cadena de 197 aminoácidos y una cadena de 306 aminoácidos, que participa en la activación de las células NK y en la inducción de la diferenciación de las células T en células similares a T<sub>H</sub>1), el factor inhibidor de macrófagos (MIF), IL-16, IL-17 (un factor inductor de la producción de citoquinas, que induce la producción de citoquinas en epitelios, endotelios y fibroblastos) e IL-18.

30 Las quimoquinas son una familia de citoquinas que son proteínas y polipéptidos quimioatrayentes relativamente pequeñas, que estimulan la migración y activación de diversas células, tales como la migración de los leucocitos (por ejemplo fagocitos y linfocitos). Las quimoquinas desempeñan un papel en la inflamación y en otras respuestas inmunitarias. Las quimoquinas han sido clasificadas en varias familias, incluyendo las quimoquinas C, las quimoquinas CC, las quimoquinas CXC y las quimoquinas CX<sub>3</sub>C. Los nombres se refieren al número y espaciado de los residuos de cisteína (C) en las moléculas; las quimoquinas C presentan una cisteína, las quimoquinas CC presentan dos cisteínas contiguas, presentando CXC dos cisteínas separadas por un único residuo aminoácido, y presentando las quimoquinas CX<sub>3</sub>C dos cisteínas separadas por tres residuos aminoácidos. Las quimoquinas interactúan con varios receptores de quimoquina presentes sobre las superficies celulares. Ver Janeway y Travers, apéndice IV, página 680, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

40 Además, las quimoquinas pueden presentar actividad inmunomoduladora y se han implicado en las respuestas inmunitarias al cáncer. Por ejemplo, 6Ckine/SLC murino, el análogo del ratón de la quimoquina del tejido linfoide secundario (SLC) humana, ahora denominada comúnmente CCL21, se ha informado de que induce una respuesta antitumoral en una línea celular tumoral de carcinoma de colon C26. Ver Vicari *et al.*, J. Immunol. 165(4):1992-2000, 2000. El CCL21 humano y su contrapartida murina, 6Ckine/SLC, se clasifican como quimoquinas CC, las cuales interactúan con el receptor de quimoquina CCR7. Vicari *et al.* también han informado de que la 6Ckine/SLC murina (muCCL2) es un ligando del receptor de quimoquina CXCR3. El CCL21 humano, el muCCL21 murino y una diversidad de otras quimoquinas, participan en la regulación de diversas células del sistema inmunitario, tales como las células dendríticas, las células T y las células asesinas naturales (NK).

50 Mig e IP-10 son quimoquinas CXC que interactúan con el receptor CXCR3, que se asocia a las células T activadas. La linfotactina es una quimoquina C, que interactúa con el receptor XCR1 asociado a las células T y a las células NK. La fractalquina es una quimoquina CX<sub>3</sub>C, que interactúa con el receptor CX<sub>3</sub>CR1, el cual se asocia a las células T, monocitos y neutrófilos.

55 Entre las proteínas efectoras inmunitarias particularmente preferentes codificadas por las composiciones de ADN de la presente invención se incluyen citoquinas IL-2 (una hematopoyetina), CCL21 (una quimoquina), así como ligandos de CD40, tales como el trímero ligando de CD40 (CD40LT), una citoquina de la familia de TNF.

60 Las secuencias de ADN y de proteína de la IL-2 humana han sido publicadas en GenBank, nº de acceso BC070338, las exposiciones de las cuales se incorporan como referencia en la presente memoria. Las secuencias de ADN y de proteína de la IL-2 murina se encuentran en GenBank, nº de acceso NM 008366, las exposiciones de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia.

65 La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la IL-2 humana se presenta en la figura 11 (SEC ID nº 5) y su secuencia de residuos aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 6) se proporciona en la figura 12. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la IL-2 murina se presenta en la figura 13 (SEC ID nº 7) y su secuencia de

aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 8) se proporciona en la figura 14.

5 Las secuencias de ADN y de proteína de la CCL21 humana han sido publicadas en GenBank, nº de acceso AB002409, las exposiciones de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia. Las secuencias de ADN y de proteína de la variante CCL21a murina han sido publicadas en GenBank, nº de acceso NM011335, las exposiciones de las cuales se incorporan como referencia en la presente memoria. Las secuencias de ADN y de proteína de la variante CCL21b murina han sido publicadas en GenBank, nº de acceso NM011124, las exposiciones de las cuales se han incorporado en la presente memoria como referencia.

10 La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la CCL21 humana se presenta en la figura 15 (SEC ID nº 9) y su secuencia de residuos aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 10) se proporciona en la figura 16. La secuencia de ácidos nucleicos codificante de la CCL21 murina (variante CCL21b) se presenta en la figura 17 (SEC ID nº 11) y su secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 12) se proporciona en la figura 18.

15 La similitud de secuencias de proteína entre la CCL21 humana y su contrapartida murina (CCL21b murina) se ilustra en la figura 19. Existe una identidad de secuencias de residuos aminoácidos de aproximadamente 73% entre la CCL21 humana (SEC ID nº 10) y la CCL21b murina (SEC ID nº 12).

20 La secuencia de ácidos nucleicos codificantes de la variante CCL21a de la CCL21 murina se presenta en la figura 20 (SEC ID nº 13) y su secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID nº 14) se proporciona en la figura 21.

25 El ligando de CD40 humano (CD40L) es una proteína de 261 aminoácidos que existe en forma de trímero (CD40LT) en su forma más activa. La secuencia de ADN codificante de CD40L humano (también conocido como CD154) ha sido publicada en GenBank, nº de acceso NM 000074, la exposición de la cual se incorpora como referencia en la presente memoria (figura 22, SEC ID nº 15). La secuencia de proteína correspondiente de CD40L se muestra en la figura 23 (SEC ID nº 16).

30 Los aspectos metodológicos de la presente invención implican administrar en un mamífero una composición de ADN que comprende un constructo de ADN codificante de FAP que es expresable en células inmunitarias del mamífero. Preferentemente el mamífero es un ser humano. La composición puede administrarse por vía oral, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o tópica, dependiendo de la forma de dosificación particular en la que se prepare la composición. Preferentemente la composición se prepara en una forma de dosificación oralmente administrable, tal como una solución, suspensión, emulsión, cápsula, tableta y similar.

35 Puede utilizarse una composición de ADN de la invención para proporcionar una inhibición a largo plazo del crecimiento tumoral y/o de las metástasis tumorales en un paciente tratado con la composición. En una forma de realización preferida, la composición de ADN se administra conjuntamente con un agente quimioterapéutico antitumoral. La composición de ADN puede administrarse conjuntamente con el agente quimioterapéutico en una forma de dosificación combinada, o la composición y agente quimioterapéutico pueden administrarse en formas de dosificación separadas y a intervalos de dosificación separados ajustados a la farmacología del agente quimioterapéutico que se administra.

45 Entre los agentes quimioterapéuticos útiles en la combinación con las composición de ADN de la presente invención se incluyen agentes antitumorales tales como la doxorubicina, el paclitaxol, la ciclofosfamida, el etopósido, el 5-fluorouracilo, el metotrexato y similares.

50 Las composiciones de ADN de la presente invención preferentemente se formulan con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares, y combinaciones de los mismos para ayudar en la formulación y administración de la composición. Las composición pueden contener además sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, tampones y otras sustancias auxiliares que son bien conocidas de la técnica farmacéutica.

55 Las composiciones de la presente invención preferentemente se administran por vía oral en un mamífero, tal como un ser humano, en forma de una solución o suspensión en un portador farmacéuticamente aceptable, a una concentración de ADN comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 microgramos por mililitro, basado en el peso del ADN que codifica FAP. Una forma de dosificación particularmente preferente para una composición de ADN de la invención es una suspensión de bacterias transfectadas por FAP atenuadas en una solución tamponadora adecuada, que pueda formularse para la administración oral. La dosis apropiada de la composición dependerá del sujeto que debe tratarse, de la actividad de la composición, y en parte del criterio del médico que administra o solicita la administración de la composición.

65 La dosis que debe administrarse en el mamífero y el programa de administración en el caso de que deba aplicarse más de una administración, variará de mamífero a mamífero y de la forma de dosificación. Las cantidades de dosis eficaces y los programas de administración pueden determinarse empíricamente mediante estudios clínicos de dosis-respuesta, tal como es bien conocido de la técnica. La dosis y programa de dosificación se seleccionan para proporcionar una cantidad suficiente de expresión de FAP en las células inmunitarias para inducir una respuesta

inmunitaria en el mamífero contra células que presentan el antígeno FAP. Preferentemente, la dosis de la composición administrada en el mamífero induce una expresión de suficiente cantidad de antígeno FAP en las células inmunitarias del mamífero para sostener una respuesta inmunitaria contra células presentadoras de FAP que continuarán durante un periodo de por lo menos un mes, por ejemplo durante por lo menos 6 meses o durante por lo menos aproximadamente un año.

Las composiciones de la presente invención pueden empaquetarse en recipientes adecuadamente esterilizados, tales como ampollas, botellas o viales, en formas de dosificación multidosis o unitarias. Los recipientes preferentemente se sellan herméticamente tras rellenarlos con una composición de ADN de la invención. Preferentemente, las composiciones se empaquetan en un recipiente que presenta una etiqueta fijada a las mismas, la cual identifica la composición y porta un aviso en una forma prescrita por una agencia gubernamental, tal como la Food and Drug Administration en Estados Unidos, que informa de la composición está autorizada bajo la legislación correspondiente, información de dosificación, y similares. La etiqueta preferentemente contiene información sobre la composición que resultará útil para el profesional del cuidado de la salud quien administra la composición en el paciente. El paquete preferentemente también contiene materiales informativos impresos referentes a la administración de la composición, instrucciones, indicaciones y cualesquiera advertencias requeridas necesarias.

Los ejemplos a continuación se proporcionan a fin de ilustrar adicionalmente las características y formas de realización de la presente invención, y no pretenden ser limitativos de la misma.

### **Materiales, métodos y ejemplos.**

Animales, cepas bacterianas y líneas celulares. Se obtuvieron ratones BALB/c hembra, de 6 a 8 semanas de edad, del Scripps Research Institute (TSRI) Rodent Breeding Facility. Todos los experimentos animales se llevaron a cabo según el National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, aprobados por el TSRI Animal Care Committee. La cepa RE88 doblemente atenuada de *Salmonella typhimurium* (Aro<sup>A</sup> dam<sup>-</sup>) fue proporcionada por Remedyne Corporation (Santa Barbara, California). Las células de carcinoma mamario D2F2 murino se obtuvieron del Dr. Wei-Zen Wei, Karmanos Cancer Center, Detroit, MI, y las células de carcinoma de colon CT26 se obtuvieron de la ATCC (Manassas, Virginia) y después se cultivaron durante varios meses para obtener subclones quimiorresistentes.

Las células de los carcinomas CT26 y D2F2 murinos se cultivaron en presencia de DMSO al 1%, etopósido, 5-fluorouracilo, doxorubicina, vinblastina o paclitaxel (Sigma, St. Louis, Missouri) a las concentraciones indicadas. Tras 48 horas, se contaron los núcleos apoptóticos tras la incubación con el pigmento específico de ADN Hoechst-33342 (2 µM, Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Dos clones del cáncer de colon CT26 y de células de cáncer mamario D2F2, respectivamente, habían adquirido quimiorresistencia (ver la figura 1, panel C). Tras la adición de cinco agentes quimioterapéuticos inductores de apoptosis diferentes para el clon del carcinoma de colon CT26 (figura 1, panel C), únicamente la vinblastina pudo inducir un ligero efecto apoptótico, aunque sólo a la concentración más alta, de 5 µM. La línea celular CT26 parental original (ATCC n° CLR-2326) presentaba una IC<sub>50</sub> para el 5-fluorouracilo (5-FU) de aproximadamente 1,85 µM, mientras que el 5-FU no pudo inducir apoptosis nuclear ni siquiera a una concentración tan alta como 100 µM en el clon CT26 resistente. En las células de carcinoma mamario D2F2 resistentes, sólo la doxorubicina a la concentración más alta, de 1 µM, pudo inducir apoptosis nuclear, determinada mediante tinción con el pigmento Hoechst-33342. Estos resultados demuestran que estas dos líneas celulares tumorales son resistentes a múltiples fármacos.

Análisis estadístico. Se determinó la significancia estadística de los resultados de diferencias entre los grupos experimentales y los controles mediante la prueba t de Student. Se determinó la significancia de las puntuaciones de metástasis con la prueba U de Mann-Whitney. La significancia de los datos de supervivencia se determinó mediante la prueba de rangos logarítmicos. Los resultados se consideraron significativos en el caso de que los valores de P fuesen <0,05.

### **Ejemplo 1. Preparación de composición de ADN 1 codificante de FAP murina.**

Un ADNc (SEC ID n° 3, figura 9, proporcionado por el Dr. J. D. Cheng) codificante de la FAP murina (SEC ID n° 4, figura 10) se subclonó en el sitio de restricción EcoRI del vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, San Diego, California), proporcionando el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1-FAP (pFAP) (ver la figura 1, panel A). La expresión correcta de la proteína FAP de 95 kDa del vector se demostró mediante transferencia western de lisados celulares de células de carcinoma de colon CT26 transfectadas transitoriamente, las cuales no expresan FAP por sí mismas (figura 1, panel B). Éste también es el caso de las células de carcinoma mamario D2F2 transfectadas transitoriamente. Para las transfecciones transitorias, las células CT26 y D2F2 se electroporaron tal como se ha descrito anteriormente (ver Loeffler *et al.*, FASEB, J. 15:758-767, 2001, incorporada en la presente memoria como referencia). Se demostró la expresión proteica de FAP mediante transferencia western con un anticuerpo policlonal de conejo anti-FAP murina (proporcionada por el Dr. J. D. Cheng).

La composición de ADN 1 se preparó de la manera siguiente: el vector pcDNA3.1-FAP (aproximadamente 2 µg de ADN) se electroporó en *Salmonella typhimurium* doblemente atenuado recién preparado (cepa RE88) utilizando un pulsador Bio-Rad a 2 kV, 960 µF y 200 Ohm, siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. Se seleccionaron las células de *Salmonella typhimurium* atenuada que contenían el vector utilizando placas que contenían ampicilina. Se recolectaron las colonias al día siguiente y se cultivaron durante la noche en caldo Luria-Bertani (LB) (10 gramos de triptona, 5 gramos de extracto de levadura y 10 gramos de cloruro sódico en 1 litro de agua desionizada; EM Science, Gibbstown, NJ) con ampicilina añadida. Las bacterias se aislaron y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, las bacterias lavadas se suspendieron en medio PBS a una concentración de aproximadamente  $10^9$  *Salmonella* recombinantes por mililitro de PBS, formando una solución de composición de ADN 1 que contenía un constructo de ADN que codifica operablemente la FAP murina, incorporada en un vector de *Salmonella typhimurium* atenuada (AroA<sup>-</sup> dam<sup>-</sup>). La composición se almacenó en ampollas selladas hasta su utilización. También se preparó una "vacuna de control" que consistía de *Salmonella* transformada con el vector pcDNA3.1 únicamente (sin ADN de FAP) siguiendo el mismo procedimiento. El ADN plasmídico se almacenó a aproximadamente -80°C antes de transformar la *Salmonella*.

Tras construir el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Fap (pFap) tal como se ha indicado anteriormente (figura 1, panel A), se demostró la expresión correcta de la proteína FAP de 88 kDa mediante transferencia western de los lisados celulares de ambos: carcinoma de colon CT26 transitoriamente transfectado y células de carcinoma mamario D2F2, las cuales no expresan FAP por sí mismas (figura 1, panel B).

### **Ejemplo 2. Preparación de composición de ADN 2 codificante de la FAP murina, IL-2 murina y CCL21 murina.**

Se subclonaron los ADNc codificantes de IL-2 murina (ADN SEC ID nº 5), de la ATCC, nº de acceso 39892, Manassas, Virginia, y CCL21a murino (ADN SEC ID nº 7) de Invitrogen, San Diego, California, en el vector pFAP murino del Ejemplo 1, mediante el mismo procedimiento general descrito en el Ejemplo 1. Se transformaron *Salmonella typhimurium* RE88 con el vector resultante (pFAP/IL-2/CCL21) mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, proporcionando una solución de composición de ADN 2 que contenía un constructo de ADN que codifica operablemente la FAP murina, IL-2 murina y CCL21a murina, incorporadas en un vector de *Salmonella typhimurium* atenuado.

### **Ejemplo 3. Evaluación de las composiciones de ADN de la invención en modelos murinos de cáncer de colon y de mama.**

Inmunización oral, reto con células tumorales y tratamiento con doxorrubicina. Para los experimentos en un contexto profiláctico, se trataron ratones BALB/c (n=8) tres veces a intervalos de aproximadamente 1 semana mediante sonda oral con aproximadamente 100 µl de PBS que contenía aproximadamente  $10^9$  *S. typhimurium* (AroA<sup>-</sup> dam<sup>-</sup>) transformadas con vectores plásmido codificantes de la FAP murina (composición de ADN 1 del Ejemplo 1), FAP murina, IL-2 y CCL21 (composición de ADN 2 del Ejemplo 2) o vacuna de control del Ejemplo 1, mediante los métodos descritos en Niethammer *et al.*, Nat. Med. 8:1369-1375, 2002. Los animales se retaron aproximadamente 10 días después mediante inyección subcutánea (s.c.) de aproximadamente  $3 \times 10^4$  células de carcinoma de colon CT26 en el flanco frontal izquierdo o mediante inyección ortotópica (o.t.) de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células de cáncer de mama D2F2 en la segunda almohadilla más baja izquierda de grasa mamaria.

Se calculó el volumen tumoral (en mm<sup>3</sup>) mediante la medición del tumor en 2 dimensiones (es decir, longitud y anchura, en milímetros) y calculando el volumen como un medio de la longitud multiplicado por el cuadrado de la anchura. En el contexto terapéutico, la inoculación inicial de células tumorales se realizó mediante inyección intravenosa (i.v.) de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células de carcinoma de colon CT26, seguido aproximadamente 3 a 10 días después por vacunaciones orales con vacuna de control o composiciones activas de ADN. Tras aproximadamente 18 días, se pesaron los pulmones (el peso pulmonar normal era de aproximadamente 0,2 g) y se examinaron las metástasis tumorales pulmonares y se puntuaron mediante evaluación visual, estimando el porcentaje de superficie pulmonar cubierto por metástasis fusionadas del modo siguiente: puntuación de 0 para cobertura de 0%, puntuación de 1 para una cobertura inferior a aproximadamente 20%, puntuación de 2 para una cobertura de aproximadamente 20% a 50%, puntuación de 3 para una cobertura superior a aproximadamente 50% de la superficie pulmonar. El tratamiento con doxorrubicina se llevó a cabo en grupos de ratones con aproximadamente 10 mg/kg de doxorrubicina (Sigma) administrados i.v., 5, 10 y 15 días después del reto tumoral.

Para la reducción de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> o subpoblaciones de células NK, se inyectaron i.p. cada 7 días desde el día posterior al reto de células tumorales, anticuerpos (500 µg) dirigidos contra CD4 (clon GK 1.5) o CD8 (clon 2.43), ambos del National Cell Culture Center (Minneapolis, Minnesota) o anticuerpo anti-asialo GM1 (Wako BioProducts, Richmond, Virginia).

Citotoxicidad de las células T CD8<sup>+</sup>. Aproximadamente 10 días después del último de los tres tratamientos a intervalos de 1 semana, se recogieron esplenocitos de los diversos grupos tratados de ratones BALB/c (n=4). Utilizando microperlas CD8a (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania), se purificaron células CD8<sup>+</sup> siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, estas células se estimularon en un cocultivo de 5 días con células CT26 irradiadas con rayos γ (1.000 Gy, 45 minutos) transfectadas transitoriamente con pcDNA3.1/Zeo (vector vacío del

Ejemplo 1) o pcDNA3.1/Zeo-FAP (vector pFAP del Ejemplo 1). A continuación, las células T CD8<sup>+</sup> se cocultivaron con células de carcinoma CT26 (E:T=100:1) que habían sido transfectadas transitoriamente con proteína fluorescente verde (GFP) (PEGFP, Clontech, Palo Alto, California) a modo de control o GFP más plásmido pFAP codificante de FAP murina. Tras aproximadamente 48 horas, se evaluó la apoptosis nuclear tal como se ha indicado anteriormente, con el pigmento específico de ADN Hoechst-33342 (2 µM).

Para el ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr, se trataron ratones Balb/c (n=3) cuatro veces a intervalos de una semana. Se recolectaron esplenocitos 13 días después del último tratamiento y se incubaron durante 5 días con fibroblastos A31 irradiados con rayos γ (aproximadamente 1.000 Gy, 45 minutos) (ATCC, Manassas, Virginia), que se infectaron retrovíricamente con pFap. A continuación, los esplenocitos estimulados se incubaron durante aproximadamente 4 horas con A31-pFap marcado y se calculó el porcentaje de lisis. Las células también se coincubaron con anticuerpos anti-MHC de clase I (BD Biosciences, Rockville, Maryland) a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml.

Inmunohistoquímica. Se fijaron secciones criogénicas (de aproximadamente 8 µm de grosor) en acetona y se filtraron. Tras la incubación con el anticuerpo primario (un anticuerpo policlonal de conejo anti-FAP murina (proporcionado por el Dr. J. D. Cheng) o un anticuerpo policlonal de conejo anti-colágeno de tipo I murino (Chemicon, Temecula, California), las secciones se inmunotifieron siguiendo el protocolo del fabricante (kit DAKO LSAB+, peroxidasa, DAKO, Carpintería, California).

Para la microscopía focal secciones criogénicas fijadas se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 murino, anticuerpo secundario biotinilado anti-Ig de rata, estreptavidina marcada con FITC (BD Bioscience, Rockville, Maryland) y se cotifieron con DAPI (Sigma, St. Louis, Missouri). Se utilizó un microscopio confocal de barrido láser (LSCM) para obtener imágenes, las cuales se procesaron utilizando el software Image Examiner de Zeiss (Carl Zeiss). Para el análisis de FACS de la infiltración de células T, se trataron ratones Balb/c (n=6) tres veces a intervalos semanales con pFap o vector vacío. Una semana después del último tratamiento, se retaron los animales s.c. con aproximadamente 3x10<sup>5</sup> células tumorales CT26. Los tumores se recolectaron 3 semanas después y se prepararon suspensiones de células individuales mediante incubación de secciones de tejido tumoral durante 45 minutos en medio suplementado con colagenasa de tipo I (125 U/ml, GIBCO, Gaithersburg, Maryland). Tras la filtración, se agruparon células de dos ratones, se tiñeron con anti-CD3<sup>+</sup> PerCp-Cy5.5 y anti-CD8<sup>+</sup> FITC (BD Biosciences, Rockville, Maryland) y se analizaron mediante FACS.

Incorporación intratumoral de fluoresceína, albúmina-azul de Evans y <sup>14</sup>C-5-fluorouracilo. Tras el último de los tres tratamientos a intervalos de 1 semana con vacuna de control (Ejemplo 1), composición de ADN 1 (Ejemplo 1) o composición de ADN 2 (Ejemplo 2), los ratones se retaron 10 días después mediante inyección subcutánea de aproximadamente 3x10<sup>4</sup> células CT26 en el flanco frontal izquierdo. Aproximadamente 19 días después los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de fluoresceína sódica al 1% (Sigma) a razón de aproximadamente 12 µl/g de peso corporal, la inyección i.v. de aproximadamente 100 µl de albúmina-azul de Evans (Sigma) o la inyección i.v. de aproximadamente 2,5 µCi de <sup>14</sup>C-5-fluorouracilo (Sigma). Tras aproximadamente 5 minutos, 30 minutos o 1 hora, respectivamente, los ratones se sacrificaron para determinar la absorción o el centelleo de los sobrenadantes de homogenados tumorales a 490 nm, 612 nm o en un contador de rayos γ, respectivamente.

Para la determinación de la incorporación intratumoral de doxorrubicina, se retaron ratones Balb/c (n=4) s.c. con aproximadamente 5x10<sup>5</sup> células D2F2 en el flanco derecho. Se inyectó doxorrubicina i.v. 16 días después (10 mg/kg) y se recolectaron los tumores 45 minutos después. Se midieron las muestras frente al estándar interno daunorrubicina utilizando una columna Eclipse XCB-C8 en un CL-EM serie 1.100 (Agilent, Foster City, California).

Evaluación de los potenciales efectos secundarios. Con el fin de determinar cualesquier efectos perjudiciales sobre la cicatrización de heridas, se realizaron heridas quirúrgicamente en los ratones. Se realizó una herida circular de aproximadamente 3 mm de diámetro con un punzón dérmico (Miltex Inc., Bethpage, New York) en la parte superior del lomo de ratones BALB/c (n=4) aproximadamente 10 días después del último de los 3 tratamientos a intervalos de 1 semana. Se midió el tiempo requerido para el cierre de la herida. A pesar del hecho de que FAP se sobreexpresaba durante la cicatrización de las heridas, las composiciones de la presente invención no interfieren con el proceso de cicatrización de las heridas. Tras infligir una herida circular de aproximadamente 3 mm de diámetro en el lomo de los ratones BALB/c tratados (n=4), no se observaron diferencias significativas en la cicatrización de las heridas entre ratones tratados y no tratados. Para el análisis histológico, las heridas se infligieron a los ratones tratados 7, 14 y 21 días antes del examen. Las biopsias de la piel, así como de 26 órganos y tejidos fueron examinados por un patólogo experto en el ratón.

El tratamiento profiláctico con composición de ADN basada en FAP inhibe el crecimiento del tumor primario. Diez días después del último de los tres tratamientos a intervalos de 1 semana con vacuna de control (Ejemplo 1), composición de ADN 1 (Ejemplo 1) o composición de ADN 2 (Ejemplo 2), se retaron diferentes grupos de ratones BALB/c (n=8) subcutáneamente con células de carcinoma de colon CT26 u ortotópicamente con células de carcinoma mamario D2F2 tal como se ha indicado anteriormente. Las composiciones de ADN de la invención suprimieron el crecimiento del tumor primario de las células CT26 resistentes a múltiples fármacos (figura 2a), así como de las células D2F2 resistentes (figura 2b). La composición de ADN 2, que codifica una combinación de FAP, CCL21 e IL-2, fue aproximadamente igual de eficaz en la inhibición del crecimiento del tumor primario (figura 2a).

Una composición de ADN de la invención reduce el crecimiento de las metástasis establecidas en un contexto terapéutico. Los ratones BALB/c tratados con la composición de ADN 1 del Ejemplo 1 tres y diez días después de una inoculación intravenosa inicial de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células de carcinoma de colon CT26 resultó en una reducción significativa de las metástasis pulmonares experimentales en comparación con los ratones tratados con la vacuna de control del Ejemplo 1. En contraste, los ratones en el grupo de control mostraron metástasis extensivas y empezaron a morir 18 días después de la inoculación de células tumorales (figura 2c). De manera similar, una combinación de pFAP con pCCL21 solo también resultó aproximadamente igual de efectivo (figura 2b).

Las células T CD8<sup>+</sup> proporcionan una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. Se trataron los ratones con la composición de ADN 1 mediante inyección i.v. tres veces a intervalos de 1 semana (Ejemplo 1) y se retaron con aproximadamente  $1 \times 10^5$  células CT26. A continuación, se redujo el número de células efectoras respectivas de los ratones durante la etapa efectora con anticuerpos contra las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, así como con células NK (figura 3, panel A). La reducción de las células CD4<sup>+</sup> y NK no redujo la efectividad del tratamiento de pFAP, señalando a un papel importante de las células T CD8<sup>+</sup> en la respuesta inmunitaria.

Para evaluar el grado en el que el tratamiento con las composiciones de ADN de FAP de la invención era capaz de romper la tolerancia de las células T periféricas frente al autoantígeno FAP, se purificaron células T CD8<sup>+</sup> de animales que habían sido tratados con bacterias transfectadas con pFAP o con el vector vacío. A continuación, dichas células se estimularon con células tumorales diana irradiadas con rayos  $\gamma$  y se incubaron con células tumorales diana vivas que habían sido transitoriamente transfectadas con GFP a modo de control o con GFP/pFap. Tal como se muestra en la figura 3, panel B, únicamente las células T CD8<sup>+</sup> purificadas a partir de ratones tratados con pFap pudieron inducir la apoptosis nuclear, evaluada mediante tinción de las células diana transfectadas con pFap utilizando el pigmento Hoechst-33342.

También se utilizaron en un ensayo convencional de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  esplenocitos de los ratones tratados. Con este fin, se incubaron esplenocitos de los ratones tratados con composición 1 y con la vacuna de control durante 5 días con fibroblastos A31 irradiados con rayos  $\gamma$ , que se habían infectado retrovíricamente con pFap. A continuación, los esplenocitos estimulados se incubaron durante 4 horas con células A31-pFap marcadas y se calculó el porcentaje de lisis. Los esplenocitos de los ratones tratados con la composición 1 pudieron lisar un número significativamente superior de fibroblastos que los procedentes de controles de vector vacío a proporciones de diana-a-efector de 1:100 y 1:25 (figura 3, panel C). La coincubación con anticuerpos anti-MHC de clase I eliminó dicho efecto (figura 3, panel D).

En una evaluación adicional, los ratones se trataron tres veces con composición 1 o con la vacuna de control y posteriormente se retaron con aproximadamente  $3 \times 10^4$  células tumorales CT26 para investigar la infiltración de células T CD8<sup>+</sup> en tumores de ratones tratados con pFap. Tras tres semanas, se recolectaron los tumores y se tiñeron suspensiones de células individuales para las células CD3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y se analizaron mediante FACS. Los ratones tratados con composición 1 mostraron un marcado incremento de las células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en el tejido tumoral en comparación con el control de vector vacío (figura 3, panel E).

También se tiñeron secciones tumorales con anti-CD8 FITC y tinción nuclear DAPI. Utilizando microscopía confocal, los tumores de los ratones tratados con composición 1 mostraron una infiltración más marcada con células CD8<sup>+</sup> que los ratones tratados con la vacuna de control del Ejemplo 1 (figura 3, panel F). Conjuntamente, estos resultados demuestran que una composición de ADN de la invención, con diana en FAP, puede superar la tolerancia a las células T periféricas contra el autoantígeno FAP.

La supresión de la expresión del colágeno de tipo I incrementa la incorporación intratumoral de pigmento. Los fibroblastos son la fuente principal de colágeno de tipo I y se ha informado de que la expresión de esta molécula se correlaciona inversamente con la incorporación intratumoral de compuestos de diverso peso molecular. Con el fin de evaluar si este mismo mecanismo es aplicable a las composiciones de ADN de la invención, secciones de tumor de ratones tratados se tiñeron con anticuerpos contra FAP (figura 4, panel A, fotografías en la parte superior) o contra colágeno de tipo I (figura 4, panel A, fotografías en la parte inferior). Se detectó una reducción de la expresión de FAP, así como de colágeno de tipo I, en los grupos de ratones tratados con composición I en comparación con ratones tratados únicamente con la vacuna de control (Ejemplo 1). Las transferencias western correspondientes de dichos extractos tumorales, teñidos con los mismos anticuerpos revelaron una reducción aproximada de  $82,63 \pm 2,54\%$  de la expresión de FAP (figura 4, panel B, foto superior) y una reducción aproximada de  $76,36 \pm 2,01\%$  de la expresión del colágeno de tipo I (figura 4, panel B, foto inferior).

A continuación, los ratones recibieron una inyección de tres compuestos de diferente tamaño y estructura: de fluoresceína (376 Da) (figura 4, panel C), de albúmina-azul de Evans (68.500 Da) (figura 4, panel D) o del agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (130 Da) (figura 4, panel E), tal como se ha indicado anteriormente. Los tumores de los ratones tratados con la composición de ADN 1 pFap incorporaron una cantidad significativamente superior ( $p < 0,05$ ) de dichas moléculas que los ratones en los que se había administrado la vacuna de control.

La combinación de la composición de ADN y quimioterapia conduce al rechazo tumoral. Se desarrolló un protocolo terapéutico mediante la combinación del tratamiento con una composición de ADN de la invención con el fármaco quimioterapéutico doxorubicina, a la que las células D2F2 eran parcialmente sensibles (figura 1, panel C). Se trataron ratones BALB/c (n=8) con la vacuna de control del Ejemplo 1 ó con la composición 1 del Ejemplo 1. A continuación, los ratones tratados se retaron ortotópicamente con células de carcinoma mamario D2F2. Estos dos grupos de ratones seguidamente se trataron con doxorubicina o con PBS a modo de control, 5, 10 y 15 días después del reto tumoral. Tal como se muestra en la figura 5, panel A, los tratamientos individuales con inmunoterapia (composición 1) o quimioterapia sólo pudieron suprimir, aunque no erradicar, el crecimiento tumoral. En contraste, el grupo de ratones tratados con la composición 1 y la doxorubicina en combinación no sólo revelaron una marcada inhibición del crecimiento tumoral, sino también un rechazo tumoral completo en 4 de 8 ratones (figura 5, panel A).

En otro enfoque de terapia de combinación en un contexto terapéutico, se retaron ratones BALB/c (n=8) i.v. con células tumorales D2F2. Tras el establecimiento de metástasis tras 5 días, los ratones se trataron semanalmente con composición 1. Un día después de cada tratamiento los ratones recibieron una inyección i.v. de doxorubicina. Como resultado de este tratamiento de combinación, la duración de vida de estos ratones superó en más de 3 veces a la de los ratones de control que habían sido tratados con sólo doxorubicina o sólo composición 1, y murieron tras tan sólo aproximadamente 35 a 45 días (figura 5, panel B).

Una composición de ADN de FAP de la invención incrementa la incorporación intratumoral de doxorubicina. Con el fin de determinar la concentración de doxorubicina en el tejido tumoral, se trataron ratones (n=4) tres veces a intervalos de 1 semana con composición 1, se retaron 7 días después con  $5 \times 10^5$  células tumorales D2F2 y se recibieron una inyección i.v. de doxorubicina 16 días después. Se determinó la concentración intratumoral de fármaco mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL-EM). Los tejidos de los ratones tratados con composición 1 mostraron un incremento significativo de la incorporación de doxorubicina en el tumor (figura 6, panel A) en comparación con los controles. Estos resultados están en línea con la infiltración química observada de los tumores en ratones tratados con fluoresceína, albúmina y 5-fluorouracilo (figura 4, paneles C-D).

La vacuna de ADN contra FAP no perjudica a la cicatrización de heridas ni daña el tejido normal. Debido a que FAP se sobreexpresa durante la cicatrización de heridas, se investigaron los efectos de las composiciones de ADN de la invención sobre la cicatrización de heridas. Se realizó una herida circular de aproximadamente 3 mm de diámetro en los lomos de ratones BALB/c tratados (n=4). Inesperadamente, no se observó ninguna diferencia significativa en la cicatrización de las heridas entre ratones tratados y no tratados (figura 6, panel B). La evaluación histológica por un patólogo experto en ratones de estas heridas tras diferentes puntos temporales no reveló anomalías cualitativas en el proceso de cicatrización de heridas. Para excluir cualesquiera reacciones autoinmunitarias inducidas por las composiciones de ADN de la invención, se llevó a cabo un análisis histológico completo de los tejidos y órganos siguientes: piel, cerebro, médula espinal, músculo, hueso, sinovia, corazón, aorta, arteria pulmonar, timo, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea, glándula paratiroides, glándula adrenal, riñones, útero, vagina, glándula clitorídea, lengua, hígado, pulmones, páncreas, estómago, intestino delgado y colon. No se observaron diferencias discernibles con los ratones de control.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> REISFELD, Ralph A.

5 LOEFFLER, Markus

KRÜGER, Jörg A.

NIETHAMMER, Andreas G.

10 <120> COMPOSICIÓN DE ADN CONTRA EL ANTÍGENO TUMOR ESTROMAL FAP Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE LA MISMA

<130> TSRI 951.1 PCT

15 <150> US 60/815.316  
<151> 2006-06-21

<160> 16

20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 2648

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ctgaagacag aattagctaa ctttcaaaaa catctggaaa aatgaagact tgggtaaaaa 60
tcgtatttgg agttgccacc tctgctgtgc ttgccttatt ggtgatgtgc attgtcttac 120
gcccttcaag agttcataac tctgaagaaa atacaatgag agcactcaca ctgaaggata 180
ttttaaattg aacattttct tataaaacat tttttccaaa ctggatttca ggacaagaat 240
atcttcatca atctgcagat aacaatatag tactttataa tattgaaaca ggacaatcat 300
ataccatttt gagtaataga accatgaaaa gtgtgaaatgc ttcaaattac ggcttatcac 360
ctgatcggca atttgtatat ctagaaagtg attattcaaa gctttggaga tactcttaca 420
cagcaacata ttacatctat gaccttagca atggagaatt tgtaagagga aatgagcttc 480
ctcgtccaat tcagtattta tgctggctgc ctggtgggag taaattagca tatgtctatc 540
aaaacaatat ctatttgaaa caaagaccag gagatccacc ttttcaaata acatttaatg 600
gaagagaaaa taaaatattt aatggaatcc cagactgggt ttatgaagag gaaatgcttg 660
ctacaaaata tgctctctgg tggctctccta atggaaaatt tttggcatat gcggaattta 720
atgatacggg tataccagtt attgcctatt cctattatgg cgatgaacaa tatcctagaa 780
caataaatat tccataccca aaggctggag ctaagaatcc cgttgttcgg atatttatta 840
tcgataccac ttaccctgcy tatgtaggtc ccaggaagt gcctgttcca gcaatgatag 900
cctcaagtga ttattatttc agttggctca cgtgggttac tgatgaacga gtatgtttgc 960
agtggctaaa aagagtccag aatgtttcgg tccctgtctat atgtgacttc agggaaagact 1020
ggcagacatg ggattgtcca aagaccagg agcatataga agaaagcaga actggatggg 1080
ctgggtggatt ctttgtttca acaccagttt tcagctatga tgccatttcg tactacaaaa 1140
tatttagtga caaggatggc tacaacataa ttcactatat caaagacact gtggaaaaatg 1200
ctattcaaat tacaagtggc aagtgggagg ccataaatat attcagagta acacaggatt 1260
cactgtttta ttctagcaat gaatttgaag aataccctgg aagaagaaac atctacagaa 1320
ttagcatatg aagctatcct ccaagcaaga agtgtgttac ttgccatcta aggaaagaaa 1380
ggtgccaata ttacacagca agtttcagcg actacgcaa gtactatgca cttgtctgct 1440
acggcccagg catccccatt tccacccttc atgatggacg cactgatcaa gaaatataaa 1500
tcctgggaaga aaacaaggaa ttggaaaaatg ctttgaaaaa tatccagctg cctaaagagg 1560
aaattaagaa acttgaagta gatgaaatta ctttatggta caagatgatt cttcctcctc 1620
aatttgacag atcaaagaag tatcccttgc taattcaagt gtatgggtgt ccctgcagtc 1680
agagtgttaag gctctgtatt gctgttaatt ggatatctta tcttgcaagt aaggaagggg 1740
tggtcattgc cttgggtggat ggtcagggaa cagctttcca aggtgacaaa ctctctatg 1800
cagtgatcag aaagctgggt gtttatgaag ttgaagacca gattacagct gtcagaaaaa 1860
tcatagaaat gggtttcatt gatgaaaaaa gaatagccat atggggctgg tcctatggag 1920
gatcagtttc atcactggcc cttgcatctg gaactggctc tttcaaattg ggtatagcag 1980

```

30

ES 2 393 372 T3

```

tggetccagt ctcagctgg gaatattacg cgtctgteta cacagagaga ttcattgggtc 2040
tcccaacaaa ggatgataat cttgagcact ataagaattc aactgtgatg gcaagagcag 2100
aatatttcag aaatgtagac tatcttctca tccacggaac agcagatgat aatgtgcact 2160
ttcaaaactc agcacagatt gctaaagctc tggttaatgc acaagtggat ttcCaggcaa 2220
tgtggtactc tgaccagaac cacggcttat ccggcctgtc cacgaaccac ttatacaccc 2280
acatgaccca cttcctaaag cagtgtttct ctttgtcaga ctaaaaacga tgcagatgca 2340
agcctgtatc agaactctgaa aaccttatat aaaccctca gacagtttgc ttattttatt 2400
ttttatggtg taaaatgcta gtataaacia acaaattaat gttgttctaa aggctggtaa 2460
aaaaaagatg aggaactcaga agttcaagct aaatattggt tacattttct ggtactctgt 2520
gaaagaagag aaaagggagt catgcatttt gctttggaca cagtgtttta tcacctgttc 2580
atttgaagaa aaataataaa gtcagaagtt caagtgcgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640
aaaaaaaaa

```

<210> 2

<211> 760

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

ES 2 393 372 T3

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

- <210> 3
- 5 <211> 2615
- <212> ADN
- <213> mus musculus

<400> 3

```

ccacgcgtcc  gcacagatgc  ggtgaccac  gctgtgcagt  gagaatcagc  taacttgcaa  60
aaacatctgg  aaaaatgaag  acatggctga  aaactgtctt  tggagttacc  accctggctg  120
cgcttgcttt  agtggtgata  tgcattgtct  tacgtccctc  aagagtttac  aaacctgaag  180
gaaacacaaa  gagagctctt  acctgaaggg  atattttaaa  tggaacattc  tcatataaaa  240
catattttcc  caactggatt  tcagaacaag  aatatcttca  tcaatctgag  gatgataaca  300
tagtatttta  taatattgaa  acaagagaat  catatatcat  tttgagtaat  agcaccatga  360
aaagtgtgaa  tgctacagat  tatggtttgt  cacctgatcg  gcaatttgtg  tatctagaaa  420
gtgattattc  aaagetctgg  cgatattcat  acacagcgac  ataactacatc  tacgaccttc  480
agaatgggga  atttgaaga  ggatacgage  tccctcgtcc  aattcagtat  ctatgctggt  540
cgctgttgg  gagtaaatta  gcatatgtat  atcaaaaaca  tattttattg  aaacaagac  600
caggagatcc  accttttcaa  ataactata  ctggaagaga  aaatagaata  ttaaatgga  660
taccagactg  ggtttatgaa  gaggaaatgc  ttgccacaaa  atatgctctt  tggaggcttc  720
cagatggaaa  atttttggca  tatgtagaat  ttaatgatcc  agatatacca  attattgctt  780
attcttatta  tgggtgatgga  cagtatccta  gaactataaa  tattccatat  ccaaggctg  840
gggctaagaa  tccggttggt  cgtgttttta  tagttgacac  cacctacct  caccagctgg  900
gcccaatgga  ggatgccact  tcagaaatga  tagctcaag  tgactattat  ttcagctggg  960
tcacatgggt  gtccagtgaa  cgagtatgct  tgcagtggtc  aaaaagagtg  cagaatgctt  1020
cagtcctgtc  tatatgtgat  ttcagggaa  actggcatgc  atgggaatgt  ccaaagaacc  1080
aggagatgt  agaagaagc  agaacaggt  gggctgggtg  attccttgtt  tcgacaccag  1140
cttttagcca  ggatgccact  tcttactaca  aatatttag  cgacaaggat  ggttacaacc  1200
atattcacta  catcaaagac  actgtggaaa  atgctattca  aattacaagt  ggcaagtggg  1260
aggccatata  tatatccgc  gtaacacagg  attcactggt  ttattctagc  aatgaatttg  1320
aaggttacc  tgaagaaga  aacatctaca  gaattagcat  ggaactct  cctcagagca  1380
agaagtgtgt  tacttgccat  ctaaggaaag  aaaggtgcca  atattacaca  gcaagtttca  1440
gctacaaagc  caagtaactat  gcaactcgtc  gctatggccc  tggcctcccc  atttccaccc  1500
tccatgatgg  ccgcacagac  caagaaatac  aagtattaga  agaaaacaaa  gaactggaaa  1560
attctctgag  aaatatccag  ctgcctaaag  tggagattaa  gaagctcaaa  gacggygggac  1620
tgactttctg  gtacaagatg  attctgcctc  ctcagtttga  cagatcaaag  aagtaccctt  1680
tgctaattca  agtgtatggt  ggtccttgta  gccagagtgt  taagtctgtg  ttgctgttta  1740
attggataac  ttatctcgca  agtaaggagg  ggatagtcac  tgccttggt  gatggctcgg  1800
gcaactgttt  ccaagtgac  aaatcctgc  atgccgtgta  tcgaaaactg  ggtgtatatg  1860
aagttgagga  ccagctcaca  gctgtcagaa  aattcataga  aatgggtttc  attgatgaag  1920
aaagaatagc  catatggggc  tggctctacg  gaggttatgt  ttcctcctg  gcccttgcat  1980
ctggaactgg  tcttttcaaa  tgtggcatag  cagtggtccc  agtctccagc  tgggaatatt  2040
acgcatctat  ctactcagag  agattcatgg  gcctcccaac  aaaggacgac  aatctcgaac  2100
actataaaaa  ttcaactgtg  atggcaagag  cagaatattt  cagaaatgta  gactatcttc  2160
tcatccacgg  aacagcagat  gataatgtgc  actttcagaa  ctcagcacag  attgctaaag  2220
ctttgggtaa  tgcacaagtg  gatttccagg  aatccacat  ctctgaccag  aacctgggta  2280
tattatctgg  gcgctcccag  aatcatttat  ataccacat  gacgcacttc  ctaagcaat  2340
gcttttcttt  atcagactga  accaatgcaa  gtactagcgt  gtaggacagt  ctgaaggctt  2400
cacatggacg  acttggacca  tgaatattgt  aaaagccgct  aaaaatttag  gagggctcag  2460
gaggttaggc  tccgtattgt  ttacatttcc  ctatgctctg  tgaagaaga  gaaaagggga  2520
gccacacatc  ttgctttgga  cacaatgtt  tatcactgt  tcattgcccg  gtagegggaaa  2580
taaagtcaga  tgctcaggtt  aaaaaaaaa  aaaaa  2615

```

<210> 4

5 <211> 761

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

```

Met  Lys  Thr  Trp  Leu  Lys  Thr  Val  Phe  Gly  Val  Thr  Thr  Leu  Ala  Ala
  1          5          10
Leu  Ala  Leu  Val  Val  Ile  Cys  Ile  Val  Leu  Arg  Pro  Ser  Arg  Val  Tyr
          20          25          30
Lys  Pro  Glu  Gly  Asn  Thr  Lys  Arg  Ala  Leu  Thr  Leu  Lys  Asp  Ile  Leu
          35          40          45

```

10

Asn	Gly	Thr	Phe	Ser	Tyr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	Asn	Trp	Ile	Ser	Glu
	50					55					60				
Gln	Glu	Tyr	Leu	His	Gln	Ser	Glu	Asp	Asp	Asn	Ile	Val	Phe	Tyr	Asn
65					70					75					80
Ile	Glu	Thr	Arg	Glu	Ser	Tyr	Ile	Ile	Leu	Ser	Asn	Ser	Thr	Met	Lys
				85					90					95	
Ser	Val	Asn	Ala	Thr	Asp	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Asp	Arg	Gln	Phe	Val
			100					105					110		
Tyr	Leu	Glu	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Leu	Trp	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ala
		115					120					125			
Thr	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Leu	Gln	Asn	Gly	Glu	Phe	Val	Arg	Gly	Tyr
	130					135					140				
Glu	Leu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gln	Tyr	Leu	Cys	Trp	Ser	Pro	Val	Gly	Ser
145					150					155					160
Lys	Leu	Ala	Tyr	Val	Tyr	Gln	Asn	Asn	Ile	Tyr	Leu	Lys	Gln	Arg	Pro
				165					170					175	
Gly	Asp	Pro	Pro	Phe	Gln	Ile	Thr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Glu	Asn	Arg	Ile
			180					185					190		
Phe	Asn	Gly	Ile	Pro	Asp	Trp	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Met	Leu	Ala	Thr
	195						200					205			
Lys	Tyr	Ala	Leu	Trp	Trp	Ser	Pro	Asp	Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Tyr	Val
	210					215					220				
Glu	Phe	Asn	Asp	Ser	Asp	Ile	Pro	Ile	Ile	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Gly
225					230					235					240
Asp	Gly	Gln	Tyr	Pro	Arg	Thr	Ile	Asn	Ile	Pro	Tyr	Pro	Lys	Ala	Gly
				245					250					255	
Ala	Lys	Asn	Pro	Val	Val	Arg	Val	Phe	Ile	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro
			260					265					270		
His	His	Val	Gly	Pro	Met	Glu	Val	Pro	Val	Pro	Glu	Met	Ile	Ala	Ser
	275					280						285			
Ser	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Trp	Leu	Thr	Trp	Val	Ser	Ser	Glu	Arg	Val
	290					295					300				
Cys	Leu	Gln	Trp	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Asn	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Ile
305					310					315					320
Cys	Asp	Phe	Arg	Glu	Asp	Trp	His	Ala	Trp	Glu	Cys	Pro	Lys	Asn	Gln
				325				330						335	
Glu	His	Val	Glu	Glu	Ser	Arg	Thr	Gly	Trp	Ala	Gly	Gly	Phe	Phe	Val
			340					345					350		
Ser	Thr	Pro	Ala	Phe	Ser	Gln	Asp	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Ile	Phe
		355				360						365			
Ser	Asp	Lys	Asp	Gly	Tyr	Lys	His	Ile	His	Tyr	Ile	Lys	Asp	Thr	Val
	370					375					380				
Glu	Asn	Ala	Ile	Gln	Ile	Thr	Ser	Gly	Lys	Trp	Glu	Ala	Ile	Tyr	Ile
385				390						395					400
Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Asp	Ser	Leu	Phe	Tyr	Ser	Ser	Asn	Glu	Phe	Glu
				405					410					415	
Gly	Tyr	Pro	Gly	Arg	Arg	Asn	Ile	Tyr	Arg	Ile	Ser	Ile	Gly	Asn	Ser
			420					425					430		
Pro	Pro	Ser	Lys	Lys	Cys	Val	Thr	Cys	His	Leu	Arg	Lys	Glu	Arg	Cys
		435					440					445			
Gln	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Ser	Phe	Ser	Tyr	Lys	Ala	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Leu
	450					455					460				
Val	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gly	Leu	Pro	Ile	Ser	Thr	Leu	His	Asp	Gly	Arg
465				470						475					480
Thr	Asp	Gln	Glu	Ile	Gln	Val	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Glu	Leu	Glu	Asn
				485					490					495	
Ser	Leu	Arg	Asn	Ile	Gln	Leu	Pro	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys
			500					505					510		
Asp	Gly	Gly	Leu	Thr	Phe	Trp	Tyr	Lys	Met	Ile	Leu	Pro	Pro	Gln	Phe
		515					520					525			

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro  
 530 535 540  
 Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr  
 545 550 555 560  
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly  
 565 570 575  
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu  
 580 585 590  
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile  
 595 600 605  
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser  
 610 615 620  
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr  
 645 650 655  
 Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp  
 660 665 670  
 Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr  
 675 680 685  
 Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn  
 690 695 700  
 Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala  
 705 710 715 720  
 Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile  
 725 730 735  
 Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe  
 740 745 750  
 Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp  
 755 760

<210> 5  
 <211> 814  
 5 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 5  
 atcactctct ttaatcacta ctcacagtaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc 60  
 aactcctgtc ttgcattgca ctaagtcttg cacttgtcac aaacagtgca cctacttcaa 120  
 gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta cagatgatgt 180  
 tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca ttttaagttt 240  
 acatgcccac gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa gaactcaaac 300  
 ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcaactaaga cccagggact 360  
 taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca acattcatgt 420  
 gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attacctttt 480  
 gtcaaagcat catctcaaca ctgacttgat aattaagtgc ttcccactta aaacgtatca 540  
 ggccttctat ttattttaa atttaaattt tatatttatt gttgaaatgta tggtttgcta 600  
 cctattgtaa ctattattct taatcttaaa actataaata tggatctttt atgattcttt 660  
 ttgtaagccc taggggctct aaaatggttt cacttattta tcccaaaata ttattatta 720  
 tgttgaaatg taaatatagt atctatgtag attggttagt aaaactattt aataaatttg 780  
 ataaatataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 814

10 <210> 6  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

15 <400> 6  
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

```

1           5           10           15
Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145           150

```

<210> 7  
 <211> 939  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

5

```

<400> 7
atcaccccttg ctaatcactc ctcacagtga cctcaagtcc tgcaggcatg tacagcatgc 60
agctcgcatc ctgtgtcaca ttgacacttg tgctccttgt caacagcgca cccacttcaa 120
gctccacttc aagctctaca gcggaagcac agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc 180
agcagcacct ggagcagctg ttgatggacc tacaggagct cctgagcagg atggagaatt 240
acaggaacct gaaactcccc aggatgctca ccttcaaatt ttacttgccc aagcaggcca 300
cagaattgaa agatcttcag tgcctagaag atgaacttgg acctctgceg catgttcttg 360
atltgactca aagcaaaagc tttcaattgg aagatgctga gaatttcac agcaatatca 420
gagtaactgt tgtaaaacta aagggctctg acaacacatt tgagtgccaa ttcgatgatg 480
agtcagcaac tgtggtggac tttctgagga gatggatagc cttctgtcaa agcatcatct 540
caacaagccc tcaataacta tgtacctcct gcttacaaca cataaggctc tctatttatt 600
taaataattta actttaattt atttttggat gtattgttta ctatcttttg taactactag 660
tcttcagatg ataaatatgg atcttttaaag attctttttg taagcccaa gggctcaaaa 720
atgttttaaa ctatttatct gaaattatct attatattga attgttaaat atcatgtgta 780
ggtagactca ttaataaaag tatttagatg attcaaatat aaataagctc agatgtctgt 840
catttttagg acagcaciaa gtaagcgcta aaataacttc tcagttatcc ctgtgaactc 900
tatgttaatc agtgttttca agaaataaag ctctctctc 939

```

10

<210> 8  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

15

```

<400> 8
Met Tyr Ser Met Gln Leu Ala Ser Cys Val Thr Leu Thr Leu Val Leu
1           5           10           15
Leu Val Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala
Glu Ala Gln His Leu
Glu Gln Leu Leu Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn
Tyr Arg Asn Leu Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu
Pro Lys Gln Ala Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu
Leu Gly Pro Leu Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe
Gln Leu Glu Asp Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val
Val Lys Leu Lys Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp
Glu Ser Ala Thr Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys
145           150           155           160

```

ES 2 393 372 T3

<210> 9  
 <211> 852  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

5

<400> 9  
 cttgcagctg cccacctcac cctcagctct ggctcttac tcaccctcta ccacagacat 60  
 ggctcagtea ctggctctga gcctccttat cctggttctg gcctttggca tccccaggac 120  
 ccaaggcagt gatggagggg ctcaggactg ttgcctcaag tacagccaaa ggaagattcc 180  
 cgccaagggt gtccgcagct accggaagca ggaaccaagc ttaggctgct ccaccccagc 240  
 tatectgttc ttgccccgca agecctctca ggcaagctta tgtgcagacc caaaggagct 300  
 ctgggtgcag cagctgatgc agcatctgga caagacacca tccccacaga aaccagccca 360  
 gggctgcagg aaggacaggg gggcctccaa gactggcaag aaaggaaagg gctccaaaag 420  
 ctgcaagagg actgagcggg cacagacccc taaagggcca tagcccagtg agcagcctgg 480  
 agccctggag accccaccag cctcaccaac gcttgaagcc tgaaccaag atgcaagaag 540  
 gaggctatgc tcaggggccc tggagcagcc accccatgct ggcccttgcca cactctttct 600  
 cctgctttaa ccaccccata tgcattccca gctctaccct gcatggctga gctgcccaca 660  
 gcaggccagg tccagagaga ccgaggaggg agagtctccc agggagcatg agaggaggca 720  
 gcaggactgt cctcttgaag gagaatcacc aggaccctgg acctgatacg gctccccagt 780  
 acaccccacc tcttctctgt aaatatgatt tatacctaac tgaataaaaa gctgtttctgt 840  
 cttcccacc gc 852

<210> 10  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

10

<400> 10  
 Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys  
 20 25 30  
 Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr  
 35 40 45  
 Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe  
 50 55 60  
 Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro  
 85 90 95  
 Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr  
 100 105 110  
 Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser  
 115 120 125  
 Gln Thr Pro Lys Gly Pro  
 130

15

<210> 11  
 <211> 615  
 <212> ADN  
 <213> mus musculus

20

<400> 11  
 gaattcggcc aaagaggcct acggccaaag agggctaaac ttgcggctgt ccactctcacc 60  
 tacagctctg gtctcctcct caactcaacc acaatcatgg ctcagatgat gactctgagc 120  
 ctecttagcc tggctcctggc tctctgcatc ccctggaccc aaggcagtga tggagggggg 180  
 caggactgct gccttaagta cagccagaag aaaattccct acagtattgt ccgaggctat 240  
 aggaagcaag aaccaagttt aggctgtccc atcccggcaa tccctgttctc accccggaag 300  
 cactctaagc ctgagctatg tgcaaaccct gaggaaggct ggggtgcagaa cctgatgcgc 360  
 cgcttgacc agcctccagc cccagggaaa caaagccccg gctgcaggaa gaaccgggga 420  
 acctctaagt ctggaagaa aggaaagggc tccaagggct gcaagagaac tgaacagaca 480  
 cagccctcaa gaggatagcc cagtagccc cctggagccc aggagatccc ccacgaactt 540  
 caagctgggt ggttcacggg ccaactcaca ggcaagagg gagctagaaa acagactcag 600  
 gagccgctag tcgag 615

25

<210> 12  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> mus musculus

<400> 12

```

Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe
 1      5      10
Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys
      20      25      30
Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr
      35      40      45
Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe
      50      55      60
Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu
      65      70      75      80
Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro
      85      90      95
Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr
      100      105      110
Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser
      115      120      125
Gln Thr Pro Lys Gly Pro
      130
    
```

- 5 <210> 13
- <211> 878
- <212> ADN
- <213> mus musculus

10 <400> 13

```

atcccagccc acgcacagac ccccaacttg cagctgccca cctcaccctc agctctggcc 60
tcttactcac cctctaccac agacatggct cagtcactgg ctctgagcct cttatcctg 120
gtttctggcct ttggcatccc caggacccaa ggcagtgatg gaggggctca ggactgttgc 180
ctcaagtaca gccaaaggaa gattcccgcc aaggttgtcc gcagctaccg gaagcaggaa 240
ccaagcttag gctgctccat cccagctatc ctgttcttgc cccgcaagcg ctctcaggca 300
gagctatgtg cagaccctaa ggagctctgg gtgcagcagc tgatgcagca tctggacaag 360
acaccatccc cacagaaaac agcccagggc tgcaggaagg acaggggggc ctccaagact 420
ggcaagaaag gaaaggctc caaaggctgc aagaggactg agcggtcaca gaccctaaa 480
gggcccatag ccagtgaaca gcctggagcc ctggagacc caccagctc accagcett 540
gaagcctgaa cccaagatgc aagaaggagg ctatgctcag gggcctgga gcagccacc 600
catgctggcc ttgccacact ctttctcctg ctttaaccac cccatctgca tcccagctc 660
taccctgcat ggctgagctg cccacagcag gccagggtcca gagagaccga ggagggagag 720
tctcccaggg agcatgagag gaggcagcag gactgtcccc ttgaaggaga atcatcagga 780
ccctggacct gatcggctc cccagtacac cccacctctt ccttgtaaat atgatttata 840
cctaactgaa taaaagctg ttctgtcttc ccacccaa 878
    
```

- 15 <210> 14
- <211> 134
- <212> PRT
- <213> mus musculus

<400> 14

```

Met Ala Gln Ser Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Ala Phe
 1      5      10
Gly Ile Pro Arg Thr Gln Gly Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys
      20      25      30
Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr
      35      40      45
Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe
      50      55      60
Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu
      65      70      75      80
Leu Trp Val Gln Gln Leu Met Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro
      85      90      95
Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr
      100      105      110
Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser
      115      120      125
Gln Thr Pro Lys Gly Pro
      130
    
```

- 20 <210> 15

<211> 1816  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

5 <400> 15

```

cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagca tgatcgaaac atacaaccaa 60
acttctcccc gatctgcggc cactggactg cccatcagca tgaaaatttt tatgtattta 120
cttactggtt ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat 180
agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg aagatthtgt attcatgaaa 240
acgatacaga gatgcaacac aggagaaaga tccttatcct tactgaactg tgaggagatt 300
aaaagccagt ttgaaggcct tgtgaaggat ataatgttaa acaaagagga gacgaagaaa 360
gaaaacagct ttgaaatgca aaaaggtgat cagaatcctc aaattgcggc acatgtcata 420
agtgaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc 480
atgagcaaca acttggtaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgtaa aagacaagga 540
ctctattata tctatgcccc agtcaccttc tgttccaatc ggggaagcttc gagtcaagct 600
ccattttatg ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tccgagagaat ctctactcaga 660
gctgcgcaata cccacagtcc cgccaaacct tgcgggcaac aatccattca ctggggagga 720
gtattttgaat tgcaaccagg tgcttgggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg 780
agccatggca ctggcttcac gtctcttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcaccttgc 840
aggctgtggt ggagctgacg ctgggagtct tcataatata gcacagcggg taagcccacc 900
ccctgttaac tgcctattta taacctagg atcctcctta tggagaacta ttattatac 960
actccaaggg atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaacggggc 1020
cctgtctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag 1080
agtcctatga aaagacaagg ccattatgca caggttgaat tctgagtaaa cagcagataa 1140
cttgccaagt tcagttttgt ttctttgcgt gcagtgctt tccatggata atgcatttga 1200
tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcacattca gttatggttg 1260
actctggggt cctatggcct tgttggggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagtgg 1320
agaaccgaaa cccccccc cccctctcgg accctctcgg acagttatcc attctcttc 1380
aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaate 1440
tctctttctc aatctctctg ttctcctttg tcagttctct cctcccccca gtctctcttc 1500
tcaatcccc tttetaaac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 1560
acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccaccc 1620
tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg 1680
cccactcctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc 1740
tccattgttt ccagagtgaa cttgtaatta tcttgttatt tattttttga ataataaaga 1800
cctcttaaca ttaaaa
    
```

<210> 16  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

10

<400> 16

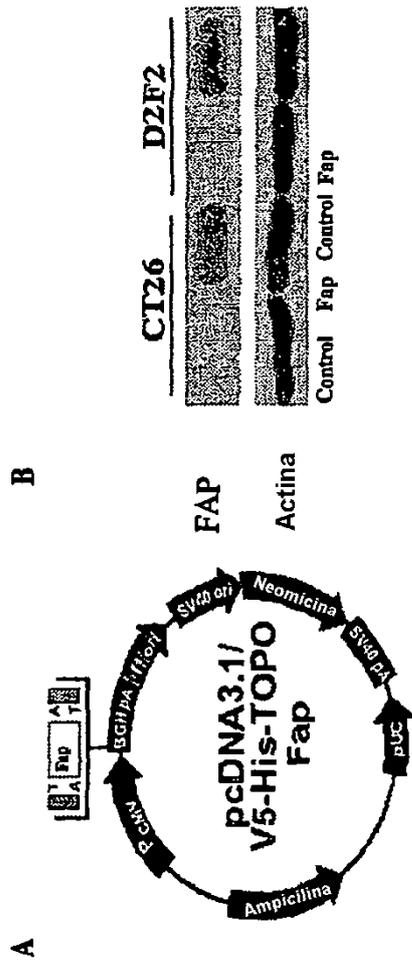
```

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

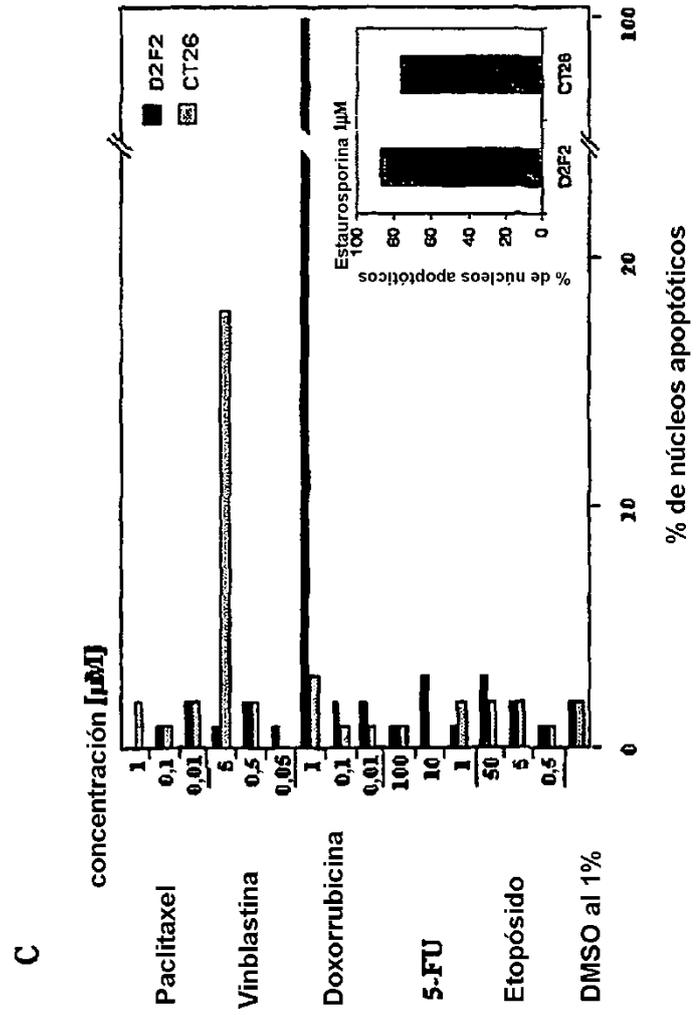
15

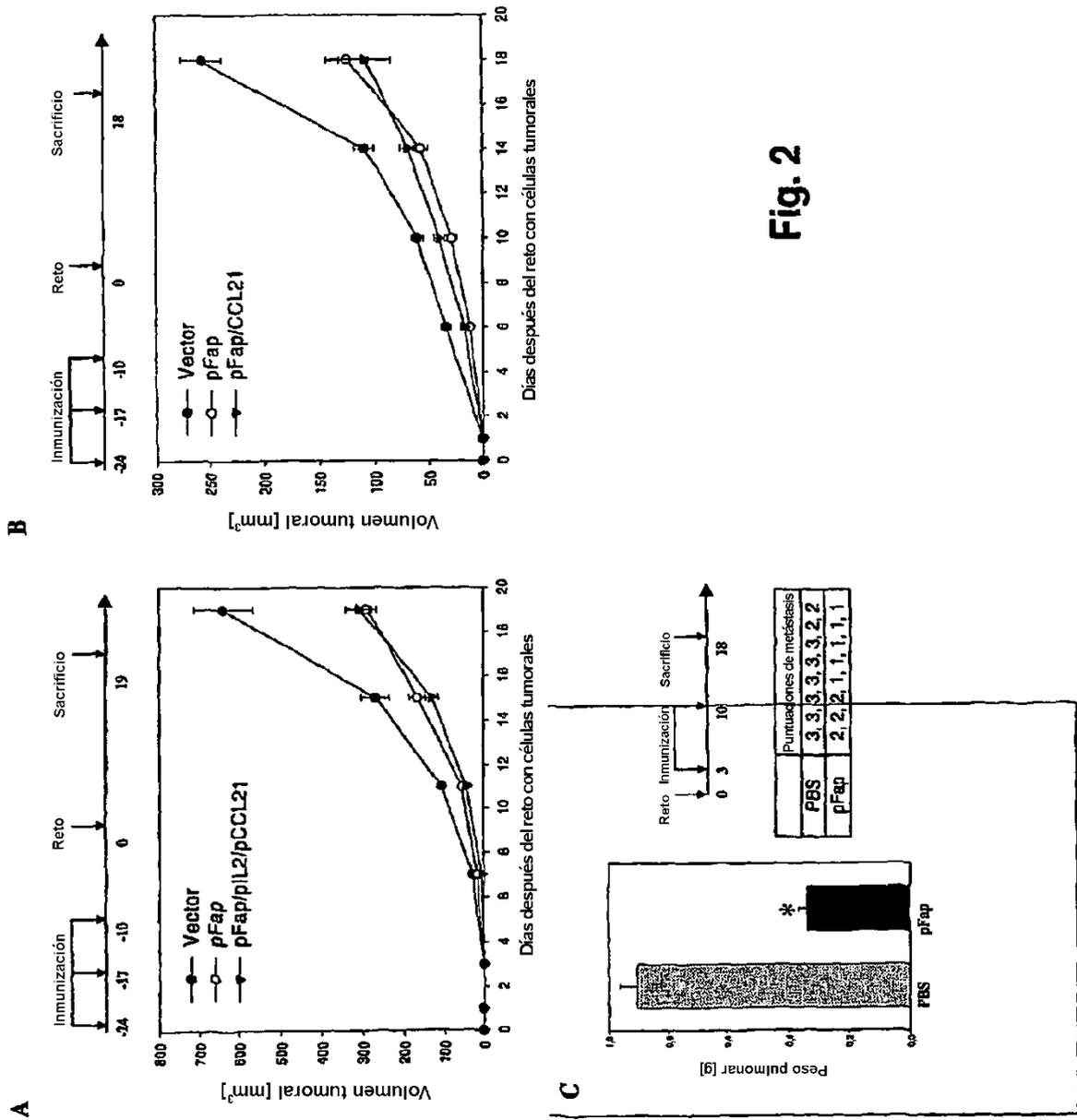
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición eficaz para inducir una respuesta inmunitaria contra células tumorales estromales que expresan una proteína de activación fibroblástica (FAP), que comprende un constructo de ADN que codifica FAP y que está incorporado en un vector bacteriano *Salmonella typhimurium* atenuado, en la que el constructo de ADN es expresable en células inmunitarias y está incorporado en un portador farmacéuticamente aceptable.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el constructo de ADN codifica la FAP humana (SEC ID nº 2).
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, en la que el constructo de ADN es un ADN sustancialmente purificado que presenta la secuencia polinucleótida que consiste en SEC ID nº 1 o una secuencia polinucleótida que presenta por lo menos aproximadamente un 80% de similitud con la misma.
- 15 4. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un constructo de ADN codificante de una proteína efectora inmunitaria expresable en células inmunitarias.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que la proteína efectora inmunitaria es una citoquina.
- 20 6. Composición según la reivindicación 5, en la que la citoquina es CCL21, IL-2 o CD40LT.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la utilización en la inhibición del crecimiento tumoral o las metástasis tumorales.



**Fig. 1**





**Fig. 2**

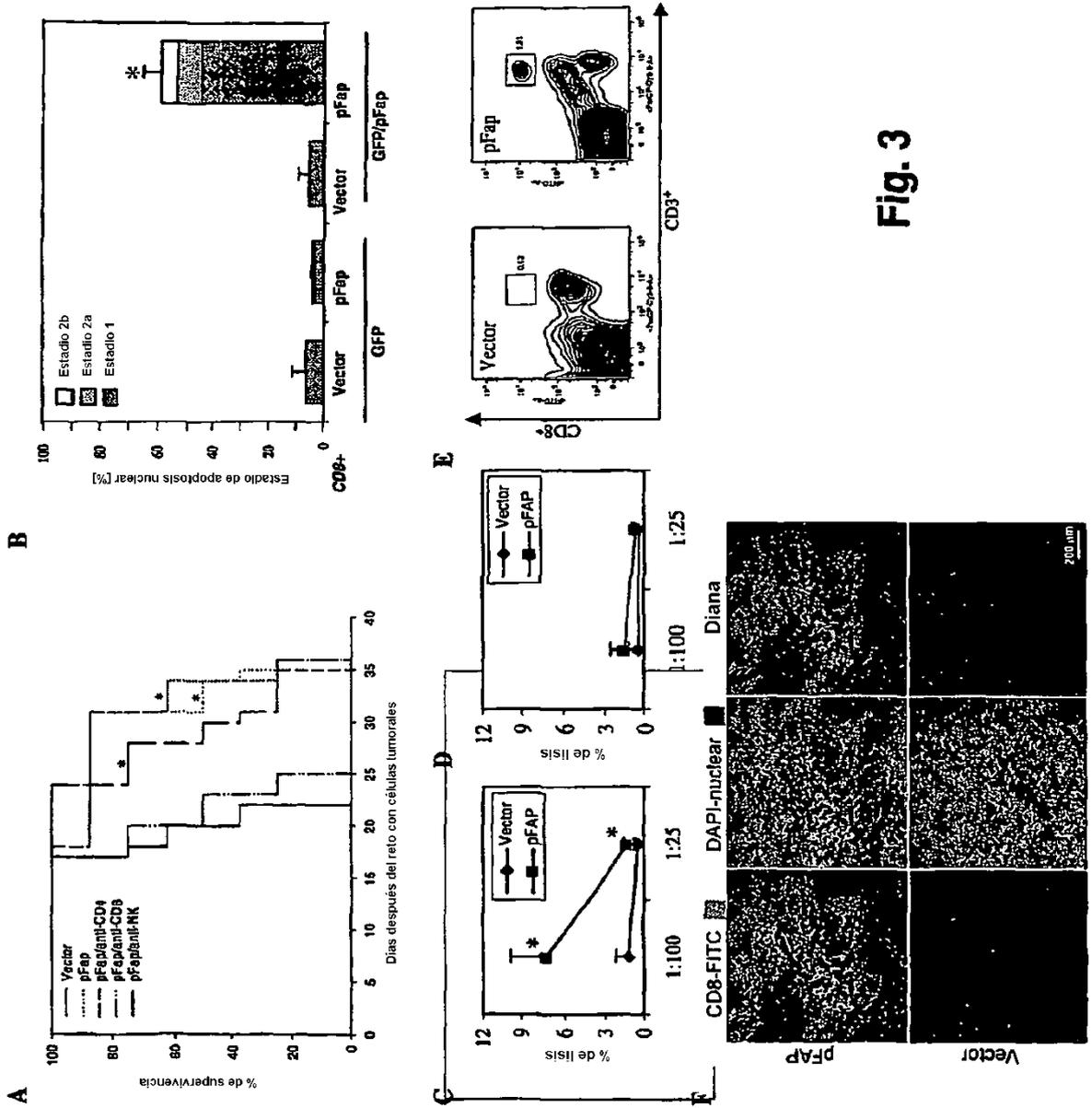
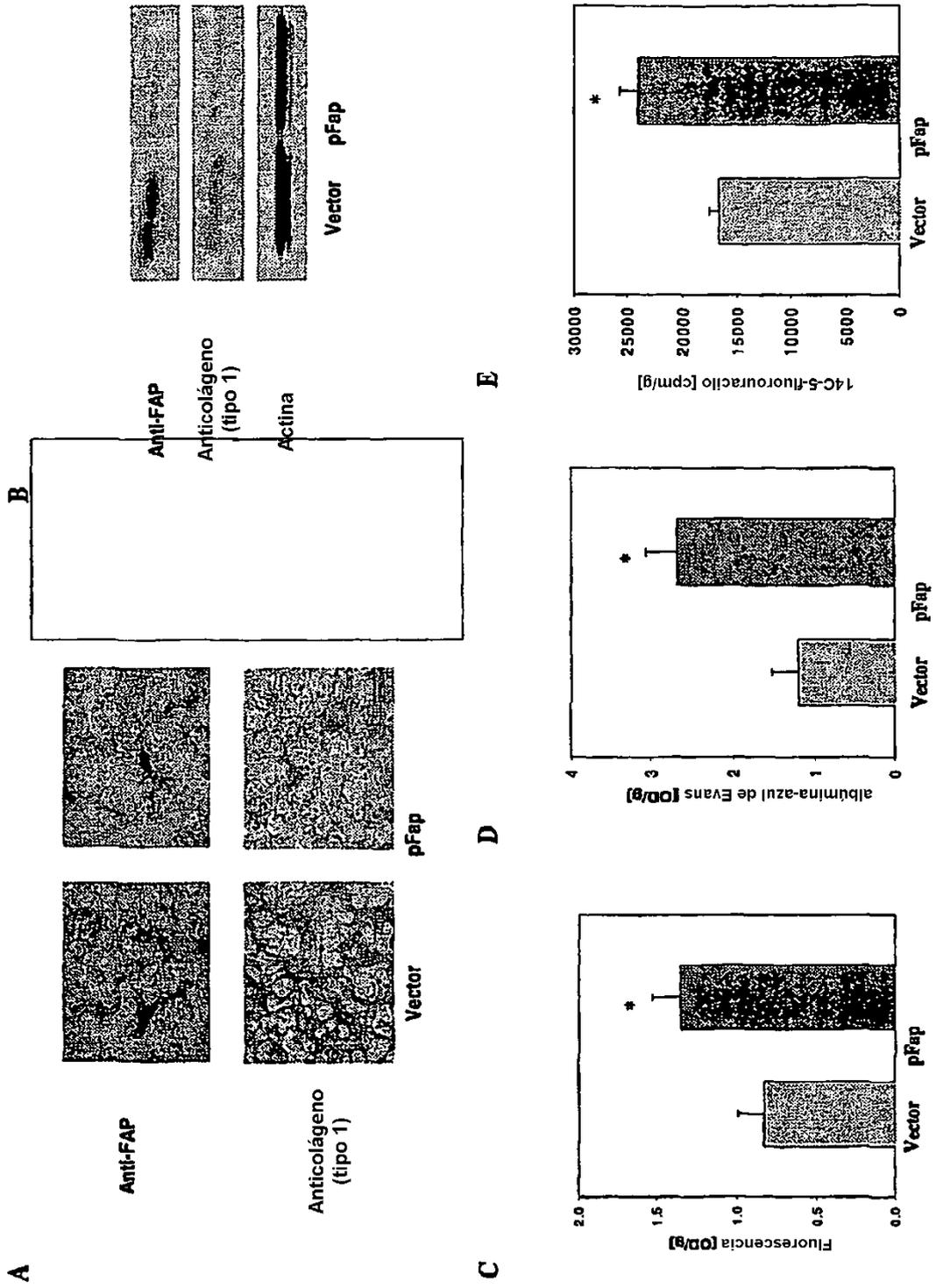
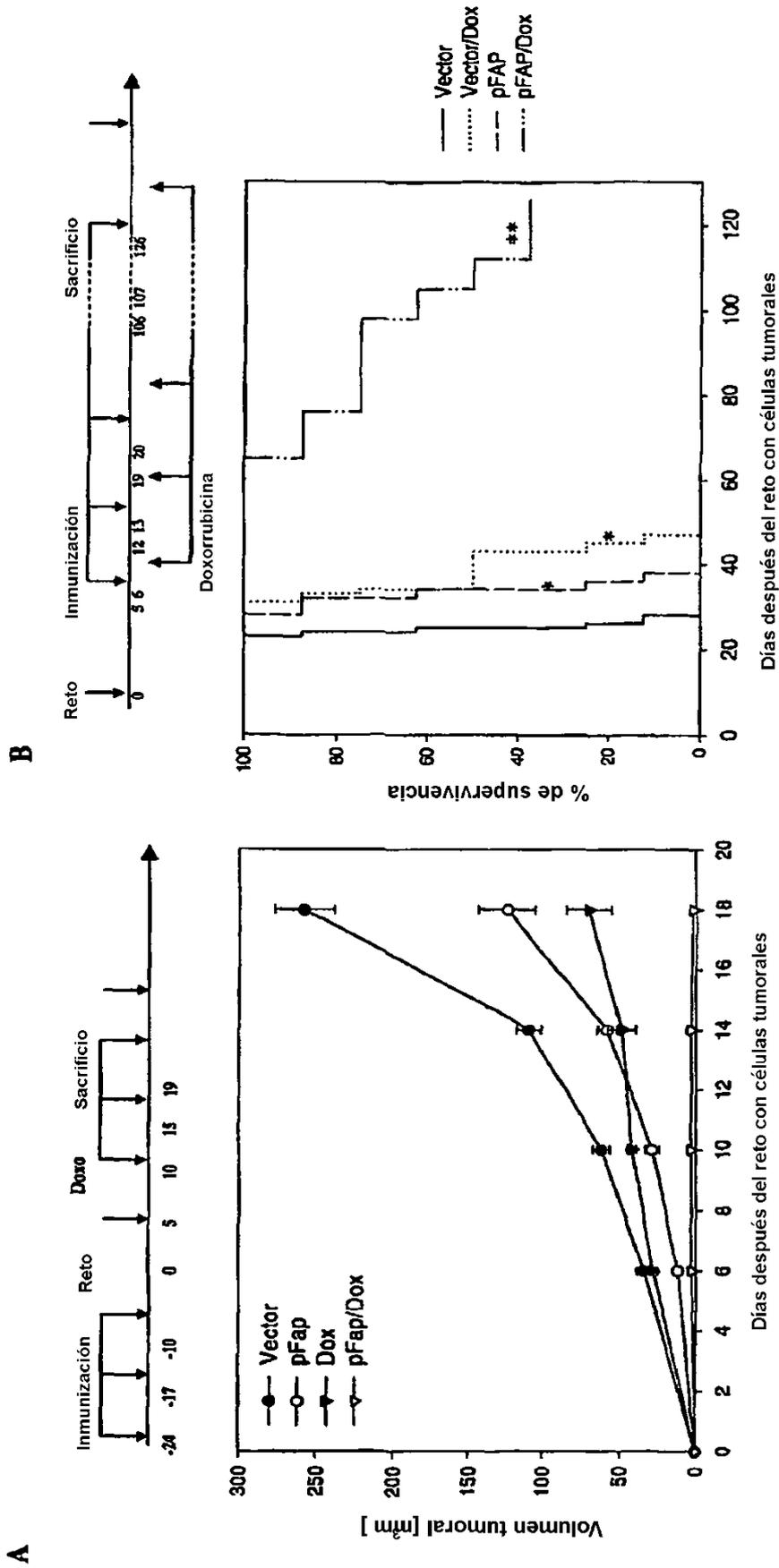


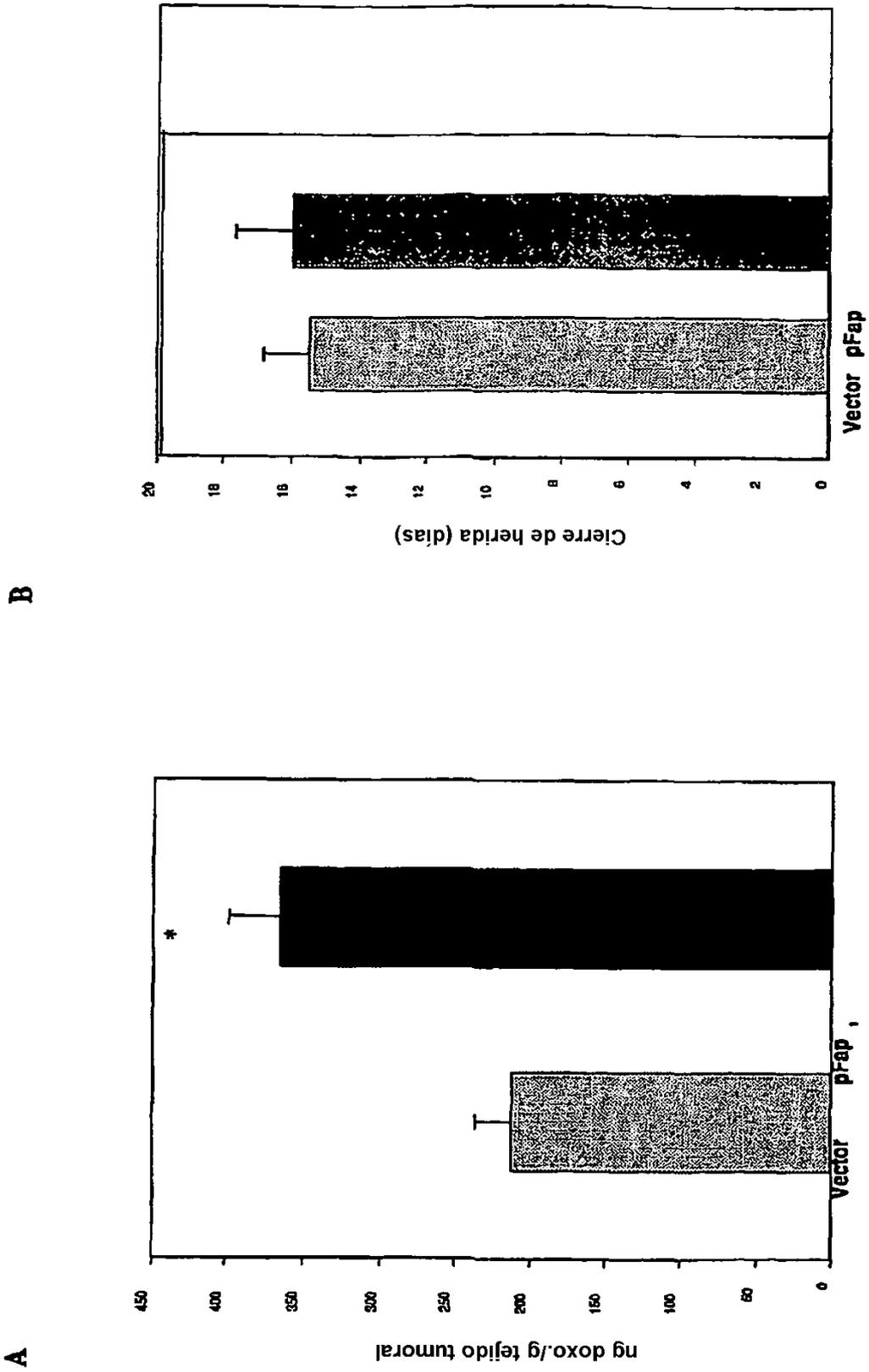
Fig. 3



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

```

1 ctgaagacag aattagctaa ctttcaaaaa catctggaaa aatgaagact tgggtaaaaa
61 tgcgattttgg agttgccacc tctgctgtgc ttgccttatt ggtgatgtgc attgtcttac
121 gcccttcaag agttcataac tctgaagaaa atacaatgag agcactcaca ctgaaggata
181 ttttaaatgg aacattttct tataaaacat ttttccaaa ctggatttca ggacaagaat
241 atcttcatca atctgcagat aacaatatag tactttataa tattgaaaca ggacaatcat
301 ataccatttt gagtaataga accatgaaaa gtgtgaatgc ttcaaattac ggcttatcac
361 ctgatcggca atttgtatat ctagaaagtg attattcaaa gctttggaga tactcttaca
421 cagcaacata ttacatctat gaccttagca atggagaatt ttgaagagga aatgagcttc
481 ctcgtccaat tcagtattta tgctggctgc ctggtgggag taaattagca tatgtctatc
541 aaaacaatat ctatttgaaa caaagaccag gagatccacc ttttcaaata acatttaatg
601 gaagagaaaa taaaatattt aatggaatcc cagactgggt ttatgaagag gaaatgcttg
661 ctacaaaata tgctctctgg tggctccta atggaaaatt ttggacatag cgggaattta
721 atgatacggg tataccagtt attgcctatt cctattatgg cgatgaacaa tatcctagaa
781 caataaataat tccataccca aaggctggag ctaagaatcc cgttgttcgg atatttatta
841 tcgataccac ttaccctgcg tatgtaggct cccaggaagt gcctgttcca gcaatgatag
901 aactcaagtga ttattatttc agttggttac cgtgggttac tgatgaacga ctgtgcttc
961 agtggctaaa aagagtccag aatgtttcgg tcctgtctat atgtgacttc aggggaagact
1021 ggcagacatg ggattgtcca aagaccagg agcatataga agaaaagcaga actggatggg
1081 ctggtggatt ctttgtttca acaccagtt tcagctatga tgccatttcg tactacaaaa
1141 tatttagtga caaggatggc tacaacata ttcactatat caaagaaatg cctgaaatg
1201 ctattcaaat tacaagtggc aagtgggagg ccataaataat attcagagta acacaggatt
1261 cactgtttta ttctagcaat gaatgtgaag aataccctgg aagaagaaac atctaagaa
1321 ttagcattgg aagctatcct ccaagcaaga agtgtgttac ttgccatcta aggaaagaaa
1381 ggtgccaata ttacacagca agtttcagcg actacgcca gctatcga gaaatataaa
1441 acggcccagg catccccatt tccaccctc atgatggag cactgatcaa gaaatataaa
1501 tcctggaaga aaacaaggaa ttggaaaatg ctttgaaaaa tatccagctg cctaaagagg
1561 aaattaagaa acttgaagta gatgaaatta ctttatggtg caagatgatt ctctctctc
1621 aatttgacag atcaaagaag tatcccttgc taattcaagt gtatggtggt cctgacgctc
1681 agagtgtaaag gtctgtattt gctgttaatt ggatatctta tcttgcaagt aaggaaggga
1741 tggtcatttgc cttggtggat ggtcagggaa cagctttcca aggtgacaaa ctctctatg
1801 cagtgtatcg aaagctgggt gtttatgaag ttgaagacca gattacagct gtcagaaaat
1861 tcatagaaat gggtttcatt gatgaaaaaa gaatagccat atggggctgg tctatggag
1921 gatacgtttc atcactggcc cttgcatctg gaactggtct tttcaaatgt ggtatagcag
1981 tggctccagt ctccagctgg gaatattacg cgtctgtcta cacagagaga ttcatgggtc
2041 tcccaacaaa ggatgataat cttgagcact ataagaatc aactgtgatg gcaagagcag
2101 aatatttcag aaatgtagac tatcttctca tccacggaac agcagatgat aatgtgact
2161 ttcaaaactc agcacagatt gctaaagctc tggttaatgc acaagtggat ttccaggcaa
2221 tgtggtactc tgaccagaac cacggcttat cgggcctgtc cacgaaccac ttatacacc
2281 acatgaccca ctctctaaag cagtgtttct ctttgtcaga ctaaaaacga tgcagatgca
2341 agcctgtatc agaactctgaa aaccttatat aaaccctca gacagtttgc ttattttatt
2401 ttttatggtg taaaatgcta gtataaacia acaattaat gttgttctaa aggtgttaa
2461 aaaaaagatg aggactcaga agttcaagct aaatattgtt tacattttct ggtactctgt
2521 gaaagaagag aaaagggagt catgcatttt gctttggaca cagtgtttta tcacctgttc
2581 atttgaagaa aaataataaa gtcagaagtt caagtgcgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2641 aaaaaaaaa

```

(SEC ID n° 1) ADN DE FAP HUMANA

**FIG. 7**

MKTWVKIVFGVATSAVLALLVMCIVLRPSRVHNSEENTMRALTL  
KDILNGTFSYKTFPPNWISGQEYLHQSDNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVDNASN  
YGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVVRGNELPRPIQYLCWSPVGS  
KLAYVYQNNIYKQRPQDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEMLATKYALWWSPNG  
KFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVG  
PQEVVPAMIASSDYFWSLWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQWDCPK  
TQEHIEESRTGWAGGFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGKHIHYIKDTVENAIQITS  
GKWEAINIFRVTQDSLIFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQY  
YTASFSDYAKYYALVCYGGPIPISTLHDGRDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEI  
KKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEG  
MVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGS  
YGGYVSSLALASGTGLFKCGIAPVSSWEYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTV  
MARAEIFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLS  
TNHLYTHMTHFLKQCFSLS

(SEC ID n° 2) FAP HUMANA

**FIG. 8**

```

1 ccacgcgtcc gcacagatgc ggtgaccac gctgtgcagt gagaatcagc taacttgcaa
61 aaacatctgg aaaaatgaag acatggctga aaactgtctt tggagttacc accctggctg
121 cgcttgcttt agtggtgata tgcattgtct tacgtccctc aagagtttac aaacctgaag
181 gaaacacaaa gagagctctt acctggaagg atattttaa tggaacattc tcatataaaa
241 catatthttc caactggatt tcagaacaag aatatcttca tcaatctgag gatgataaca
301 tagtatttta taatatgaa acaagagaat catatatcat tttagtaat agcaccatga
361 aaagtgtgaa tgctacagat tatggtttgt cacctgatcg gcaatttgtg tatctagaaa
421 gtgattatc aaagctctgg cgatattcat acacagcgac atactacatc tacgacctc
481 agaatgggga atttgtaaga ggatacagagc tccctcgtcc aattcagtat ctatgctggt
541 cgcctgttgg gagtaaatga gcatatgtat atcaaaacaa ttttatattg aaacaaagac
601 caggagatcc accttttcaa ataacttata ctggaagaga aatagaata tttaatggaa
661 taccagactg gtttatgaa gaggaatgc ttgccacaaa atactgctc tgggtgctc
721 cagatggaaa atttttggca tatgtagaat ttaatgattc agatatacca attattgctc
781 attcttatta tggatgaga cagtatccta gaactataaa tattccatat ccaaaggctg
841 gggctaagaa tccggttgtt cgtgttttta ttggtgacac cacctaccct caccacgtgg
901 gcccaattga agtccagtt ccagaaatga tagcctcaag tgccttggc tggtaaaaac
961 tcacatgggt gtccagtga cgagtatgct tgcagtggct aaaaagagtg cagaatgtct
1021 cagtcctgtc tataatgtgat ttcagggaa actggcatgc atgggaaatgt ccaaagaacc
1081 aggagcatgt agaagaaagc agaacaggat gggctggtgg atctcttgtt tcgacaccag
1141 cttttagcca ggatgccact tcttactaca aaatatttag cgactatfat tttacaaac
1201 atattcacta catcaaagac actgtggaaa atgctattca aattacaagt ggcaagtggg
1261 aggccatata tataatccgc gtaacacagg attcactggt ttattctagc aatgaatttg
1321 aaggttacc tggaagaaga aacatctaca gaattagcat tggaaactct cctccgagca
1381 agaagtgtgt tacttgccat ctaaggaaag aaaggtgcca atattacaca gcaagtttca
1441 gctacaaagc caagtactat gcaactcgtc gctatggccc tggcctcccc atttccacc
1501 tccatgatgg ccgcacagac caagaaatac aagtattaga agaaaacaaa gaactggaaa
1561 attctctgag aaatatccag ctgcctaaag tggagattaa gaagctcaa gacgggggac
1621 tgactttctg gtacaagatg attctgcctc ctcagtttga cagatcaaag aagtaccctt
1681 tgctaattca agtgtatggt ggtccttgta gccagagtgt taagtctgtg tttgctgta
1741 attggataac ttatctcgca agtaaggagg ggatagtcat tgcctcggta gatggtcggg
1801 gcaactgctt ccaaggtgac aaattcctgc atgcccgtga tcgaaaactg ggtgtatatg
1861 aagttgagga ccagctcaca gctgtcagaa aattcataga aatgggtttc attgatgaag
1921 aaagaatagc catatggggc tggctctacg gaggttatgt ttcatccctg gcccttgcac
1981 ctggaactgg tcttttcaaa tgtggcatag cagtggctcc agtctccagc tgggaaatatt
2041 acgcatctat ctactcagag agattcatgg gcctcccaac aaaggacgac aatctcgaac
2101 actataaaaa ttcaactgtg atggcaagag cagaatattt cagaaaatgt gactatcttc
2161 tcatccacgg aacagcagat gataatgtgc actttcagaa ctcagcaagc attgctaaag
2221 ctttggttaa tgcacaagtg gatttccagg cgatgtggtg ctctgaccag aacctggta
2281 tattatctgg gcgctcccag aatcatttat ataccacat gacgcacttc ctaagcaat
2341 gcttttcttt atcagactga accaatgcaa gtactagcgt gtaggacagt ctgaaggctt
2401 cacatggacg acttggacca tgaatattgt aaaagccgct aaaaatttag gagggctcag
2461 gaggttaggc tcggtattgt ttacatttcc ctatgctctg tgaagaaga gaaaagggga
2521 gccacacatc ttgctttgga cacaatgttt tatcacctgt tcattgcccg gttagcggaaa
2581 taaagtccga tgcctcaggt aaaaaaaaa aaaaa

```

(SEC ID n° 3) ADN DE FAP MURINA

**FIG. 9**

MKTWLKTVFGVTTLAALALVVICIVLRPSRVYKPEGNTKRALTL  
KDILNGTFSYKTYFPNWISEQEYLNHSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATD  
YGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVVRGYELPRPIQYLCWSPVGS  
KLAYVYQNNIYLKQRPDPPFQITYTGRENRIFNIGIPDWVYEEMLATKYALWWS PDG  
KFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRRTINIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVG  
PMEVPVPEMIASSDYYSWLTWVSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHAWCEPK  
NQEHVEESRTGWAGGFFVSTPAFSQDATSYKIFSDKDGKHIHYIKDTVENAIQITS  
GKWEAIYIFRVTQDSLIFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCHLRKERCQY  
YTASFSYKAKYYALVCYGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEI  
KKLKDGGTLFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEG  
IVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWS  
YGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASISYERFMGLPTKDDNLEHYKNSTV  
MARAEIFRNVDYLLIHGTADDNVHFNQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGILSGR  
SQNHLYTHMTHFLKQCFLSD

(SEC ID n° 4) FAP MURINA

## FIG. 10

```

1  atcaactctct ttaatcaacta ctcacagtaa cctcaactcc tgccacaatg tacaggatgc
61  aactcctgtc ttgcattgca ctaagtcttg cacttgtcac aaacagtgca cctacttcaa
121 gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta cagatgattt
181 tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca tttaaagttt
241 acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa gaactcaaac
301 ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga cccagggact
361 taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca acattcatgt
421 gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg attacctttt
481 gtcaaagcat catctcaaca ctgacttgat aattaagtgc ttcccactta aaacgtatca
541 ggccttctat ttattttaa atttaaattt tatatttatt gttgaatgta tggtttgcta
601 cctattgtaa ctattattct taatcttaaa actataaata tggatctttt atgattcttt
661 ttgtaagccc taggggetct aaaatggctt cacttattta tcccaaaata tttattatta
721 tgttgaatgt taaatatagt atctatgtag attggttagt aaaactattt aataaatttg
781 ataaatataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

(SEC ID n° 5) ADN de IL-2 humana

**FIG. 11**

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI  
LNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP  
RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

(SEC ID n° 6) IL-2 humana

**FIG. 12**

```

1 atcacccttg ctaatcactc ctcacagtga cctcaagtcc tgcaggcatg tacagcatgc
61 agctcgcac cctgtgtcaca ttgacacttg tgctccttgt caacagcgc caacagcgc
121 gctccacttc aagctctaca gcggaagcac agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc
181 agcagcacct ggagcagctg ttgatggacc tacaggagct cctgagcagg atggagaatt
241 acaggaacct gaaactccc aggatgctca ccttcaaatt ttacttgccc aagcaggcca
301 cagaattgaa agatcttcag tgcctagaag atgaacttgg acctctgccc catgttctgg
361 atttgactca aagcaaaagc tttcaattgg aagatgctga gaatttcac agcaatatca
421 gagtaactgt tgtaaaacta aagggctctg acaacacatt tgagtgccaa ttcgatgatg
481 agtcagcaac tgtggtggac tttctgagga gatggatage cttctgtcaa agcatcatct
541 caacaagccc tcaataacta tgtacctcct gcttacaaca cataaggctc tctatttatt
601 taaatattta actttaattt atttttggat gtattgttta ctatcttttg taactactag
661 tcttcagatg ataaatatgg atctttaaag attctttttg taagcccaa gggctcaaaa
721 atgttttaaa ctatttatct gaaattattt attarattga attgttaaat atcatgtgta
781 ggtagactca ttaataaaaag tatttagatg attcaaatat aaataagctc agatgtctgt
841 catttttagg acagcaca aaa gtaagcgcta aaataacttc tcagttatcc ctgtgaactc
901 tatgttaatc agtgttttca agaaataaaag ctctcctct

```

(SEC ID n° 7) ADN de IL-2 murina

**FIG. 13**

MYSMQLASCVTLLTLVLLVNSAPTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQ  
QQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRLTFKFYLPKQATELKDLQCLEDELGPLRH  
VLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSNDTFECQFDDESATVVDFLRRWIAFC

(SEC ID n° 8) IL-2 murina

**FIG. 14**

```

1  ottgcagctg  cccacctcac  cctcagctct  ggcctcttac  tcaccctcta  ccacagacat
61  ggctcagtca  ctggctctga  gcctcettat  cctggttctg  gcctttggca  tceccaggac
121 ccaaggcagt  gatggagggg  ctcaggactg  ttgcctcaag  tacagccaaa  ggaagattcc
181 cgccaagggt  gtccgcagct  accggaagca  ggaaccaagc  ttaggctgct  ccatcccagc
241 tatectgttc  ttgccccgca  agcgctctca  ggcagagcta  tgtgcagacc  caaaggagct
301 ctgggtgcag  cagctgatgc  agcatctgga  caagacacca  tccccacaga  aaccagccca
361 gggctgcagg  aaggacaggg  gggcctccaa  gactggcaag  aaaggaaagg  gctccaaagg
421 ctgcaagagg  actgagcggg  cacagacccc  taaagggcc  tagcccagtg  agcagcctgg
481 agccctggag  accccaccag  cctcaccaac  gettgaagcc  tgaaccaag  atgcaagaag
541 gaggetatgc  tcaggggccc  tggagcagcc  accccatgct  ggcettgcca  cactctttct
601 cctgctttaa  ccaccccatc  tgcattccca  gctctaccct  gcatggctga  gctgcccaca
661 gcaggccagg  tccagagaga  ccgaggaggg  agagtctccc  agggagcatg  agaggaggca
721 gcaggactgt  ccccttgaag  gagaatcctc  aggaccctgg  acctgatacg  gctccccagt
781 acacccccacc  tcttcottgt  aaatatgatt  tatacctaac  tgaataaaaa  gctgtttctgt
841 cttcccacc  gc

```

(SEC ID n° 9) ADN de CCL21 humano

**FIG. 15**

MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGS DGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQ  
EPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG  
CRKDRGASKTGKKGKSGCKRTERSQTPKGP

(SEC ID nº 10) CCL21 humano

**FIG. 16**

```

1 gaattcggcc aaagaggcct acggccaaag agggctaaac ttgCGGctgt ccatctcacc
61 tacagctctg gtctcatcct caactcaacc acaatcatgg ctcagatgat gactctgagc
121 ctcccttagcc tggtcctggc tctctgcac ccctggaccc aaggcagtga tggagggggg
181 caggactgct gccttaagta cagccagaag aaaattccct acagtattgt ccgaggctat
241 aggaagcaag aaccaagttt aggctgtccc atcccggcaa tcctgttctc accccggaag
301 cactctaagc ctgagctatg tgcaaacctt gaggaaggct gggTgcagaa cctgatgcgc
361 cgcctggacc agcctccagc cccagggaaa caaagccccg gctgcaggaa gaaccgggga
421 acctctaagt ctggaaagaa aggaaagggc tccaagggct gcaagagaac tgaacagaca
481 cagccctcaa gaggatagcc cagtagcccc cctggagccc aggagatccc ccacgaactt
541 caagctgggt ggttcacggt ccaactcaca ggcaaagagg gagctagaaa acagactcag
601 gagccgctag tcgag

```

(SEC ID n° 11) ADN de CCL21b murino

## FIG. 17

MAQMMTLLSLLSLVLALCIPWTQGS DGGQDCCLKYSQKKIPYSIVRGYRKQ  
EPSLGCPIPAILFSPRKHSKPELCANPEEGWVQNLMRRLDQPPAPGKQSPG  
CRKNRGTSKSGKKGKSGKCKRTEQTQPSRG

(SEC ID n° 12) CCL21b murino

**FIG. 18**

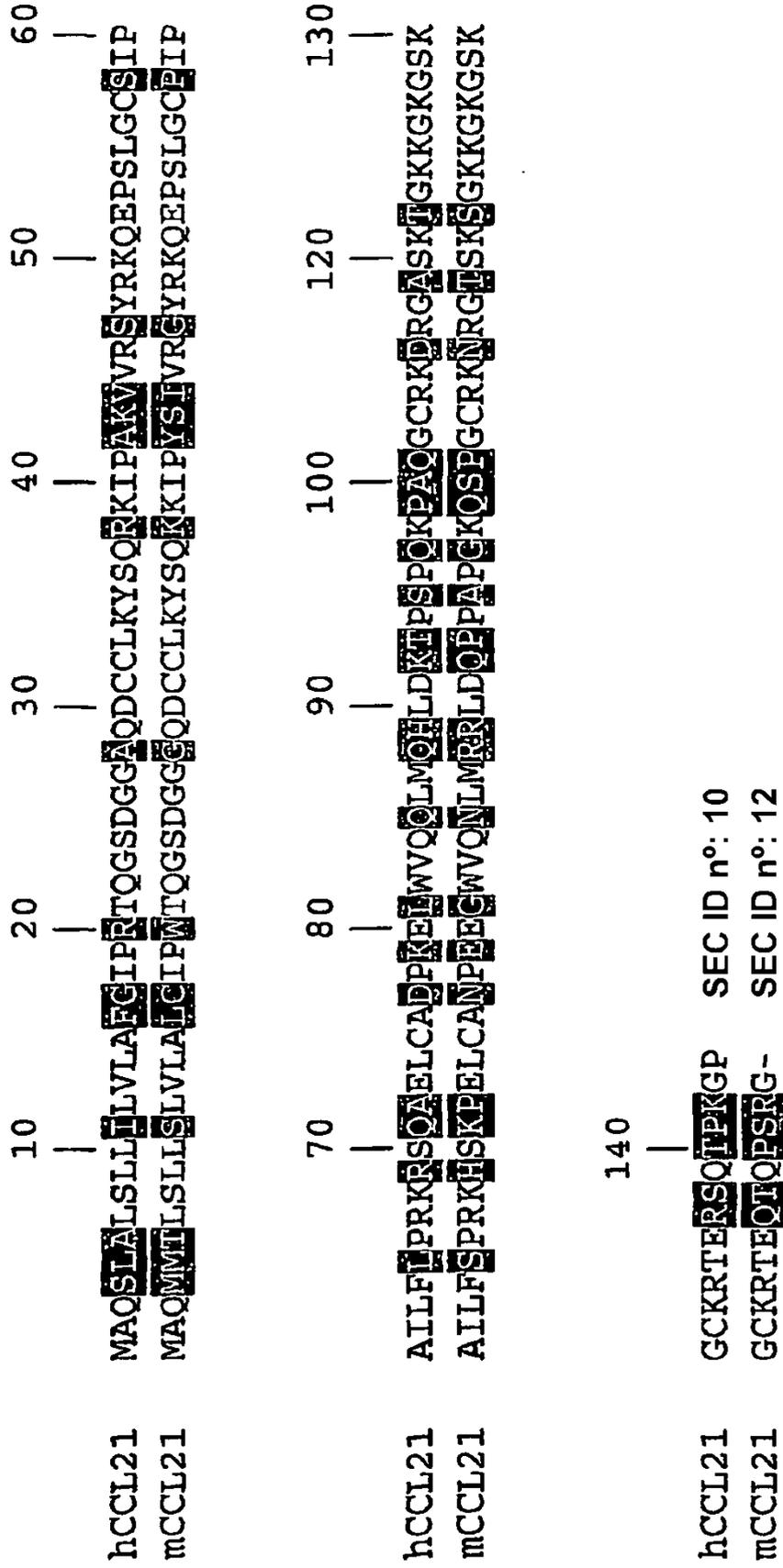


FIG. 19

```

1  atcccagccc acgcacagac ccccaacttg cagctgccc cctcaccctc agctctggcc
61  tcttactcac cctctaccac agacatggct cagtcactgg ctctgagcct ccttatcctg
121 gttctggect ttggcatccc caggacccaa ggcagtgatg gaggggctca ggactgttgc
181 ctcaagtaca gccaaaggaa gattcccgcc aaggttgctc gcagctaccg gaagcaggaa
241 ccaagcttag gctgctccat ccagctatc ctggtcttgc cccgcaagcg ctctcaggca
301 gagctatgtg cagacccaaa ggagctctgg gtgcagcagc tgatgcagca tctggacaag
361 acaccatccc cacagaaacc agcccagggc tgcaggaagg acaggggggc ctccaagact
421 ggcaagaaag gaaagggtc caaaggctgc aagaggactg agcggtcaca gacccctaaa
481 gggccatagc ccagtgaaca gctggagcc ctggagacc caccagcctc accagcgtt
541 gaagcctgaa cccaagatgc aagaaggagg ctatgctcag gggccctgga gcagccacc
601 catgctggcc ttgccacact ctttctcctg ctttaaccac cccatctgca ttcccagctc
661 taccctgcat ggetgagctg cccacagcag gccagggtcca gagagaccga ggagggagag
721 tctcccagg agcatgagag gaggcagcag gactgtccc ttgaaggaga atcatcagga
781 ccctggacct gatacygctc ccagtacac cccacctct ccttgtaaat atgatttata
841 cctaactgaa taaaaagctg ttctgtcttc ccacccaa

```

(SEC ID n° 13) ADN de CCL21a murino

**FIG. 20**

MAQSLALSLLILVLAFGI PRTQGS DGAQDCCLKYSQRKI PAKVVR SYRKQ  
E PSLGCSI PAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPAQG  
CRKDRGASKTGKKGKSGCKRTERSQTPKGP

(SEC ID n° 14) CCL21a murino

**FIG. 21**

```

1 cttctctgcc agaagataacc atttcaactt taacacagca tgategaaac atacaaccaa
61 acttctcccc gatctgcggc cactggactg cccatcagca tgaaaattht tatgtattta
121 cttactgtht ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat
181 agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg aagattttgt attcatgaaa
241 acgatacaga gatgcaacac aggagaaaaga tccttatcct tactgaactg tgaggagatt
301 aaaagccagt ttgaaaggctt tgtgaaaggat ataatgthaa acaaaaggga gacgaagaaa
361 gaaaacagct ttgaaatgca aaaagggtgat cagaatcctc aaattgcggc acatgtcata
421 agtgaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc
481 atgagcaaca acttggtaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgthaa aagacaagga
541 ctctattata tctatgcccc agtcaccttc tgtccaatc gggaaagctc gagtcaagct
601 ccattttatag ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tggagagaat cttactcaga
661 gctgcaataa cccacagttc cgccaaacct tgcgggcaac aatccattca cttgggagga
721 gtatttgaat tgcaaccagg tgcctcggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg
781 agccatggca ctggcttcac gtcctttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcacctgc
841 aggctgtggt ggagctgacg ctgggagtet tcataataca gcacagcggg taagcccacc
901 ccctgttaac tgcctattta taaccctagg atcctcctta tggagaacta tttattatac
961 actccaagge atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaaacgggc
1021 cctgctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag
1081 agtcctatga aaagacaagg ccattatgca caggttgaat tctgagthaa cagcagataa
1141 cttgccaaagt tcagttttgt ttctttgctg gcagtgctct tccatggata atgcatttga
1201 tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcaattca gttatggttg
1261 actctggggt cctatggcct tgttggaggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagttg
1321 agaaccgaaa ccccccccc cccccccgc accctctcgg acagtattc attctcttc
1381 aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaatc
1441 tctctttctc aatctctctg tttccctttg tcagttctct cctccccca gtctctctc
1501 tcaatcccc tttctaacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac
1561 acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccaccc
1621 tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg
1681 cccactctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc
1741 tccattgtht ccagagtga cttgtaatta tcttgttatt tattttttga ataataaaga
1801 cctcttaaca ttaaaa

```

//

(SEC ID n° 15) ADN de CD40L humano

**FIG. 22**

MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRRL DKIEDERNLH  
EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP  
QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN  
REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN  
VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L

(SEC ID n° 16) CD40L humano

**FIG. 23**