

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 394 129**

(51) Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008 E 08842129 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **07.07.2010 EP 2203187**

(54) Título: **Construcciones que contienen múltiples casetes de expresión para terapia de cáncer**

(30) Prioridad:

**25.10.2007 US 982442 P**

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

**22.01.2013**

(73) Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY  
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM,  
LTD. (100.0%)  
HI-TECH PARK EDMOND J. SAFRA CAMPUS  
GIVAT RAM P.O.B 39135  
91390 JERUSALEM, IL**

(72) Inventor/es:

**HOCHBERG, AVRAHAM y  
AMIT,DORON**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 394 129 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

Construcciones que contienen múltiples casetes de expresión para terapia de cáncer

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del tratamiento de cáncer, específicamente a nuevas construcciones de

5 ácido nucleico que son particularmente útiles para tratar tumores que expresan H19 y/o IGF-II.

**Antecedentes de la invención**

La neoplasia es un proceso que se produce en cáncer, por el que los mecanismos de control normales que regulan el crecimiento y la diferenciación celulares se alteran, dando como resultado crecimiento progresivo. Esta alteración de los mecanismos de control permite que un tumor se amplíe y ocupe espacios en áreas vitales del cuerpo. Si el

10 tumor invade el tejido circundante y se transporta a sitios distantes (metástasis) probablemente dé como resultado la muerte del individuo.

El objetivo deseado de la terapia de cáncer es eliminar preferentemente células cancerosas, sin tener un efecto deletéreo en células normales. Se han usado varios procedimientos en un intento de alcanzar este objetivo, incluyendo cirugía, radioterapia y quimioterapia.

15 Los tratamientos locales, tales como radioterapia y cirugía, ofrecen un medio para reducir la masa tumoral en regiones del cuerpo que sean accesibles a través de técnicas quirúrgicas o altas dosis de radioterapia. Sin embargo, se necesitan terapias locales más eficaces con menos efectos secundarios. Además, estos tratamientos no son aplicables a la destrucción de células tumorales ampliamente diseminadas o en circulación que se encuentran con el tiempo en la mayoría de los pacientes con cáncer. Para combatir la propagación de células tumorales, se usan terapias sistémicas.

20 Un tratamiento sistémico tal es la quimioterapia. La quimioterapia es el principal tratamiento para cánceres malignos diseminados. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos están limitados en su eficacia para tratar muchos tipos de cáncer, incluyendo muchos tumores sólidos habituales. Esta limitación se debe en parte a la resistencia a fármacos intrínseca o adquirida de muchas células tumorales. Otro inconveniente del uso de agentes 25 quimioterapéuticos son sus graves efectos secundarios. Estos incluyen supresión de médula ósea, náuseas, vómitos, pérdida de cabello y úlceras en la boca. Claramente, se necesitan nuevos enfoques para potenciar la eficacia con la que un agente quimioterapéutico puede destruir células tumorales malignas, evitando a la vez la toxicidad sistémica.

**H19 en diagnóstico y terapia**

30 El gen H19 es uno de varios genes que se sabe que están impresos en seres humanos (Hurst y col., 1996, *Nature Genetics* 12: 234 237). Al comienzo de la embriogénesis, H19 se expresa a partir de ambos alelos cromosómicos (DeGroot y col., 1994, *Trophoblast* 8: 285 302). Poco después, se produce el silenciamiento del alelo paterno, y solo se transcribe el alelo heredado materno.

35 H19 se expresa abundantemente durante la embriogénesis y se identificó en primer lugar como un gen que estaba regulado de forma coordinada con alfa-fetoproteína en el hígado por el locus de acción en trans raf (Pachnis y col., 1984, "Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes", *Proc Natl Acad Sci.* 81: 5523 5527). Adicionalmente, se ha clonado H19 de forma independiente por varios grupos usando exploraciones dirigidas a aislar genes expresados durante la diferenciación tisular. Por ejemplo, se identificó el homólogo de ratón de H19 en una exploración con respecto a genes que estaban activos durante la diferenciación temprana de células 40 C3H10T1/2 (Davis y col., 1987, "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts", *Cell* 51:987 1000). De forma similar, se mostró que H19 murino se expresaba durante la diferenciación de células madre y en el momento de la implantación (Poirier y col., 1991, "The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo", *Development* 113: 1105 1114). 45 También se descubrió transcripción del gen H19 humano en la diferenciación de citotrofoblastos de placenta humana (Rachmilewitz y col., 1992, *Molec. Reprod. Dev.* 32: 196 202).

Aunque se produce transcripción de ARN de H19 en muchos tejidos embrionarios diferentes durante la vida fetal y el desarrollo placentario, la expresión de H19 se regula negativamente después del nacimiento, aunque se han indicado niveles bajos de transcripción de H19, por ejemplo, en músculo e hígado adulto murino (Brunkow y Tilghman, 1991, "Ectopic expression of the H 19 gene in mice causes prenatal lethality", *Genes Dev.* 5: 1092 1101).

50 La transcripción de H19 puede reactivarse después del nacimiento en células cancerosas como se ha demostrado en tumores derivados de tejidos que expresan H19 antes del nacimiento (Ariel y col., 1997, "The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA", *Mol Pathol.* 50: 34 44). Adicionalmente, ARN H19 se expresa después del nacimiento en algunos tumores, en particular astrocitoma y ganglioneuroblastoma, que derivan de tejidos neurales 55 que no se sabe que expresen H19 (Ariel y col. mencionado anteriormente). Puesto que el ARN de H19 se expresa en muchos tipos de tumores y cánceres, Ariel y col. especularon que el ARN de H19 era un ARN oncofetal, y

propusieron investigar H19 como un marcador tumoral para neoplasia humana.

H19 se expresa de forma significativa en el 84 % de los carcinomas de vejiga humanos, reduciéndose la expresión con la diferenciación de pérdida tumoral. Independientemente del grado tumoral, el nivel de expresión de H19 se correlacionaba de forma significativa con reaparición de tumor temprana (Ayesh, B., y col, Mol Ther, 2003. 7(4): p. 535-41).

La comparación de los patrones de expresión génica en dos poblaciones celulares homogéneas que difieren solamente en la presencia o ausencia de ARN de H19 ha identificado una multitud de efectores corriente abajo de ARN de H19. Entre estos están los grupos de genes que se ha indicado previamente que desempeñan papeles cruciales en algunos aspectos del proceso tumorogénico. La presencia de ARN de H19 puede potenciar la 10 capacidad invasiva, migratoria y angiogénica de la célula regulando positivamente genes que actúen en esas rutas, y de este modo podría contribuir al menos a las etapas iniciales de la cascada metastásica. Estudios adicionales destacan el papel potencial de H19 en la promoción de la progresión de cáncer y metástasis tumoral siendo un gen sensible al factor de crecimiento/factor de dispersión de Hepatocitos (HGF/SF).

La expresión específica del gen de H19 en células cancerosas ha impulsado su uso en aplicaciones clínicas para 15 diagnosticar cáncer. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.955.273 enseña el uso del gen H19 como un marcador específico tumoral. El documento PCT Pub. Nº WO 2004/024957 desvela el uso de H19 para la detección, en un paciente sospechoso de tener cáncer, de la presencia de células cancerosas residuales o micrometástasis que se originan de tumores sólidos.

#### IGF-II

20 El factor de crecimiento de tipo insulina II (IGF-II) se expresa la mayoría de los carcinomas de vejiga tales como carcinomas de células transicionales (TCC; Ariel, I., y col., The imprinted H19 gene is a marker of early recurrence in human bladder carcinoma. Mol Pathol, 2000. 53(6): p. 320-3). Las actividades biológicas están mediadas por la unión con los receptores de superficie celular, receptor de IGF-I (IGF-1R), receptor de IGF-II (IGF-2R) y receptor de insulina (IR). Los receptores de IGF están presentes en casi todos los tejidos de animales fetales y adultos. IGF-2R 25 se une a IGF-II con la mayor afinidad, mientras que el IGF-1R e IR poseen afinidad alta, pero menor por IGF-II que por sus ligandos respectivos. IGF-II es un potente factor de crecimiento embrionario y tumoral que señala mediante el IGF1R a través de las rutas de señalización proteína quinasa activada por mitógeno/Ras, fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt/FOXO, y diana de rapamicina de mamífero/S6K (mTOR) para modificar la proliferación celular, supervivencia celular, expresión génica y crecimiento celular.

30 IGF-II es otro gen impreso cuya expresión depende de su origen parental. Sin embargo a diferencia de H19, IGF-II está impreso por vía materna tanto en ratones como en seres humanos, y por lo tanto se expresa a partir del alelo heredado por vía paterna (Rainier y col., 1993, "Relaxation of imprinted genes in human cancer", Nature 362: 747 749). El gen IGF-II humano muestra un patrón transcripcional complejo. Hay cuatro promotores de IGF-II que se 35 activan de una manera específica de tejido y específica de desarrollo. Solamente tres de los promotores de IGF-II (es decir, P2, P3 y P4) están impresos y activos durante el desarrollo fetal y en tejidos cancerosos. El promotor P3 del gen IGF-II se ha implicado en la progresión de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (Seo y col., 1998, "Different protein-binding patterns in the P3 promoter region of the human insulin-like growth factor II gene in the human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma tissues", J Korean Med Sci. 13: 171 178).

40 El cuarto promotor de IGF-II (es decir, P1) no está impreso y se activa en el hígado y los plexos coroideos del adulto (Véase Holthuizen y col., 1993, "Transcriptional regulation of the major promoters of the human IGF-II gene", Mol Reprod Dev. 35: 391 393).

45 La pérdida de impresión de IGF-II se ha implicado en el tumor de Wilm (Ogawa y col., 1993, "Relaxation of insulinlike growth factor II gene imprinting implicated in Wilm's tumour", Nature 362: 749 751). Esta observación condujo a muchos investigadores a especular que la pérdida de impresión y expresión bialélica de genes impresos puede estar implicada en trastornos del crecimiento y el desarrollo de cáncer (Rainier y col., 1993, Nature 362: 747 749; Glassman y col., 1996, "Relaxation of imprinting in carcinogenesis", Cancer Genet Cytogenet. 89: 69 73).

50 Se produce modificación epigenética y mutaciones del sistema de señalización de IGF-II en cánceres tales como tumores colorrectales humanos (Hassan AB, Macaulay VM. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. Ann Oncol 2002; 13: 349-56). El aporte de IGF-II con frecuencia se regula positivamente, y el análisis en serie de la expresión génica ha mostrado que IGF-II es un gen habitualmente sobreexpresado en varias líneas celulares de cáncer y tumores, por ejemplo carcinoma de vejiga humana y cáncer colorrectal (Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, y col. Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science 1997; 276: 1268-72).

55 El documento WO 99/18195 y la Patente de Estados Unidos Nº 7.041.654 enseña la expresión específica de secuencias heterólogas, particularmente genes que codifican productos citotóxicos (por ejemplo, toxina Difláctica), en células tumorales bajo el control de un promotor específico de cáncer (por ejemplo, un promotor y potenciador de H19, promotor P3 de IGF-II, promotor P4 de IGF-II o promotor de IGF-1).

El documento WO 04/031359 enseña un procedimiento para regular la expresión de genes que controlan la angiogénesis en células que están implicadas en neovascularización, que comprende administrar a las células una cantidad eficaz de un modulador de H19.

5 El documento WO 2007/034487 desvela una construcción de ácido nucleico que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica TNF alfa; (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una toxina Diftérica; y (iii) al menos una secuencia de ácido nucleico adicional que comprende un promotor específico de cáncer (por ejemplo promotores de H19, de IGF-1, P3 de IGF-II o P4 de IGF-II); estando las secuencias que codifican TNF alfa y toxina Diftérica bajo un control de expresión del promotor específico de cáncer. También se proporcionan sistemas de construcción y procedimientos y usos de los mismos.

10 El documento WO 2007/007317 desvela oligonucleótidos aislados capaces de regular negativamente un nivel de ARNm de H19 en células de cáncer, artículos de fabricación que comprenden agentes capaces de regular negativamente el ARNm de H19 en combinación con un tratamiento antineoplásico adicional así como procedimientos para tratar cáncer administrando los mismos. El documento WO 2007/007317 desvela que los fármacos antineoplásicos pueden coadministrarse con los oligonucleótidos reivindicados.

15 El documento WO 2008/087641 desvela composiciones y procedimientos para tratar artritis reumatoide, utilizando agentes de ácido nucleico silenciadores de H19 tales como ARN inhibidor.

El documento WO 2008/087642 desvela composiciones y procedimientos para tratamiento de cáncer y otras afecciones que están asociadas con expresión elevada del gen H19, utilizando agentes de ácido nucleico silenciadores de H19 tales como ARN inhibidor.

20 El documento WO 2008/099396 desvela composiciones y procedimientos para tratar reestenosis, utilizando agentes de ácido nucleico silenciadores de H19 tales como ARN inhibidor.

Ohana P. y col.; Journal of Gene Medicine; 7 (2005); pp. 366-374 desvela secuencias reguladoras del H19 y P3 y P4 de IGF-II para dirigir la expresión selectiva de tumores de un fragmento de toxina diftérica.

25 Ohana P. y col.; International Journal of Cancer; 98 (2002), pp. 645-650 se refiere a un enfoque de terapia génica de tumores. Se proporcionan construcciones que comprenden bajo el control regulador del promotor H19 el gen para el fragmento A de la toxina diftérica o timidina quinasa del virus del herpes.

Ninguna de las referencias anteriores desvela o sugiere una construcción única que contenga múltiples fases abiertas de lectura que expresen toxina diftérica, en las que la toxina diftérica se exprese a partir de una pluralidad de promotores.

30 El uso de un promotor único (por ejemplo, un promotor de H19 o un promotor P3 o P4 de IGF-II) solo para expresión de un gen citotóxico o citostático a partir de una construcción terapéutica antineoplásica presenta varios problemas no resueltos. En primer lugar no todos los tumores de un tipo dado de cáncer (por ejemplo carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga superficial, etc.) son positivos para expresión a través del promotor de H19 o el promotor P3 o P4 de IGF-II. Por lo tanto, dicha terapia fracasará en una considerable proporción de pacientes, incluso sin tener en cuenta la mutagénesis tumoral. La determinación de sensibilidad a tales construcciones implicaría la etapa costosa y difícil de genotipar tumores individuales.

35 Se sabe que los tumores muestran inestabilidad y heterogenicidad genómica significativa. Por lo tanto, incluso individuos con un tumor que exprese H19, por ejemplo, probablemente contengan un número considerable de células cancerosas que han regulado negativamente o suprimido la expresión de H19 mediante mutación. Por lo tanto, la expresión del gen citotóxico o citostático a partir de un promotor único en tales pacientes puede dar como resultado regresión tumoral temporal y parcial que rápidamente se invertirá cuando las células que contienen estas mutaciones sobrevivan y se multipliquen rápidamente.

40 Sigue existiendo la necesidad médica no satisfecha de desarrollar modalidades terapéuticas seguras y eficaces adicionales útiles en terapia de cáncer.

45 La inclusión o la descripción de referencias de bibliografía en la presente sección o cualquier otra parte de la presente solicitud no constituyen una admisión de que las referencias se consideran técnica anterior de la presente invención.

### **Resumen de la invención**

50 La presente invención se refiere al campo de tratamiento de cáncer, y en particular a nuevas construcciones de ácido nucleico y vectores de expresión que son particularmente útiles para tratar tumores que expresen H19 y/o Factor de Crecimiento de Tipo Insulina II (IGF-II).

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico que comprende:

(a) un primer marco abierto de lectura que codifica un producto génico citotóxico o citostático, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una primera secuencia reguladora de la transcripción; y

5 (b) un segundo marco abierto de lectura que codifica el producto génico citotóxico o citostático, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una segunda secuencia reguladora de la transcripción;

en la que la primera secuencia reguladora de la transcripción y la segunda secuencia reguladora de la transcripción son diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en: i) secuencias reguladoras de la transcripción específicas de H19 y ii) secuencias reguladoras de la transcripción de IGF-II seleccionadas de P3 de IGF-II y P4 de IGF-II.

10 Por ejemplo, las secuencias reguladoras de la transcripción pueden ser:

i) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II;

15 ii) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; o

iii) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II;

20 Opcionalmente, dicha construcción puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica el producto génico citotóxico o citostático, estando el tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una tercera secuencia reguladora de la transcripción seleccionada de secuencias reguladoras de la transcripción específicas de H19, secuencias reguladoras de la transcripción P3 de IGF-II y secuencias reguladoras de la transcripción P4 de IGF-II.

25 Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico que comprende: a) un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y b) un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una primera secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II seleccionada de las secuencias P4 de IGF-II y P3 de IGF-II.

30 Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una segunda secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II seleccionada de secuencias P4 de IGF-II y P3 de IGF-II, en la que la primera secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II y la segunda secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II son diferentes. Por ejemplo, el segundo marco abierto de lectura puede estar unido operativamente con una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II y el tercer marco abierto de lectura puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II, o como alternativa el segundo marco abierto de lectura puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II y el tercero marco abierto de lectura puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

35 40 Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico, que comprende: a) un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; y b) un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

45 Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19.

50 En las construcciones, la toxina diftérica, puede ser, por ejemplo, una cadena A de toxina diftérica (toxina diftérica A, DTA), por ejemplo una toxina que tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 7, como se detalla posteriormente en el presente documento.

La secuencia reguladora de la transcripción puede ser una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor o potenciador) que induzca o potencie la expresión de forma selectiva (o, preferentemente) en células cancerosas, como se detalla en el presente documento.

La expresión “secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II” puede referirse a una secuencia que regula la

transcripción de una manera específica (o diferencial) y se encuentra en asociación con un gen de IGF-II en un cromosoma, por ejemplo un cromosoma humano. "Secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II" y "secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II" pueden referirse a un promotor P3 o P4 (respectivamente). Las expresiones también pueden referirse a una secuencia reguladora de la transcripción derivada de un promotor P3 o P4 (respectivamente). Las expresiones pueden referirse adicionalmente a una de las secuencias reguladoras de la transcripción específicas de P3 o P4 (respectivamente) desveladas en el presente documento.

Por ejemplo, la secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II puede ser un promotor que comprenda una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID Nº: 9, como se detalla posteriormente en el presente documento. Los ejemplos de promotores P3 de IGF-II incluyen promotores que comprenden una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 17, como se detalla posteriormente en el presente documento.

"Secuencia reguladora de la transcripción específica de H19" puede referirse a una secuencia que regula la transcripción de una manera específica (o diferencial) y se encuentra en asociación con un gen H19 en un cromosoma, por ejemplo un cromosoma humano. La expresión puede referirse también a un promotor específico de H19. La expresión puede referirse adicionalmente a una secuencia reguladora de la transcripción derivada de un promotor de H19. La expresión puede referirse a una de las secuencias reguladoras de la transcripción específicas de H19 desveladas en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 puede ser un promotor que comprenda una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de SEC ID Nº: 1-2, como se detalla posteriormente en el presente documento.

20 Tales construcciones proporcionan un tratamiento particularmente eficaz y seguro dirigido específicamente a tumores malignos que expresan H19 y/o que expresan IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4. Provechosamente, se desvela ahora que las construcciones inducen respuestas en un mayor número de células y/o mayor proporción de pacientes, proporcionando de este modo un tratamiento de cáncer mejorado en comparación con la terapia conocida hasta ahora.

25 Dicha construcción de ácido nucleico puede ser un plásmido. Puede proporcionarse un vector de expresión eucariota que comprenda una construcción de ácido nucleico.

Puede usarse una construcción de ácido nucleico (por ejemplo una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de ácido nucleico) para reducir o aliviar un síntoma asociado con un trastorno neoplásico en un sujeto humano que lo necesite. La construcción de ácido nucleico puede usarse en el tratamiento de un tumor, o inhibición 30 de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral en un sujeto humano que lo necesite.

Dicho sujeto puede estar aquejado de un tumor caracterizado por expresión de ARN de H19 en al menos una parte de las células del tumor, por ejemplo, en el que una célula de dicho tumor es capaz de expresar un transcripto dirigido por el promotor de H19, un transcripto dirigido por el promotor P4 de IGF-II y/o un transcripto dirigido por el promotor P3 de IGF-II.

35 Las construcciones también pueden estar en forma de un kit o un envase farmacéutico que contenga uno o más ciclos de tratamiento para una neoplasia que exprese H19 y/o que exprese IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4 en un sujeto que lo necesite. Por lo tanto, puede proporcionarse un kit que contenga i) una construcción de ácido nucleico de la invención; y ii) instrucciones para administrar dicha construcción de ácido nucleico a un sujeto que lo necesite (por ejemplo un sujeto aquejado de cáncer).

40 Las composiciones y los kits pueden ser útiles en el tratamiento de diversos tumores malignos asociados con expresión de H19 y/o expresión de IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4. El tumor puede ser un tumor sólido. El tumor puede ser un carcinoma. El tumor puede incluir carcinoma de vejiga, neoplasias de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular), adenocarcinoma de pulmón (cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas), carcinoma esofágico, ovárico, rhabdомiosarcoma, carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumores colorrectales, de útero y de células germinales testiculares, meduloblastoma, glioblastoma y tumores adenocorticales.

45 El tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en carcinoma de vejiga, carcinoma hepatocelular y carcinoma de colon. El tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de ovario y un carcinoma pancreático. El tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en un carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma ovárico, un carcinoma pancreático, un carcinoma de mama, un carcinoma de próstata, un carcinoma cervical, un carcinoma de colon y un carcinoma de pulmón. El sujeto puede estar aquejado de cáncer de vejiga superficial.

50 Tumores metastásicos a modo de ejemplo incluyen por ejemplo cáncer colorrectal que metastatiza al hígado y cáncer de mama metastásico. Las combinaciones pueden usarse para prevenir o inhibir la formación de metástasis hepáticas.

55 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción y dibujos.

**Breve descripción de los dibujos**

5 **Figura 1.** Una ilustración esquemática que representa la construcción del vector de expresión H19-DTA-P4-  
DTA de doble promotor. La secuencia codificante de cada DTA está bajo el control transcripcional de las  
secuencias promotoras tanto P4 de IGF-II como de H19, respectivamente, Kana (R) – gen de resistencia a  
kanamicina.

10 **Figura 2.** Actividad relativa *in vitro* de construcciones que expresan DTA con secuencias reguladoras H19,  
P4 y H19 + P4 en células T24P. Las células T24P humanas se cotransfектaron con 2 µg de LucSV40 y las  
concentraciones indicadas de H19-DTA, P4-DTA o H19-DTA-P4-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas  
dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Repetición adicional  
15 del experimento descrito en **(A).** **C.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. Eje Y (para **A-C**): actividad  
luciferasa (% de control). Eje X (para **A-B**): µg de plásmido/pocillo. Las barras de error en esta Figura y en  
todas las Figuras reflejan un error típico de la media.

15 **Figura 3.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células UMUC3. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
10 Repetición adicional del experimento descrito en **(A).** **C.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

20 **Figura 4.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células Hep3B. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

25 **Figura 5.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células ES-2. El experimento se realizó  
como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad luciferasa a  
diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de  
30 barras de datos de 0,005 µg.

35 **Figura 6.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células PC-1. El experimento se realizó  
como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad luciferasa a  
diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de  
35 barras de datos de 0,005 µg.

40 **Figura 7.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células CRL-1469. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

45 **Figura 8.** Actividad relativa *in vitro* de construcciones que expresan DTA con secuencias reguladoras P3,  
P4 y P3 + P4 en células T24P. Las células humanas T24P se cotransfектaron con 2 µg de LucSV40 y las  
50 concentraciones indicadas de P3-DTA, P4-DTA o P4-DTA-P3-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas  
dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de  
datos de 0,005 µg. Eje Y (para **A-B**): actividad luciferasa (% de control). Eje X (para **A**): µg de  
plásmido/pocillo. Los ejes son los mismos que en la Figura 2.

55 **Figura 9.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células HT-1376. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 8; los ejes son los mismos que en la Figura 8. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

60 **Figura 10.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células Hep3B. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 8; los ejes son los mismos que en la Figura 8. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

65 **Figura 11.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células ES-2. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 8; los ejes son los mismos que en la Figura 8. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

70 **Figura 12.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células PC-1. El experimento se  
realizó como se ha descrito para la Figura 8; los ejes son los mismos que en la Figura 8. **A.** Actividad  
luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.**  
Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 13.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células CRL-1469. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 8; los ejes son los mismos que en la Figura 8. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 14.** Actividad relativa *in vitro* de DTA expresada de construcciones con secuencias reguladoras H19, P3 y H19 + P3 en células T24P. Las células T24P se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y las concentraciones indicadas de H19-DTA, P3-DTA o H19-DTA-P3-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. Eje Y (para **A-B**): actividad luciferasa (% de control). Eje X (para **A**): µg de plásmido/pocillo. Los ejes son los mismos que en la Figura 2.

**Figura 15.** Actividad relativa *in vitro* en células T24P de H19-DTA-P4-DTA frente a construcciones dirigidas por P4 y dirigidas por H19 en combinación. Las células T24P se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y las concentraciones indicadas de H19-DTA-P4-DTA o una cantidad igual de cada uno de P4-DTA + H19-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. Eje Y (para **A-B**): actividad luciferasa (% de control). Eje X (para **A**): µg de plásmido/pocillo.

**Figura 16.** Actividad relativa *in vitro* en células Hep3B de H19-DTA-P4-DTA frente a construcciones dirigidas por P4 y dirigidas por H19 en combinación. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 15; los ejes son los mismos que en la Figura 15. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 17.** Actividad relativa *in vitro* en células ES-2 de H19-DTA-P4-DTA frente a construcciones dirigidas por P4 y dirigidas por H19 en combinación. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 15; los ejes son los mismos que en la Figura 15. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 18.** Actividad relativa *in vitro* en células PC-1 de H19-DTA-P4-DTA frente a construcciones dirigidas por P4 y dirigidas por H19 en combinación. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 15; los ejes son los mismos que en la Figura 15. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 19.** Actividad relativa *in vitro* en células CRL-1469 de H19-DTA-P4-DTA frente a construcciones dirigidas por P4 y dirigidas por H19 en combinación. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 15; los ejes son los mismos que en la Figura 15. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 20.** Actividad relativa *in vitro* en células HT-1376 de P4-DTA-P3-DTA frente a construcciones dirigidas por P3 y dirigidas por P4 en combinación. Las células HT-1376 se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y las concentraciones indicadas de P4-DTA-P3-DTA o una cantidad igual de cada uno de P3-DTA + P4-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. Los ejes son los mismos que para la Figura 15.

**Figura 21.** Actividad relativa *in vitro* en células ES-2 de P4-DTA-P3-DTA frente a construcciones dirigidas por P3 y P4 en combinación. Las células ES-2 se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y las concentraciones indicadas de P4-DTA-P3-DTA o una cantidad igual de cada uno de P3-DTA + P4-DTA. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. Los ejes son los mismos que para la Figura 15.

**Figura 22.** Actividad relativa *in vitro* en células Hep-3B de 0,005 µg de P4-DTA-P3-DTA frente a 0,005 µg de cada una de las construcciones dirigidas por P3 y dirigidas por P4 en combinación. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 21. Los ejes son los mismos que para la Figura 15B.

**Figura 23.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células HT-1376. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 15; los ejes son los mismos que en la Figura 15. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Repetición adicional del experimento descrito en (**A**). **C.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**Figura 24.** Actividad relativa *in vitro* en células CRL-1469 de 0,005 µg de P4-DTA-P3-DTA frente a 0,005 µg de cada una de las construcciones dirigidas por P3 y dirigidas por P4 en combinación. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 21. Los ejes son los mismos que para la Figura 15.

**Figura 25.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de H19-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 26.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de P4-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

5 **Figura 27.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de H19-DTA-P4-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 28.** Volumen *ex vivo* de tumores de ratones tratados con H19-DTA-P4-DTA.

**Figura 29.** Peso *ex vivo* de tumores de ratones tratados con H19-DTA-P4-DTA.

10 **Figura 30.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de cada uno de H19-DTA y P4-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 31.** Sumario de datos del modelo de cáncer de vejiga T24P.

**Figura 32.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de cada uno de H19-DTA y P4-DTA en el modelo HT-1376. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

15 **Figura 33.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de H19-DTA-P4-DTA en el modelo HT-1376. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 34.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de P3-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 35.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de P4-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

20 **Figura 36.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de P4-DTA-P3-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 37.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de cada uno de P3-DTA y P4-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

25 **Figura 38.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de P3-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

**Figura 39.** Efecto antitumoral *in vivo* de la inyección de 25 µg de H19-DTA-P3-DTA. Eje Y: aumento del volumen tumoral en veces. Eje X: tiempo (días).

30 **Figura 40.** Actividad relativa de construcciones que expresan DTA en células HT-1376. El experimento se realizó como se ha descrito para la Figura 2; los ejes son los mismos que en la Figura 2. **A.** Actividad luciferasa a diversas dosificaciones en comparación con células transfectadas con LucSV40 solamente. **B.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al campo del tratamiento de cáncer, particularmente a una nueva terapia útil para tratar tumores que expresan H19 y/o expresan Factor de Crecimiento de Tipo Insulina II (IGF-II).

35 Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico que comprende:

(a) un primer marco abierto de lectura que codifica un producto génico citotóxico o citostático, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una primera secuencia reguladora de la transcripción específica de cáncer; y

40 (b) un segundo marco abierto de lectura que codifica el producto génico citotóxico o citostático (es decir el mismo producto génico o una variante del mismo), estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una segunda secuencia reguladora de la transcripción específica de cáncer;

45 en la que la primera secuencia reguladora de la transcripción y la segunda secuencia reguladora de la transcripción son diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en: i) una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 (por ejemplo un promotor de H19) y ii) una secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II (por ejemplo un promotor P3 de IGF-II o P4 de IGF-II).

En otras palabras, la construcción puede contener al menos dos secuencias reguladoras de la transcripción diferentes, derivando cada una de una secuencia reguladora diferente (H19, P4 o P3), y estando cada una unida

operativamente a una secuencia separada que codifica el producto génico citotóxico o citostático. Por ejemplo, las dos secuencias reguladoras de la transcripción pueden ser:

5 i) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II;

10 ii) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; o

15 iii) una primera secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II, y una segunda secuencia reguladora de la transcripción que es una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II;

Debería entenderse que los múltiples casetes de expresión están unidos operativamente a distintas secuencias reguladoras de la transcripción, permitiendo la regulación independiente de la transcripción de cada marco abierto de lectura que codifica el agente citotóxico. Por lo tanto, la disposición de las fases abiertas de lectura dentro de la 20 construcción pueden variar, por ejemplo, la construcción pueden diseñarse de tal modo que el primer casete de expresión esté cadena arriba o cadena abajo del segundo casete de expresión.

25 Puede proporcionarse una única molécula de ácido nucleico, que comprenda un primer marco abierto de lectura que codifique un producto génico citotóxico o citostático, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19; y un segundo marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II. La molécula de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

30 25 Puede proporcionarse una única molécula de ácido nucleico, que comprenda un primer marco abierto de lectura que codifique un producto génico citotóxico o citostático, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19; y un segundo marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II. La molécula de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

35 30 Puede proporcionarse una única molécula de ácido nucleico, que comprenda un primer marco abierto de lectura que codifique un producto génico citotóxico o citostático, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II; y un segundo marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II. La molécula de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifique el producto génico citotóxico o citostático, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

40 35 Se representa en la Figura 1 una construcción exemplar de la invención, que expresa un agente citotóxico (DTA) bajo control de expresión separado de los promotores de H19 y P4, H19-DTA-P4-DTA, y se describe adicionalmente en el presente documento (Ejemplo 1). Se describen construcciones exemplares de la invención que expresan DTA bajo control de expresión separado de los promotores P4 y P3 (P4-DTA-P3-DTA) y de los promotores de H19 y P3 (H19-DTA-P3-DTA) también en la sección de Detalles Experimentales en el Ejemplo 5 y Ejemplo 6, respectivamente. Estas construcciones se representan por las secuencias de ácido nucleico como se exponen en SEC ID Nº: 11, 24 y 18, respectivamente, como se detalla posteriormente en el presente documento.

45 40 Como se demuestra en el presente documento, la administración de un vector de expresión único que comprenda dos secuencias diferentes, expresando cada una DTA bajo el control transcripcional de un promotor específico de tumor diferente, concretamente, los promotores H19 y P4 de IGF-II, dio como resultado la destrucción potenciada de una amplia diversidad de células de carcinoma, en comparación con cada construcción (que expresan DTA bajo el control del promotor de H19 o P4) administradas por separado (Ejemplos 1-4). Además, se mostró que los resultados eran mayores que los aditivos en comparación con la administración de las construcciones de promotor único en combinación (Ejemplo 7). La capacidad potenciada del vector de expresión único que comprende los dos genes diferentes se confirmó también por ensayos *in vivo* (Ejemplo 10).

50 45 Además, la administración de un vector de expresión único que comprende dos secuencias diferentes, expresando cada una DTA bajo el control transcripcional de un promotor específico de tumor diferente, concretamente los promotores P3 de IGF-II y P4 de IGF-II, dio como resultado la destrucción potenciada de una amplia diversidad de

5 células de carcinoma, en comparación con cada construcción (que expresa DTA bajo el control del promotor P3 o P4) administrada por separado (Ejemplo 5). Además, se mostró que los resultados eran mayores que los aditivos en comparación con la administración de construcciones de promotor único en combinación (Ejemplo 8). La capacidad potenciada del vector de expresión único que comprende los dos genes diferentes se confirmó también por ensayos *in vivo* (Ejemplo 11).

10 Además, la administración de un vector de expresión único que comprende dos secuencias diferentes, expresando cada una DTA bajo el control transcripcional de un promotor específico de tumor diferente, concretamente los promotores de H19 y P3 de IGF-II, dio como resultado la destrucción potenciada de células de carcinoma de vejiga, en comparación con cada construcción (que expresaba DTA bajo el control del promotor P3 o de H19) administrada por separado (Ejemplo 6). La capacidad potenciada del vector de expresión único que comprende los dos genes diferentes se confirmó también por ensayos *in vivo* (Ejemplo 12).

15 El producto génico citotóxico de las composiciones usadas puede ser una toxina diftérica. Ambas secuencias pueden codificar la misma toxina diftérica. Cada secuencia puede codificar una variante diferente de una toxina diftérica. La toxina diftérica puede ser DTA.

20 15 La construcción puede comprender además un marco abierto de lectura adicional que codifique un TNF alfa, estando el marco abierto de lectura adicional unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción adicional seleccionada de una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II o una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

25 20 El producto génico citotóxico puede ser timidina quinasa. El producto génico citotóxico puede ser toxina de *Pseudomonas*. El producto génico citotóxico puede ser ricina. El producto génico citotóxico puede ser toxina del cólera. El producto génico citotóxico puede ser producto génico de retinoblastoma. El producto génico citotóxico puede ser p53. El producto génico citotóxico puede ser un producto génico de retinoblastoma.

30 25 El agente citotóxico puede ser tumoricida, es decir de mayor toxicidad para células tumorales en relación con células no tumorales.

35 30 35 El producto génico citostático de los usos y composiciones puede ser p21. El producto génico citostático puede ser p27. El producto génico citostático puede ser p53. El producto génico citostático puede ser p53175P. El producto génico citostático puede ser p57. El producto génico citostático puede ser p15. El producto génico citostático puede ser p16. El producto génico citostático puede ser p18. El producto génico citostático puede ser p19. El producto génico citostático puede ser p73. El producto génico citostático puede ser GADD45. El producto génico citostático puede ser APC1. El producto génico citostático puede ser p73RB1. El producto génico citostático puede ser WT1. El producto génico citostático puede ser NF1. El producto génico citostático puede ser VH. El producto génico citostático puede ser p53. El agente citotóxico puede ser tumorístico, es decir de mayor toxicidad para células tumorales en relación con células no tumorales. Puede obtenerse una secuencia de ácido nucleico que codifique un agente citotóxico o citostático por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se ejemplifica posteriormente en el presente documento.

40 35 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprenda una construcción de ácido nucleico y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 40 La presente invención puede proporcionar construcciones de expresión eucariotas y vectores que comprendan una construcción de ácido nucleico de la presente invención.

50 45 45 La presente invención puede proporcionar una construcción de ácido nucleico para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto humano que lo necesite. La construcción puede contener dos secuencias de ácido nucleico separadas que expresen el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor P3 de IGF-II y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P3 de IGF-II. El producto génico citotóxico puede ser una toxina diftérica. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de ácido nucleico. El tumor puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.

55 50 55 Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico para su uso en la inhibición de la progresión tumoral en un sujeto humano que lo necesite. La construcción puede contener dos secuencias de ácido nucleico separadas que expresen el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor P3 de IGF-II y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P3 de IGF-II. El producto génico citotóxico puede ser una toxina diftérica. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de ácido nucleico. El tumor puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.



expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.

Puede usarse una composición para inhibir la progresión tumoral en un sujeto humano, que comprenda una construcción de ácido nucleico. La construcción puede contener dos secuencias de ácido nucleico separadas que pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P4 de IGF-II. Las

5 dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor P3 de IGF-II y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P3 de IGF-II. El producto génico citotóxico puede ser una toxina difterica. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la

10 construcción de ácido nucleico. El tumor puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.

Puede usarse una composición para inhibir metástasis tumoral en un sujeto humano, que comprenda una construcción de ácido nucleico. La construcción puede contener dos secuencias de ácido nucleico separadas que pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P4 de IGF-II. Las

15 dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor P3 de IGF-II y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P3 de IGF-II. El producto génico citotóxico puede ser una toxina difterica. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la

20 construcción de ácido nucleico. El tumor puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II del promotor P3 y/o P4.

25 Puede usarse una composición para reducir o aliviar un síntoma asociado con un trastorno neoplásico en un sujeto humano, que comprenda un ácido nucleico. La construcción puede contener dos secuencias de ácido nucleico separadas que pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor P3 de IGF-II y un promotor P4 de IGF-II. Las dos secuencias de ácido nucleico separadas pueden expresar el mismo producto génico citotóxico a partir de un promotor de H19 y un promotor P3 de IGF-II. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la construcción de ácido nucleico. El trastorno neoplásico puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.

30 El trastorno neoplásico de los usos y composiciones puede ser un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma ovárico y un carcinoma pancreático. El trastorno neoplásico de los usos y composiciones de la presente invención puede ser un carcinoma de vejiga. El trastorno neoplásico puede ser un carcinoma hepatocelular. El trastorno neoplásico puede ser un carcinoma ovárico. El trastorno neoplásico puede ser un carcinoma pancreático. El trastorno neoplásico puede ser un carcinoma de colon. El trastorno neoplásico puede ser otro tipo de tumor sólido.

35 La secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 de los usos puede ser un promotor de H19. El promotor de H19 puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El promotor de H19 puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El promotor de H19 puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

40 La secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 de los usos puede comprender un potenciador de H19. El potenciador de H19 puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

45 La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II de los usos puede ser un promotor P3 de IGF-II. El promotor P3 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El promotor P3 de IGF-II puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El promotor P3 de IGF-II puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

50 La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II de los usos puede comprender un potenciador de H19. El potenciador de H19 puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

55 La secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II de los usos puede ser un promotor P4 de IGF-II. El promotor P4 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia

desvelada en el presente documento. El promotor P4 de IGF-II puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El promotor P4 de IGF-II puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

5 La secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II de los usos puede comprender un potenciador de H19. El potenciador de H19 puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede comprender un fragmento de una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento. El potenciador de H19 puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia desvelada en el presente documento.

#### **Construcciones de ácido nucleico**

La expresión “construcción de ácido nucleico” o “construcción” como se usa en el presente documento incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico citotóxico o citostático (por ejemplo, toxina Diftérica, DT) de acuerdo con la presente invención, estando la secuencia de ácido nucleico unida operativamente a un promotor y opcionalmente otras secuencias reguladoras de la transcripción. En las construcciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica DT puede estar unida operativamente al menos a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, secuencia reguladora de la transcripción P3 y/o secuencia reguladora de la transcripción P4.

20 La construcción de ácido nucleico de los usos y composiciones puede ser un vector de expresión eucariota. La construcción de ácido nucleico puede ser un plásmido. La construcción de ácido nucleico puede ser cualquier otro tipo de vector de expresión capaz de mediar en la expresión en una célula cancerosa.

25 La frase “unido operativamente” se refiere a una secuencia de ácido nucleico unida a una secuencia de control de la transcripción de tal manera que la molécula tenga la capacidad de expresarse cuando se use para transfectar (es decir, transformar, transducir, infectar o transfectar) una célula huésped. Las secuencias de control de la transcripción son secuencias, que controlan el inicio, elongación y terminación de la transcripción. Son secuencias de control de la transcripción particularmente importantes las que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras.

30 La molécula de ácido nucleico de los usos y composiciones puede ser una molécula de ADN. La molécula puede ser una molécula de ARN. La molécula puede ser cualquier otro tipo de molécula de ácido nucleico conocida en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una construcción, que comprende una secuencia reguladora unida operativamente a un polinucleótido heterólogo, que se administra a células diana. El vector puede ser un vector de expresión viral, un plásmido o una construcción de ADN desnudo y, opcionalmente puede incluir secuencias adicionales requeridas para la construcción, selección, estabilidad, penetración, etc.

35 Como se usa en el presente documento, el término “variante” se refiere a una sal, homólogo, análogo o fragmento de una secuencia de ácido nucleico farmacéuticamente aceptable útil para la invención (por ejemplo, secuencias de vector, secuencias reguladoras de la transcripción, polinucleótidos de interés clonados, etc.). Se abarcan dentro del término “variante” moléculas de nucleótidos naturales y sintéticos modificadas químicamente. También están abarcadas dentro del término “variante” sustituciones conservativas dentro de la secuencia de nucleótidos de la molécula. Además, están abarcados dentro del término “variante” como se usa en el presente documento sustituciones no conservativas dentro de la secuencia de nucleótidos de la molécula, siempre que la secuencia conserve sustancialmente su función requerida.

45 Una “variante”, por ejemplo una “variante” de un producto génico citotóxico o citostático, como se usa en el presente documento, puede referirse a un gen que se reconoce en la técnica que es un producto de otra versión del mismo gen por ejemplo citotóxico o citostático. Las secuencias génicas y sus productos se clasifican de forma rutinaria como secuencias de un gen particular en bases de datos públicas tales como la base de datos PubMed del Centro Nacional de Estados Unidos para la Información Biotecnológica; por lo tanto, estas pueden estar fácilmente dentro de la experiencia de los expertos en la técnica para identificar variantes de, por ejemplo, un producto génico citotóxico o citostático.

50 Las “variantes”, por ejemplo de un producto génico citotóxico o citostático, pueden ser al menos el 70 % homólogas, o compartir al menos el 75 %, 80 %, 82 %, 84 %, 86 %, 88 %, 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 % o 99 % de homología de secuencia.

Como se usa en el presente documento la frase “toxina Diftérica” (DT o DTX) se refiere a una toxina Diftérica o un fragmento de la misma que contiene al menos una parte activa de la toxina Diftérica, que promueve la muerte celular, o que puede actuar para promover la muerte celular o aliviar de otro modo un trastorno neoplásico en un sujeto. DT está comprendida por dos fragmentos polipeptídicos, A y B [Zdanovskaia, M. V.; Zdanovsky, A. G.; Yankovsky, N. K. “Diphtheria toxin NAD affinity and ADP ribosyltransferase activity are reduced at tryptophan 153

substitutions for alanine or phenylalanine." Research in Microbiology, 2000, 151, 557-562; Bennet, M. J.; Choe, S.; Eisenberg, D. "Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 angstrom resolution." Protein Science, 1994, 3, 1444-1463]. El fragmento A (DTA) consiste en el dominio catalítico (C), mientras que el fragmento B está compuesto del dominio receptor, (R), y el dominio transmembrana, (T). El dominio R contiene una parte receptora que se une al receptor HB-EGF en la superficie celular [Raab, Gerhard; Klagsbrun, Michael "Heparin-binding EGF-like growth factor" Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Reviews on Cancer 1997, 1333, F179-F199]. Después la toxina unida entra en el citoplasma por endocitosis. La serie hidrófoba C terminal de láminas alfa, conocida como el dominio T, se incluye después en la membrana, provocando que el dominio C del extremo N terminal se escinda y se transloque al citoplasma. Una vez escindido, el dominio C se convierte en una enzima activa, cataliza la creación de ADP-ribosasa-EF-2 a partir del péptido de translocación de síntesis proteica EF-2 y NAD<sup>+</sup> (Hudson TH y col, Quantal entry of diphtheria toxin to the cytosol. J Biol Chem. 10 Mar 1985; 260(5): 2675-80). Un dominio C único puede usar el suministro completo de EF-2 de una célula en un periodo de horas, deteniendo la síntesis proteica, dando como resultado muerte celular. La toxina puede ser toxina diftérica de cadena A (DTA).

La DTA puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 6:

15 atggatcctgtatgttgtatctctaaatcttgcgtatggaaaacttctcgaccacgggactaaacctgggtatgtag  
atccatcaaaaaggatataaaaaaggccaaatctgtacacaaggaaattatgcgtatgtggaaagggtttatagtaccgacaataa  
atacgacgcgtcggggatactctgtatgatgaaaaccgcgtctcgaaaactgtggaggcggtggcaagtgcgtatccaggact  
acgaagggtctcgactaaaatggataatgcggaaactattaaagaaaagagtttaggtttaatgcgtactgaaccgtgtatggagcaagt  
20 ggaacggaagagttatcaaaaaggctcggtatgtgtctcggtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgt  
atattataactggaaacaggcgttagactgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgt  
tatgagtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgtgcgtatgt  
25 (SEC ID N°: 6). La secuencia que codifica DTA  
puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 6. La secuencia que  
codifica DTA puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 6. La  
secuencia que codifica DTA puede ser un homólogo de SEC ID N°: 6. La secuencia que codifica DTA  
puede ser una variante de SEC ID N°: 6. La secuencia que codifica de DTA puede ser un fragmento de  
SEC ID N°: 6. La secuencia que codifica de DTA puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 6.  
La secuencia que codifica DTA puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 6.

La secuencia de aminoácidos de la DTA puede ser como se expone en SEC ID N°: 7:

30 MDPDDVVDSSKSVMENFSSYHGTKPGVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDW  
KGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKEL

35 GLSLTEPLMEQVGTEEFIKRGDGASRVVSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEI NFETRGKRGQDAMY-EYMAQACAGNRVRRSL (SEC ID Nº: 7). La DTA puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 7. La DTA puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser una variante de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 7

40 La DTA puede ser al menos el 60 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 90 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos 98 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 7. La DTA puede ser más del 99 % homóloga de SEC ID Nº: 7.

45

Las construcciones pueden contener, en la misma construcción, múltiples casetes de expresión, en los que la expresión del producto génico citotóxico o citostático puede estar dirigida por al menos dos de las siguientes tres secuencias reguladoras de la transcripción: una secuencia reguladora de H19, una P3 de IGF-II y una P4 de IGF-II, es decir la secuencia de ácido nucleico que codifica el producto génico puede estar bajo el control transcripcional de al menos dos de estas secuencias. Como se usa en el presente documento, la frase "que está bajo el control de la expresión de H19 (o P3 de IGF-II o P4 de IGF-II)" (o "control transcripcional") se refiere a la transcripción de la secuencia codificada a partir de una secuencia promotora específica de H19 (o P3 de IGF-II o P4 de IGF-II), o una secuencia derivada de la misma, que puede unirse operativamente a la misma para regular su patrón de expresión (incluyendo patrón de expresión espacial y temporal).

La secuencia reguladora de los usos y composiciones puede derivarse de una secuencia reguladora de la transcripción de H19, P3 de IGF-II o P4 de IGF-II. Como se usa en el presente documento, una descripción de una

secuencia reguladora "derivada de una secuencia reguladora de la transcripción de H19, P3 de IGF-II o P4 de IGF-II" se refiere a una secuencia "derivada" (véase posteriormente) de una región del gen que regula y/o controla la expresión de las secuencias codificantes de H19 o IGF-II. Como tal, una secuencia reguladora incluye, sin limitación, una secuencia derivada de un promotor o potenciador de las secuencias de H19, P3 de IGF-II o P4 de IGF-II.

5 El término "derivado" se refiere al hecho de que una secuencia reguladora de la transcripción (por ejemplo, un promotor o potenciador) puede ser la secuencia reguladora nativa completa del gen, una parte de la secuencia reguladora nativa, una construcción químérica de la secuencia reguladora nativa, una construcción combinatoria de una o más secuencias reguladoras nativas o una variante de la secuencia reguladora nativa obtenida, por ejemplo, por delección, adición o reemplazo de al menos un nucleótido. Una secuencia reguladora variante puede comprender nucleótidos modificados. La secuencia derivada preferentemente demuestra propiedades de control/regulación (por ejemplo, aumento) de la expresión de secuencias codificantes unidas operativamente a la misma.

10 Se describen en el presente documento secuencias reguladoras de H19 que pueden usarse en las construcciones de ácido nucleico para dirigir la expresión específica de un producto génico citotóxico o citostático. Las secuencias reguladoras de H19 útiles en la presente invención incluyen entre otras la región promotora de H19 cadena arriba y la región potenciadora de H19 cadena abajo. En ciertas realizaciones, las secuencias promotoras y potenciadoras de H19 que pueden usarse son las descritas en la Patente de Estados Unidos Nº 6.306.833, como se detalla en el 15 presente documento.

20 La secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 de las composiciones es un promotor de H19. El promotor de H19 puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en una cualquiera de las SEC ID Nº: 1-2. El promotor de H19 puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en una 25 cualquiera de SEC ID Nº: 1-2.

Se muestra la secuencia de nucleótidos de una región promotora de H19 en SEC ID Nº: 1:

ctgcaggcccccaacaaccctcaccaaggccaagggtggtaccgacggacccacagcggggggctggctggggagatgc  
 25 aaactcgccaggctccactccactccaaaccgtggtggccacgcgggctggagatctgtggccgcaccgtgtcagta  
 gagtgccgcgcgagccgtaaagcacagccggcaacatgcggcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccgggggtgccc  
 30 agcggctgtggggactctgtcctgcggaaaccgcgggtacgagcacaagctcggtcaactggatggaaatggccctggggggctg  
 gcaccgcgccaccagggggttgcggcactccctgcggccatccctcagcacccaccctacttccaggaacgtgagggtctgagg  
 tgatgggtggcaggaaggggccctctgtccatccgcggatcccaggggaccgcgcgtggccctggccatgtgcggaaatgtgtcag  
 35 ggcgcgtggcaggcaggcaggcaggcatggtgcctcgaggagacagtgtctgggaggagagggtctggaccctgagg  
 gaggtgtatgggcaatgtcagccctgtccatggccatggccaaaggagggggtgcggggaggccgtttggagaattccaggatgg  
 gctgggtgagagagacgtgtctggaaactgtccaggggcggagggtggccctgcggggggccctgcggaggccctgtctgttgg  
 40 ccggcaggcaggggcgggaaatctggccggccaccccgatggaaaaagccgggctaggaccgagga (SEC ID Nº: 1). La secuencia  
 de H19 puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID Nº: 1.  
 La secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de  
 45 un fragmento de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 1.

50 La secuencia de H19 puede ser al menos el 60 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 90 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 98 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser más de el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 1.

55 Esta secuencia de 831 nucleótidos se extiende de los nucleótidos -837 a -7 desde el sitio del extremo (como se describe en Brannan y col. 1990). Aparece una secuencia TATA consenso en los nucleótidos -27 a -35. Aparecen dos sitios de unión a AP2 consenso (8/9 coincidencias) a aproximadamente -500 y -40 nucleótidos cadena arriba desde el inicio de la transcripción. Cuando se sitúan cadena arriba de la región codificante para un gen heterólogo, aproximadamente 831 pares de bases de la región reguladora pueden ser suficientes para dirigir la expresión del gen heterólogo unido operativamente en células cancerosas que también pueden expresar H19 endógeno. Una región promotora de H19 adicional entre los nucleótidos -819 a +14 (SEC ID Nº: 2) también puede ser suficiente para dirigir la expresión del gen heterólogo unido operativamente en células cancerosas:

gacaaccctcaccaaggccaagggtggtaccgacggacccacagcggggctggctggggagatcgaaactcgccagt

tcctcactccactcccaaccgtggccccacgcgggctggagagtctgtgaggccgcccaccgctgtcagtagatgcgcggc  
 gagccgtaaagcacagcccgcaacatcggtcttcagacaggaaagtggccgcaatgggaccggggtgcccagcggctgtgg  
 gactctgtcctcgccggaaaccgcgggtacagagcacaagctcggtcaactggatggaaatggccctgggggctggcaccgc  
 ccaggggggttcgccactccctctgccccctcagcacccccaccctacttccaggaaacgttagttctgagccgtatggggcagg  
 aaggggccctgtgcccacccggatcccgaggtcccgccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg  
 cggggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg  
 aatgctcagccctgtctccggatgccaaggagggggtcgccggggggccgtttggagaattccaggatgggtctgggtgagaga  
 gacgtgtgtggaaactgtcaggccggagggtggggccctcgccggggccctcgccggggccgtctgtattggccggcaggcc  
 gggccggaaattctggccggggccaccggccatggccatggccatggccatgtgccaaggatgtccgtggccgtggccgtgg  
 (SEC ID Nº: 2). La secuencia de H19 puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 2.

15 La secuencia de H19 puede ser al menos el 60 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 90 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 98 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 2. La secuencia de H19 puede ser más del 99 % homóloga de SEC ID Nº: 2.

30 La región potenciadora cadena abajo del gen H19 humano puede añadirse opcionalmente a una construcción de promotor de H19/DTA para proporcionar niveles potenciados de expresión específica de célula de la molécula DTA. Como se esperaba de una secuencia potenciadora, el potenciador cadena abajo puede ejercer su efecto cuando se sitúa en orientación inversa o directa (en relación con la orientación del potenciador de H19 en el gen de H19 endógeno) cadena abajo desde la región codificante de un gen heterólogo bajo el control del promotor de H19.

La secuencia potenciadora de H19 comprende la secuencia:

50 La secuencia potenciadora de H19 comprende la secuencia:

ccgggttaccggactcccgaggaagataaaatgattccctcctctagagatgggggtgggatctgagcactcagagccaaagg  
gcgcagtgggtccgggccccctccctggccctcccaacatggggccaggaggctagccctcaacctggacccggctg  
ggtctcaggaaatgggtcctccctggccagtgctgtgtttcagatgggtgtcatgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
gtgtgtgtgtgtgtgtatggctgacaaggccccagagggccaaagacctgagtgagatctgtgtacttctcaaaagggggattggaa  
gttcgagaaagagctgtggtcagccgtctcccttaaggctgtgttaaccacactaggcataggcctgcgcggccgtccctct  
tccctcctccgcgcctctccctctcccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgc  
gagggaagccagcgggggcccttcgttggaaagccacactgcaggccggctgtgtggaaaggggctgtctcgcagaggctcccg  
ccgcctcgcagccgtttcttgcagactgcgtgtgggtattctgtccctgtcagactgtgtgtcaaaaagcagacactgtgtcc  
ttgtcccttagggagcccgccgtccatccccaaacacactgcaggctgtggggacacaggccggaggccgggtccgcggggagccggccgg  
ggggccggaccattaaacacacacacggccaggactgcaggctccctccctccctgtcgtccgcggccagccctgtcgtccgcgg  
cccaacggcccttaaggccaggaaqccaggactqgggtcaqaaacaqactccctggqaqqqqqttcaqggccqgaccggccqggqaa

agggctggcagggctgtggggacgcgtaccgtggcccccacgttgcgaaaactggntgcctggctggaaagatggggagatgc  
caagcctctaggcagcacgagcaggcgagggtgcattggaggccggggcggggaggctgcactgcagcatgcacccaaagccan  
agggagtggagaccaggcccttgcgaaatcgagaagtagaaaaggcggttgcggaggctcgaaacccgtgaccctcaacagatgggt  
ctccagcctggctcgccctccgcaggccccctcccttaccaggcttagagcctccagttccggccggcccgagg  
tgaacggccctaccctgggtcggtggacagagggcacgttcataagagttggctccaaggacatggctttgcagttcacag  
gaagcattcgagataaggagctgtttcccgatgggcacggcaggcaggggggctgtggggcagcccaagggtgcaggcc  
gctgtggggctgcagctgcctggcccccactcccgccatggcggagggtggaggcggggcagctgcacagtggccc  
caggcgaggcttcagccccagtcgtccctccgggtggcagcccaagagggtctggctgagcctccacatctggactccatcacc  
caacaacttaattaaggctgaatttcacgtgtccgtgacttggtagacaaagccccgtccaaaggggcagccagcctaaggcagt  
gggacggcgtgggtggccggcgacggggagatggacaacaggaccgagggtgtcggggcgtatggggagatggacaacagg  
accgagggtgtcgggcatggggagatggacaacaggaccgagggtgtcgggacacgcgtactcatgcacgccaatgg  
ggggcgtggaggctggggagcagacagactggctgggtggcgggaaggacggcagatg (SEC ID N°: 4). La secuencia de H19  
puede ser un homólogo de SEC ID N°: 4. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID N°: 4. La  
secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID N°: 4. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un  
fragmento de SEC ID N°: 4. “Homólogo” puede referirse a cualquier grado de homología desvelado en el  
presente documento. La secuencia de H19 puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 4.

La secuencia potenciadora de H19 comprende la secuencia:

gggctggccggaaggacgggcagatg (SEC ID Nº: 5). La secuencia de H19 puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 5. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID Nº: 5. La secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 5. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 5. "Homólogo" puede referirse a cualquier grado de homología desvelado en el presente documento. La secuencia de H19 puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 5.

También pueden usarse fragmentos de este potenciador, por ejemplo fragmentos de las secuencias expuestas en una cualquiera de SEC ID Nº: 3-5 para facilitar la expresión génica. El potenciador puede consistir en una secuencia como se expone en una cualquiera de SEC ID Nº: 3-5.

Se describen adicionalmente en el presente documento secuencias reguladoras P3 de IGF-II que pueden usarse en las construcciones de ácido nucleico para dirigir la expresión específica de un producto génico citotóxico o citostático. La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II de las composiciones puede ser un promotor P3 de IGF-II. El promotor P3 corresponde a la secuencia de nucleótidos -1229 a +140 del gen de IGF-II (un ejemplo de una secuencia del gen de IGF-II se encuentra en el Cromosoma 11, NC\_000011.8, pares de bases 2106926-2116578).

15 Una secuencia del gen de IGF-II de los usos y composiciones es:

ctctttccctgtccccgtcccccacctggcgctctgtctccctcacctgtctccctttctgttccttccttcggccccctctggccag  
 5 ctcaggactttccctggccctcacctgtccgcaccgtgcacgtctctgtctgtccgtccctgacccggacccccaag  
 gcagagtggggggcttgcggaaaggcgccggagggctagagtgccagctggcgagtgcttgcataatttggaaagggggt  
 ggcagagggggcggtgagaggactggccagggtccggcatgtcaaggagatgaccaaggaggcttgcataaaaaactccct  
 cccactagtcttagagaggcatgcaaaagtgtgtctgtccactgcctgtcagtcgtcacataatttgcataaaaaactccct  
 gggctcggagcaaggctggggctgcccgtgggggttaccacccctgtcagggagcaggccaaatgtgtggctccgg  
 10 cctccaccccgagtggttaacccggccctgtgacccgcagccgtgggggtgtgcataagactggccctcccttgcattgt  
 agtctggggacccctgggtcgactcccagggtggctgagctgtctcgcacccacggggagatgtggtagcacaataggga  
 gatgttctggggccctggctactggcatttggggaaaggaggcttgcgtgtgtgttgggggtacccaagg  
 cagactggagttggagaactgggtactggaaaacaagggttctagagcatgggtggcgtgtgttgcataaccattggagtcgtga  
 15 cccaggcgtggctcagtcagactggaaaagggtggaaaaggccaggggggggggggcggggctggccagcaggactggccgtcg  
 ctgtggggcgatgttgcctctggaccccccctgtcagctgggggtgtggggaggaaaggggctggcgtcttgcagcacatgctc  
 ttaggggtggggctgtcgcacatgtggcgctggaggccctgagaatggcgtatgtacgcgtggcgtggccctggccatgt  
 20 gtcataaggacggaggcagggtgggtgtccagctggggccctgcagctgtgtatggcgtggccctgcataatgaccgtcaga  
 tggtcacccctgtgtaaaattactgtgtctgtcaatggaaaggaaactggccctttctgtgtcttcgcacatgtcactgt  
 gcccgtccccctcacccgtcattgtgttactttgtataaaaaataatgttataaggaaagccgtcittcaatttcaactga  
 atttgttaggtggcaattttggggggggggccctctggctggggctggctggccgtccgcacccacttctcccgcccc  
 25 ccagacaccaatggaaatcccaatggggaaatggggatgtcgatgtgtgtcttcaccccttgcctgtgcacccatgt  
 cccagtgtggacccctgtgg  
 ggagggggctctcagacctgtggcaggggccctagagtggcgtggatccatccatcgtccacccatccatcgt  
 30 agcagccccagccgtctgtcgacttgcacccctccgtggccatccatcgtggggccatccatcgtgggggggggggg  
 ttcccatcacacgcctcctcgtcaagggtggggccaggggtggccatccatcgtgggggggggggggggggggggg  
 attctgtggggggcggtgaggctctgtcgtgg  
 35 gggcgtccctactggcagggcccaacttattccacccatcgtgggggggggggggggggggggggggggggggg  
 gggcgtccctactggcagggcccaacttattccacccatcgtgggggggggggggggggggggggggggggggg  
 ggacccacaggatgcaatgcacccatcgtgg  
 40 ggatgg  
 ggatgg  
 ggatgg  
 45 ggatgg  
 ggatgg  
 ggatgg  
 50 ggatgg  
 ggatgg  
 ggatgg  
 55 (SEC ID N°: 10). cagggttaact

La secuencia de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 10. La secuencia de ácido nucleico de la secuencia de IGF-II puede consistir en SEC ID N°: 10. La secuencia de IGF-II puede ser un homólogo de SEC ID N°: 10. La secuencia de IGF-II puede ser una variante de SEC ID N°: 10. La secuencia de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID N°: 10. La secuencia de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 10. La secuencia de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 10.

La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II de los usos es un promotor P3 de IGF-II (también denominado en el presente documento "P3"). La secuencia del promotor P3 es:

gagctggccatgcaggtaggatttagtgcgtgtttccggccctgtatccctctctgtggcgccggagccctccgttaggt

15 El promotor P3 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 8. La secuencia de ácido nucleico del promotor P3 de IGF-II puede consistir en SEC ID Nº: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID Nº: 8. el promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID Nº: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 8.

La secuencia del promotor P3 es:

20 gacgggggtggcgccggcaggatggagagggggcaggtggcaggagtcatggcagacccacattcgcacact  
ctccccacacccctctgcgtcccaacacccaaacaggagtcccgagagggggagagggggctgtggctgaggcta  
agaagggcagagccctcgaccggagagaggccgcggccctgcccagtggcagcgtgaagttccataaaggagggtgggaa  
aggagacccccccccccctactgcctgtcagagatgagccgggggtcagggatggagccatggcacttcgtacgggat  
ggtcagggctcccggtgggggtcagggagaagagactggctggagggagagggccggagcaaggcgcgggg  
gtggtcagcagggagaggggtgggggttaggtggagccgggtggagggactggctcacacataaaagctgagggactga  
25 ccagcctgcaactggacattagcttcctgtaaagagacttcagctccctcccttcctccctccctgcggccagcga  
gcctctgtgagctgttagtaaccaggccgtggatgagactctc (SEC ID №: 12)

30 El promotor P3 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 12. La secuencia de ácido nucleico del promotor P3 de IGF-II puede consistir en SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 12.

35 El promotor P3 de IGF-II puede comprender un sitio de unión a Sp1 del mismo. El sitio de unión a Sp1 puede ser los restos 10-18 de SEC ID Nº: 12. El sitio de unión a Sp1 puede ser los restos 388-399 de SEC ID Nº: 12. El sitio de unión a Sp1 puede ser otros sitio de unión a Sp1 hallado en SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. El promotor P3 de IGF-II puede comprender una caja TATA. La caja TATA puede ser los restos 476-482 de SEC ID Nº: 12. La caja TATA puede ser otra caja TATA hallada en SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12.

40 La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 60 % homóloga de una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 17. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 90 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 98 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12. La secuencia P3 de IGF-II puede ser más del 99 % homóloga de SEC ID Nº: 8 o SEC ID Nº: 12.

45

50

55

El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en <sup>-291</sup> - <sup>+130</sup>, en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en <sup>-1232</sup> - <sup>+812</sup>, en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en <sup>-238</sup> - <sup>+140</sup>, en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados 5' del resto <sup>+515</sup>, en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede

contener los elementos promotores hallados 5' del resto 238, en relación con el sitio de inicio de P3

Se describen además en el presente documento secuencias reguladoras P4 de IGF-II que pueden usarse en las construcciones de ácido nucleico para dirigir la expresión específica de un producto génico citotóxico o citostático. La secuencia reguladora de la transcripción de P4 de IGF-II de las composiciones puede ser un promotor P4 de IGF-II que contiene una secuencia reguladora de transcripción de IGF-II que dirige la expresión de un producto génico citotóxico o citostático.

II (también denominado en el presente documento "P4"). La secuencia del promotor P4 puede ser la expuesta en SEC ID Nº: 9, como se expone posteriormente en el presente documento.

El promotor P4 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 9. La secuencia de ácido nucleico del promotor P4 de IGF-II puede consistir en SEC ID Nº: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID Nº: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID Nº: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 9.

La secuencia del promotor P4 se expone en SEC ID N°: 13:

ggatccccaaaatgttctgttcatgtccaaatttacgtataatggctacggcaaaattcccaatttcatatggagaa  
tttcttaactaccctccctacaaaattggcccccaagctagctggccctatttgagaccttctcatgttcccaatttgcattatggagca  
acttctctcatccccaaacctgtatattttctggagtctcgagtttagtcattaaatcaggccccacattaaacggagccccgggt  
ccccctccctccaggacacccttcgtaagccgcaggcagaagaactctgccttgcgtccccaaaatttggcattgttccggc  
gccccccaccactgcagctcccaaccccgccacagggactgtttccggccctctgttccctacgaagtccccagaga  
actcggattggaaaatttctcttagcgttcccaacacacttgggtccgcggccctcaggacgtggacaggggagggttcc  
ccgtgtccaggaaagcgcacccggcattcccccaatttggcattgtccccgggttcccaacggactggcgttgc  
tccccggacactgaggactggccccgggttcgttccctacgttccggccacagagcgttgcattgttccgttgc  
tgagctcttggcggcccgccggacgcagctccagctcgggttagctccccggccgcgttccctccggctgtccggccctg  
accggctctccggccgcattgttccgggttccggctgtccggctgtccggccggggag (SEC ID N°: 13).

El promotor P4 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID Nº: 13. La secuencia de ácido nucleico del promotor P4 de IGF-II puede consistir en SEC ID Nº: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID Nº: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID Nº: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 13.

La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 60 % homóloga de una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos 90 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos 98 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser más de el 99 % homóloga de SEC ID Nº: 9 o SEC ID Nº: 13.

El promotor P4 puede corresponder a la secuencia de nucleótidos -546 a +102 del gen de IGF-II, en relación con el sitio de inicio de P4 de IGF.

50 Estas secuencias reguladoras de genes impresos y no impresos genómicamente que se expresan en células cancerosas pueden delinearse además para definir las secuencias reguladoras mínimas requeridas para obtener la expresión específica de tumor deseada. Por ejemplo, la región promotora puede alterarse mediante adiciones, sustituciones o delecciones y ensayarse con respecto a retención de función de expresión específica de tumor. Pueden ensayarse diversas partes del potenciador corriente abajo H19 individualmente con respecto a la capacidad 55 para potenciar la transcripción del promotor de H19.

La proteína TNF-alfa de los usos y composiciones puede codificarse por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:

5 gcagcagaagatgcctgtccctgagccgttcagcttcgtatcgccggagccaccaccctgttcgcctgtgaactcggcgta  
tcggcccccagagagaggatcccccagagacctgagccgtatcccccgtggccaggctgtgagaagcagcagcagaacccc  
cagcgacaagcccgccacgtggccaaaccccccaggccagctgcgtggctgaacagaagagccaacccct  
gctggccaacggcggtggagctgagagacaaccatcgccgtgttaccctgtatctacagccagggtgtca  
agggccagggtgtcccccacgtgtccgtaccatcagcagaatcgccgtgttaccagaccaagggtgaacctg  
ctgtccgcacatcaagggccatcgccagagagaccccgaggccgaggccaaacccctgttacgagccatctaccctggcg  
gctgtcccgactggagacagactgagccggagatcaacagacccactacctggatttgcggagagccggccagggt  
gtacttcggcatcatcgccctgtgataatctagaaccatgg (SEC ID Nº: 14). La secuencia de ácido nucleico que codifica el TNF-alfa puede  
10 consistir en SEC ID Nº: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser homóloga de SEC ID Nº: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser una variante de SEC ID Nº: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 14.

La secuencia de aminoácidos del TNF-alfa es

15 MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSFLSFLIVAGATTLFCLLNFG  
VIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRANAL  
LANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHVLLHTSIRIAVSYQTKVNL  
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYF GIIAL (SEC ID Nº: 15)  
20 La secuencia del TNF-alfa puede consistir en SEC ID Nº: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser homóloga de SEC ID Nº: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser una variante de SEC ID Nº: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 15.

25 Pueden generarse alteraciones en una secuencia reguladora (por ejemplo una secuencia que codifica un producto genérico citotóxico o citostático) usando diversos procedimientos químicos y enzimáticos que se conocen bien por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede suprimirse regiones de las secuencias definidas por sitios de restricción. Puede emplearse mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para alterar la secuencia de una manera definida y/o introducir sitios de restricción en regiones específicas dentro de la secuencia. Adicionalmente, pueden generarse mutantes de delección usando ADN nucleasas tales como Bal31 o ExoIII y nucleasa S1. Se generan delecciones progresivamente mayores en las secuencias reguladoras incubando el ADN con nucleasas durante mayores periodos de tiempo.

30 35 Las secuencias alteradas se evalúan con respecto a su capacidad para cumplir la función requerida, por ejemplo dirigir la expresión específica de tumor de secuencias codificantes heterólogas en células huésped apropiadas. Puede estar dentro del alcance que cualquier secuencia reguladora alterada que conserve su capacidad para dirigir la expresión específica de tumor se incorpore en las construcciones de ácido nucleico para uso adicional.

40 45 Las construcciones pueden producirse usando procedimientos recombinantes y de síntesis convencionales bien conocidos en la técnica. Puede obtenerse una secuencia de ácido nucleico aislada de su fuente natural, como un gen entero (es decir, completo) o una parte del mismo. También puede producirse una molécula de ácido nucleico usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación) o síntesis química (véase por ejemplo Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York; Ausubel, y col., 1989, Capítulos 2 y 4). Las secuencias de ácido nucleico incluyen secuencias de ácido nucleico naturales y homólogos de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, variantes alélicas naturales y secuencias de ácido nucleico modificadas en las que se han insertado, suprimido, sustituido y/o invertido nucleótidos de tal manera que tales modificaciones no interfieran sustancialmente con la capacidad de la molécula de ácido nucleico para codificar un oligonucleótido funcional.

50 55 Puede producirse un análogo de molécula de ácido nucleico usando varios procedimientos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, igual que la referencia anterior). Por ejemplo, pueden modificarse moléculas de ácido nucleico usando diversas técnicas incluyendo, pero sin limitación, técnicas de mutagénesis clásica y técnicas de ADN recombinante, tales como mutagénesis dirigida, tratamiento químico de una molécula de ácido nucleico para inducir mutaciones, escisión de enzimas de restricción de un fragmento de ácido nucleico, ligación de fragmentos de ácido nucleico, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o mutagénesis de regiones seleccionadas de una secuencia de ácido nucleico, síntesis de mezclas de oligonucleótidos y ligación de grupos de mezcla para "construir" una mezcla de moléculas de ácido nucleico y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, pueden seleccionarse análogos de moléculas de ácido nucleico de una mezcla de ácidos nucleicos modificados explorando con respecto a la función del ácido oligonucleico codificado por el ácido nucleico con respecto a progresión tumoral, por ejemplo por los procedimientos descritos en el presente documento.

60 Opcionalmente, la construcción puede comprender además una o más secuencias que codifican productos génicos adicionales bajo un control de la transcripción específico de cáncer (por ejemplo uno específico de H19). La construcción también puede comprender otras secuencias reguladoras o marcadores seleccionables, como se conoce en la técnica. La construcción de ácido nucleico (también denominada en el presente documento "vector de

expresión") o sistema de construcción puede incluir secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para replicación e integración en procariotas, eucariotas o preferentemente ambas (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, un vector de clonación típico puede contener también secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, terminadores de la transcripción y la traducción y una señal de poliadenilación.

5 Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces de promotores homólogos o heterólogos unidos. Los potenciadores están activos cuando se sitúan cadena abajo o cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen una amplia serie de huéspedes y están activos en diversos tejidos. Por ejemplo, el potenciador de gen temprano SV40 puede ser adecuado para muchos tipos celulares. Otros potenciadores que son adecuados para la presente invención incluyen los derivados de virus del polioma, citomegalovirus humanos o murino (CMV), la repetición a largo plazo de diversos retrovirus tales como virus de leucemia murina, virus de sarcoma de Rous o murino y VIH.

10

En la construcción del vector de expresión, el promotor puede situarse de modo preferente aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heterólogo de la que puede estar del sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Como se puede conocer en la técnica, sin embargo, puede acomodarse cierta variación en esta distancia sin pérdida de función del promotor.

15 También pueden añadirse secuencias de poliadenilación al vector de expresión para aumentar la estabilidad del ARN. Se requieren dos elementos de secuencia distintos para poliadenilación precisa y eficaz: secuencias ricas en GU o U localizadas cadena abajo del sitio de poliadenilación y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, AAUAAA, localizada 11-30 nucleótidos cadena arriba. Las señales de terminación y poliadenilación 20 ejemplares que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40.

25 Además de los elementos ya descritos, el vector de expresión puede contener normalmente otros elementos especializados que se pretende que aumenten el nivel de expresión de ácidos nucleicos clonados o que faciliten la identificación de células que porten el ADN recombinante. Por ejemplo, varios virus animales contienen secuencias de ADN que promueven la replicación cromosómica extra del genoma viral en tipos celulares permisivos. Se replican plásmidos que portan estos replicones virales de forma episómica siempre que se proporcionen los factores apropiados por genes portados en el plásmido o con el genoma de la célula huésped.

30 El vector puede o no incluir un replicón eucariota. Si puede estar presente un replicón eucariota, entonces el vector puede ser amplificable en células eucariotas usando el marcador seleccionable apropiado. Si el vector no comprende un replicón eucariota, no es posible la amplificación episómica. En su lugar, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula modificada por ingeniería genética, cuando el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

35 Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, y pNMT81, que están disponibles de Invitrogen, pCI que puede estar disponible de Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, 40 que están disponibles de Strategene, pTRES que puede estar disponible de Clontech, y sus derivados. Estos pueden actuar como cadena principal de vector para las construcciones.

45 También pueden usarse vectores de expresión que contengan elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2, por ejemplo. Los vectores derivados de virus de papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein-Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMTO10/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor de mama murino, promotor del virus de sarcoma de Rous, promotor de polihedrina u otros promotores que se ha mostrado que son eficaces para la expresión de células eucariotas. Estos pueden actuar como cadena principal de vector para las construcciones.

50 Como se ha descrito anteriormente, los virus son agentes infecciosos muy especializados que han evolucionado, en muchos casos, para eludir mecanismos de defensa del huésped. Normalmente, los virus infectan y se propagan en tipos celulares específicos. La especificidad de dirección de los vectores virales utiliza su especificidad natural para dirigirse específicamente a tipos celulares predeterminados e introducir de este modo un gen recombinante en la célula infectada. Por lo tanto, el tipo de vector usado por la presente invención dependerá del tipo celular transformado. La capacidad para seleccionar vectores adecuados de acuerdo con el tipo celular transformado puede estar dentro de las capacidades del experto habitual en la materia y como tales, no puede proporcionarse en el presente documento una descripción general de las consideraciones de selección. Por ejemplo, pueden marcarse como objetivo las células de médula ósea usando el virus de leucemia de linfocitos T humana de tipo I (HTLV-I) y las células de riñón pueden marcarse como objetivo usando el promotor heterólogo presente en el baculovirus nucleopolihedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), como se describe por Liang, C. Y. y col. (2004). High efficiency gene transfer into mammalian kidney cells using baculovirus vectors. Arch Virol 149, 51-60.

55 Los vectores virales recombinantes son útiles para expresión *in vivo* de los genes puesto que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de dirección. La infección lateral puede ser inherente en el ciclo de vida de los

retrovirus, por ejemplo, y puede ser el procedimiento por el que una célula infectada única produce muchos viriones descendientes que emergen e infectan células vecinas. El resultado puede ser la rápida infección de una gran área de células, la mayoría de las cuales no fueron infectadas inicialmente por las partículas virales originales. Esto puede contrastar con la infección de tipo vertical en la que el agente infeccioso se propaga solamente a través de la descendencia directa. También pueden producirse vectores virales que son incapaces de propagarse de forma lateral. Esta característica puede ser útil si el fin deseado puede ser introducir un gen específico en solamente un número localizado de células diana.

Pueden usarse diversos procedimientos para introducir el vector de expresión en células. Tales procedimientos se describen en general en Sambrook y col, igual que la referencia anterior; Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang y col., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega y col., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988); y Gilboa y col. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véase Patentes de Estados Unidos Nº 5.464.764 y 5.487.992 para procedimientos de selección positivos-negativos.

### Terapia génica

Pueden usarse enfoques de terapia génica de acuerdo con la presente invención para prevenir o tratar cáncer. La terapia génica se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable.

Puede usarse cualquiera de los procedimientos para terapia génica disponibles en la técnica de acuerdo con la presente invención. Se ha demostrado el uso eficaz a largo plazo de un vector de terapia génica para aliviar la enfermedad en mamíferos grandes. Por ejemplo, la administración de un virus adenoasociado ("AAV") que contenía un gen de tipo silvestre a perros que padecían amaurosis congénita de Leber, una afección que da como resultado ceguera debido a una mutación de un gen (RPE65) en el epitelio pigmentario retinal, ha corregido con éxito el defecto genético (Ackland y col., 2001, *Nature Genetics* 28: 92). La expresión del gen RPE65 de tipo silvestre se confirmó por RT PCR. Además, se demostró la restauración de la función mediante estudios electrofisiológicos de la retina, así como observaciones imparciales de los animales tratados. Se mostró que el tratamiento era eficaz durante al menos cuatro meses.

También se ha demostrado que la terapia génica es útil en el tratamiento de una complicación de la diabetes. Ya está en ensayos clínicos la terapia génica con VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) de angiogénesis terapéutica funcional y otras proteínas para tratar enfermedades poligénicas y complejas tales como isquemia miocárdica, hipertensión, aterosclerosis y reestenosis (Pachori AS y col, *Gene therapy: role in myocardial protection. Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):335-50). Además, se mostró que los plásmidos que expresaban VEGF tenían eficacia en un estudio de fase III en comparación con suministro intramuscular de ANG1 con placebo en pacientes diabéticos con isquemia de las extremidades críticas que se llevó a cabo en trece pacientes (Kusumanto y col., *Molecular Therapy* 3: S73).

También se ha usado de forma exitosa terapia génica para tratar un trastorno hereditario del cromosoma X, concretamente inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y enfermedad granulomatosa crónica (CGD), como se revisa en Blaese RM, *Immunol Res.* 2007; 38(1-3): 274-84.

Además, recientes estudios han mostrado que p53 puede expresarse de forma exitosa y terapéutica en tejidos normales y malignos (Fischer U, Janssen K, Schulze-Osthoff K, *BioDrugs.* 2007; 21 (5): 273-97).

En consecuencia, pueden usarse enfoques de terapia génica que utilizan los vectores, que comprenden un polinucleótido heterólogo unido operativamente a más de una secuencia reguladora de la transcripción, para prevenir o tratar cáncer y enfermedades hiperproliferativas.

Puede suministrarse un vector *in vivo* (es decir, directamente a un sujeto). Puede inyectarse un vector directamente en el tejido diana o sitio de derivación celular. Puede introducirse un vector en el tejido diana como un implante, tal como, por ejemplo, en una formulación polimérica (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.702.717). Puede dirigirse un vector a las células o tejidos deseados.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* (es decir, terapia génica *in vivo*) pueden incluir transfección con construcciones virales o no virales, tales como adenovirus, lentivirus, virus del Herpes simple I o virus adenoasociado (AAV) y sistemas basados en lípidos.

El vector puede inyectarse directamente en un tejido diana como ADN desnudo. Puede introducirse un vector de forma intracelular usando bombardeo de micropartículas, por ejemplo, usando una pistola génica de Biolística (DuPont). Puede suministrarse ADN plasmídico con la ayuda de, por ejemplo, polímeros catiónicos, liposomas catiónicos (por ejemplo lipofectina, derivados de colesterol tales como D.D.A.B. y fosfolípidos catiónicos) o conjugados de polilisina derivatizados (por ejemplo, conjugados con anticuerpos), gramicidina S, envolturas virales artificiales u otros vehículos intracelulares tales, así como inyección directa de la construcción génica desnuda,

electroporación o precipitación de CaPO<sub>4</sub> llevada a cabo *in vivo* así como sistemas de suministro génico no virales basados en polietilenimina. Las revisiones sobre sistemas de transferencia y expresión de ácidos nucleicos para terapia génica de cáncer incluyen Lungwitz (2005) Eur. J. Pharm. Biopharm. 60 (2): 247-66; Aigner (2006) J. Biotechnol. 254: 12-25; Christopher y Wong (2006) Curr. Pharm. Des. 1995-2006; y Wolff (2005) Acta Myol. 24: 202-8.

#### 5 **Medición de la expresión de genes en células tumorales**

Puede determinarse la expresión dirigida por H19, P3 de IGF-II y P4 de IGF-II en tumores y líneas celulares, por ejemplo, usando las técnicas de análisis de ARN, hibridación *in situ* o construcciones de genes indicadores. Además, las células tumorales con expresión génica de IGF-1 activada pueden determinarse de forma similar y 10 marcase como objetivo en terapia génica usando el promotor de IGF-1 para dirigir la expresión de un polinucleótido heterólogico.

15 Para la mayoría de las aplicaciones de análisis de ARN, puede prepararse una sonda marcada que hibride específicamente con el transcripto génico de interés usando cualquier variedad de técnicas bien conocidas en este campo. La sonda marcada puede contener al menos 15-30 bases complementarias de la secuencia de nucleótidos H19, y más preferentemente pueden contener al menos de 50 a 100 bases complementarias del transcripto de H19. Una sonda de hibridación particularmente preferida para la expresión de H19 puede ser un polinucleótido complementario del extremo 3' del mensaje de H19 desde aproximadamente 800 pares de bases cadena arriba del sitio de poli A hasta el sitio de poli A.

20 Puede generarse una sonda de ARN antisentido marcada *in vitro* usando un plásmido de expresión T7 o T3. Las sondas de H19 también pueden marcase mediante uso de cebadores aleatorios en presencia de nucleótidos marcados, por ejemplo, usando el kit Prime-It (Stratagene™, La Jolla, Calif; N° de Catálogo 300392). Como alternativa, pueden generarse sondas marcadas en una reacción de PCR usando un clon de ADNc de la región codificante de H19 y cebadores diseñados para amplificar una región de la región codificante, o mediante una reacción de traslación de hueco convencional.

25 Los marcadores apropiados para sondas polinucleotídicas incluyen nucleótidos que incorporan isótopos radiactivos (tales como <sup>35</sup>S y <sup>32</sup>P), marcadores fluorescentes, luminiscentes y de color, y restos enzimáticos.

30 La sonda marcada puede hibridarse *in situ* con una muestra celular o tisular usando técnicas convencionales tales como se describen en la patente de Estados Unidos 5.955.273, incorporada en el presente documento por referencia. Como alternativa, si puede obtenerse una cantidad suficiente de las células apropiadas, se puede realizar análisis de ARN convencional (análisis de Northern, protección de RNasa o extensión de cebadores) para 35 determinar el nivel de expresión de ARNm del gen de interés.

35 Adicionalmente, dichos ensayos de expresión génica pueden realizarse “*in situ*”, es decir, directamente sobre secciones tisulares (fijadas y/o congeladas) de tejido del paciente obtenido de biopsias o resecciones, de modo que pueda no ser necesaria ninguna purificación de ácidos nucleicos. Pueden usarse reactivos de ácidos nucleicos tales como los descritos anteriormente como sondas y/o cebadores para tales procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuovo, 1992, “PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications,” Raven Press, NY).

40 Un procedimiento alternativo para determinar si un tipo celular o un tumor serán capaz de activar específicamente las construcciones de expresión que contienen las secuencias reguladoras de la transcripción particulares ligadas operativamente a un polinucleótido heterólogo puede ser transfectar de hecho dichas construcciones de expresión en la célula. Para estos fines, el polinucleótido heterólogo puede ser preferentemente un producto génico marcador. Un resultado positivo en un ensayo para el producto génico marcador revela que la célula o línea celular puede ser 45 capaz de activar la expresión de las secuencias reguladoras de la transcripción.

45 Además, también pueden usarse diversos procedimientos de amplificación, que sean suficientemente sensibles para detectar cantidades mínimas de ARN, para determinar si el tumor puede expresar H19 y/o IGF-II. Tales procedimientos incluyen, PCR, RT-PCR y PCR *in situ* (refiriéndose todas las anteriores también a PCR “anidada” y RT-PCR anidada), LCR (reacción en cadena de la ligasa) y 3SR (replicación de secuencia autosostenida). Pueden usarse RT-PCR y RT-PCR anidada. Los productos de amplificación se identifican por procedimientos usados en este campo tales como por separación en un gel.

#### 50 **Composiciones y kits farmacéuticos**

50 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprenda una construcción de ácido nucleico, y opcionalmente uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

55 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifiquen una proteína de gen citotóxico, en la que una secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y otra secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II; y ii) un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

5 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de gen citotóxico, en la que una secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II y otra secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II; y ii) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene al menos dos secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de gen citotóxico, en las que una secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y otra secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; y ii) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II; y ii) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

20 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; y ii) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

25 Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende i) una construcción de ácido nucleico que contiene un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II; y ii) un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19.

30 35 La toxina diftérica puede ser toxina diftérica A (DTA). Dicha toxina diftérica puede comprender una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 7.

30 La secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de SEC ID N: 1-2.

40 La secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID Nº: 9.

40 La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 17.

45 Dicha construcción de ácido nucleico puede ser un plásmido o un vector de expresión eucariota.

45 Las construcciones pueden proporcionarse en envases en una forma lista para administración. Las construcciones pueden proporcionarse en forma concentrada en envases, opcionalmente con el diluyente requerido para realizar la solución o las soluciones finales para administración. El producto puede contener un compuesto útil en la invención en forma sólida y, opcionalmente, un recipiente separado con un disolvente o vehículo adecuado para el compuesto útil en la invención.

50 Los envases/kits anteriores pueden incluir otros componentes, por ejemplo, instrucciones para dilución, mezcla y/o administración del producto, otros recipientes, jeringas, agujas, etc. Otros de tales componentes del envase/kit resultarán evidentes para un experto en la materia.

Los kits pueden comprender además instrucciones para administrar dicha construcción de ácido nucleico a un sujeto aquejado de cáncer, particularmente con un tumor caracterizado por expresión de ARN de H19 y/o expresión de IGF-II del promotor P3 y/o P4 en al menos en una parte de las células del tumor, como se detalla en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento, por ejemplo una construcción que codifica una molécula de DTA, con otros componentes tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

10 En lo sucesivo en el presente documento, las frases "vehículo terapéuticamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse de forma intercambiable, se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Como se usa en el presente documento, un "vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable" puede referirse a un material auxiliar secundario o a diversas mezclas y combinaciones de dichos ingredientes terapéuticamente inertes.

15 En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes particularmente adecuados para administrar agentes de ácidos nucleicos incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

20 Una composición terapéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "vehículo" se refiere a cualquier sustancia adecuada como un vehículo para suministrar un agente terapéutico, por ejemplo una molécula de ácido nucleico, a un sitio *in vivo* o *in vitro* adecuado. Como tales, los vehículos pueden actuar como un excipiente farmacéuticamente aceptable de una composición terapéutica que contenga una molécula de ácido nucleico. Los vehículos preferidos particularmente adecuados para administrar agentes de ácido nucleico son capaces de mantener una molécula de ácido nucleico en una forma que, tras la llegada de la molécula de ácido nucleico a una célula, la molécula de ácido nucleico sea capaz de entrar en la célula y expresarse por la célula. Los vehículos pueden incluir: (1) excipientes o formularios que transportan, pero no dirigen específicamente una molécula de ácido nucleico a una célula (denominados en el presente documento vehículos no directores); y (2) excipientes o formularios que suministran una molécula de ácido nucleico a un sitio específico en un sujeto o una célula específica (es decir, vehículos de dirección). Los ejemplos de vehículos no directores incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución de Hank, otras soluciones fisiológicamente equilibradas acuosas, aceites, ésteres y glicoles. Los vehículos acuosos pueden contener sustancias adyuvantes adecuadas requeridas para aproximar las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, potenciando la estabilidad química e isotonicidad.

25

30

35

40

45

50

55

60

Las sustancias adyuvantes adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris y tampón de bicarbonato. Las sustancias adyuvantes también pueden incluir conservantes, tales como timerosal, m y o-cresol, formalina y alcohol benzol. Las sustancias adyuvantes preferidas para suministro de aerosoles incluyen sustancias tensioactivas no tóxicas para un sujeto, por ejemplo, ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de aproximadamente seis a aproximadamente veintidós átomos de carbono. Los ejemplos de ésteres incluyen ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico. Otros vehículos pueden incluir partículas metálicas (por ejemplo, partículas de oro) para su uso con, por ejemplo, una pistola de biolística a través de la piel. Las composiciones terapéuticas pueden esterilizarse por procedimientos convencionales.

Los vehículos de dirección se denominan en el presente documento "vehículos de suministro". Los vehículos de suministro son capaces de suministrar una composición terapéutica a un sitio diana en un sujeto. Un "sitio diana" se refiere a un sitio en un sujeto en el que se desea suministrar una composición terapéutica. Los ejemplos de vehículos de suministro particularmente adecuados para administrar agentes de ácido nucleico incluyen vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales y naturales. Los vehículos de suministro que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de suministro que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Un vehículo de suministro puede modificarse para dirigirse a un sitio particular en un sujeto, dirigiendo y haciendo uso de este modo de una molécula de ácido nucleico en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la parte lipídica del vehículo de suministro y/o introducir en el vehículo un compuesto capaz de dirigir específicamente un vehículo de suministro a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo celular preferido. La dirección específica se refiere a provocar que un vehículo de suministro se una a una célula particular mediante la interacción del compuesto en el vehículo con una molécula de la superficie de la célula. Los compuestos de dirección adecuados incluyen ligandos capaces de unirse selectivamente (es decir, específicamente) a otra molécula en un sitio particular. Los ejemplos de tales ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos de receptores. Por ejemplo, puede introducirse un anticuerpo específico para un antígeno hallado en la superficie de una célula diana en la superficie exterior de un vehículo de suministro liposómico para dirigir el vehículo de suministro a la célula diana. La manipulación de la fórmula química de la parte

lipídica del vehículo de suministro puede modular la dirección extracelular o intracelular del vehículo de suministro. Por ejemplo, puede añadirse un compuesto químico a la fórmula lipídica de un liposoma que altere la carga de la bicapa lipídica del liposoma de modo que el liposoma se fusione con células particulares que tienen características de carga particulares.

5 Un vehículo de suministro particularmente adecuado para administrar agentes de ácido nucleico puede ser un liposoma. Un liposoma puede ser capaz de permanecer estable en un sujeto durante una cantidad de tiempo suficiente para suministrar una molécula de ácido nucleico en un sitio preferido en el sujeto. Un liposoma puede ser preferentemente estable en el sujeto en el que se ha administrado durante al menos aproximadamente 30 minutos, más preferentemente durante al menos aproximadamente 1 hora y aún más preferentemente durante al menos 10 aproximadamente 24 horas.

Un liposoma puede comprender una composición lipídica que pueda ser capaz de dirigir una molécula de ácido nucleico a un sitio particular, o seleccionado, en un sujeto.

15 Los liposomas adecuados para su uso con la presente invención incluyen cualquier liposoma. Los liposomas preferidos incluyen los liposomas usados convencionalmente en, por ejemplo, procedimientos de suministro de genes conocidos por los expertos en la materia. Los liposomas más preferidos comprenden liposomas que pueden tener una composición lipídica poliacetónica y/o liposomas que tienen una cadena principal de colesterol conjugada con polietilenglicol.

20 Preferentemente la composición farmacéutica también puede incluir un agente de transfección tal como DOTMA, DOPE y DC-Chol (Tonkinson y col., 1996). Un ejemplo preferido de un agente de transfección puede ser poli(etilamina) (PEI).

Otros agentes particularmente adecuados para administrar agentes de ácido nucleico que pueden usarse son, por ejemplo, lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros. Como alternativa, puede administrarse ADN desnudo.

#### **Uso terapéutico**

25 En otro aspecto, la invención puede proporcionar el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que dicho sujeto está aquejado de un tumor caracterizado por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4, al menos en una parte de las células del tumor.

30 Puede usarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico para inhibir la progresión tumoral en un sujeto que lo necesite, en el que dicho sujeto está aquejado de un tumor caracterizado por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4, en al menos una parte de las células del tumor.

Puede usarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico para inhibir o prevenir la metástasis tumoral en un sujeto que lo necesite, en el que el tumor puede estar caracterizado por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4, en al menos una parte de las células del tumor.

35 Puede proporcionarse un uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico para reducir o aliviar síntomas asociados con un trastorno neoplásico en un sujeto que lo necesite, en el que el sujeto puede estar aquejado de un tumor caracterizado por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4, en al menos una parte de las células del tumor.

40 La construcción de ácido nucleico puede contener un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II. Una célula de dicho tumor puede ser capaz de expresar un transcripto dirigido por el promotor de H19 y/o un transcripto dirigido por el promotor P4 de IGF-II. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercero marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercero marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

45 La construcción de ácido nucleico puede contener un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

50 Una célula de dicho tumor puede ser capaz de expresar un transcripto dirigido por el promotor de H19 y/o un transcripto dirigido por el promotor P3 de IGF-II. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercero marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercero marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

55 La construcción de ácido nucleico puede contener un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la

transcripción P3 de IGF-II, y un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II. Una célula de dicho tumor puede ser capaz de expresar un transcríto dirigido por el promotor P3 de IGF-II y/o un transcríto dirigido por el promotor P4 de IGF-II. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19.

5 La toxina diftérica puede ser toxina diftérica A (DTA). Dicha toxina diftérica puede comprender una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 7.

10 La secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en una cualquiera de SEC ID N: 1-2.

La secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEC ID Nº: 9.

La secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II puede ser un promotor que comprende una secuencia de ácido nucleico como se expone en una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 17.

15 Puede usarse una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico para aumentar la sensibilidad de un sujeto a un agente terapéutico.

Como se usa en el presente documento, "tratar" cáncer (o tratar a un sujeto con cáncer) se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo pero sin limitación, alivio o mejora de uno o más 20 síntomas de cáncer, reducción del alcance de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio, paliación o estabilización de la patología, remisión parcial o completa, supervivencia prolongada y otros resultados beneficiosos conocidos en la técnica.

El sujeto puede ser humano.

25 Son tumores que pueden tratarse de acuerdo con el uso los que pueden expresar ARN de H19 y/o pueden expresar IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4 durante la aparición o progresión tumoral. Una célula de un tumor diana de un uso puede expresar de forma endógena un transcríto dirigido por el promotor de H19 (por ejemplo un transcríto de H19) y un transcríto dirigido por el promotor P3 de IGF-II (por ejemplo un transcríto de IGF-II). Una célula del tumor diana puede expresar de forma endógena un transcríto dirigido por el promotor de H19 y un transcríto dirigido por el promotor P4 de IGF-II (por ejemplo un transcríto de IGF-II). Una célula del tumor diana puede expresar de forma 30 endógena un transcríto dirigido por el promotor P3 de IGF-II y un transcríto dirigido por el promotor P4 de IGF-II. El tumor diana puede ser un tumor que pueda expresar de forma endógena el transcríto de IGF-II dirigido por P3, transcríto de IGF-II dirigido por P4 y transcríto de H19. El tumor diana puede expresar de forma endógena al menos dos de los transcritos dirigidos por P3 de IGF-II, P4 de IGF-II y H19.

Puede haberse genotipado el tumor diana con respecto a expresión de H19 y/o expresión de IGF-II bajo el control del promotor P3 o P4, o ambos. Como alternativa, el tumor diana puede no haberse genotipado.

35 Por ejemplo el tumor puede seleccionarse de tumor de Wilm, hepatoblastoma, rhabdiosarcoma embrionario, tumores de células germinales y tumores trofoblásticos, tumores de células germinales testiculares, seminoma testicular, teratoma, teratoma inmaduro de ovario, tumor sacrococcígeo, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos de sitio placentario, carcinoma de vejiga, carcinoma hepatocelular, carcinoma de ovario, carcinoma cervical, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello, carcinoma esofágico, 40 carcinoma tiroideo, tumores neurogénicos, astrocitoma, ganglioblastoma, neuroblastoma, osteosarcoma, melanoma, carcinoma pancreático, cáncer de próstata, cáncer de útero, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal, cáncer de colon, meduloblastoma, glioblastoma, tumores adrenocorticales, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfoblástica aguda (ALL), cánceres de cabeza y cuello, 45 cánceres orales, tumores trofoblásticos gestacionales, meningioma y hepatoma. El tumor puede seleccionarse de cánceres de cabeza y cuello, cánceres orales y tumores trofoblásticos gestacionales.

El sujeto puede estar aquejado de síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), teniendo de este modo una predisposición a desarrollar un tumor asociado con H19 y/o IGF-II tal como tumor de Wilm o hepatoblastoma.

50 El tumor diana puede ser un tumor sólido. El tumor diana puede ser un carcinoma. El tumor puede ser un cáncer de vejiga (por ejemplo carcinoma de vejiga), cáncer de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular), cáncer de ovario (por ejemplo carcinoma de células claras), cáncer pancreático (por ejemplo carcinoma ductal pancreático, carcinoma epitelioide).

55 El tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en un carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de ovario y un carcinoma pancreático. El tumor diana puede ser un carcinoma de vejiga. El tumor diana puede ser un carcinoma hepatocelular. El tumor diana puede ser un carcinoma de colon. El tumor diana puede ser un cáncer de vejiga superficial. El tumor diana puede ser un carcinoma cervical. El tumor diana puede ser un

carcina de pulmón. El tumor diana puede ser un adenocarcinoma de pulmón. El tumor diana puede ser un carcinoma de pulmón de células pequeñas. El tumor diana puede ser un carcinoma de mama. El tumor diana puede ser un carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello. El tumor diana puede ser un carcinoma de células renales. El tumor diana puede ser un carcinoma esofágico. El tumor diana puede ser un cáncer pancreático. El tumor diana puede ser un hepatoblastoma. El tumor diana puede ser un rhabdomiosarcoma. El tumor diana puede ser un carcinoma tiroideo. El tumor diana puede ser un ganglioblastoma. El tumor diana puede ser un carcinoma de ovario. El tumor diana puede ser un carcinoma broncogénico de células escamosas. El tumor diana puede ser una neoplasia de hígado. El tumor diana puede ser un carcinoma colorrectal. El tumor diana puede ser un carcinoma endometrial. El tumor diana puede ser un tumor testicular. El tumor diana puede ser un tumor de células germinales testiculares. El tumor diana puede ser un carcinoma broncogénico de células escamosas. El tumor diana puede ser un cáncer de próstata. El tumor diana puede ser tumor de Wilm. El tumor diana puede ser un astrocitoma. El tumor diana puede ser un neuroblastoma.

La enfermedad diana de un uso puede ser un trastorno proliferativo celular en el que al menos algunas de las células son capaces de expresar un transcripto bajo el control del promotor de H19 y/o el promotor P4 de IGF-II. La enfermedad diana puede ser un trastorno proliferativo celular en el que al menos algunas de las células son capaces de expresar un transcripto bajo el control del promotor de H19 y/o el promotor P3 de IGF-II. La enfermedad diana puede ser un trastorno proliferativo celular en el que al menos algunas de las células son capaces de expresar un transcripto bajo el control del promotor P4 de IGF-II y/o el promotor P3 de IGF-II.

Los usos pueden comprender además una etapa de detectar la presencia de ARN de H19 y/o ARN de IGF-II en células tumorales obtenidas del sujeto, en la que la presencia del ARN en al menos una parte de las células tumorales es indicativa de que dicho tumor es tratable por los usos. Por ejemplo, la presencia de ARN de H19 y/o ARN de IGF-II puede detectarse por procedimientos conocidos en la técnica tales como PCR, RT-PCR, PCR *in situ*, RT-PCR *in situ*, LCR y 3SR, e hibridación con una sonda que comprende un resto detectable. La presencia de un ARN puede determinarse en una muestra celular o tisular derivada del tumor o, como alternativa, en muestras de ensayo que contienen células de fluidos corporales, fluidos de aclarado que estuvieron en contacto con el sitio de tumor primario, o tejidos u órganos distintos del sitio de tumor primario tisular (por ejemplo para detectar metástasis tumorales).

Los tumores metastatizantes ejemplares incluyen, por ejemplo, cáncer colorrectal que metastatiza al hígado y cáncer de mama metastatizante. Las construcciones pueden usarse para prevenir o inhibir la formación de metástasis de hígado.

Para tratar a un sujeto con una enfermedad, pueden administrarse composiciones farmacéuticas al sujeto de una manera eficaz de modo que las composiciones sean capaces de tratar la enfermedad de ese sujeto. De acuerdo con la presente invención, el tratamiento de una enfermedad se refiere a aliviar una enfermedad y/o síntomas asociados y/o prevenir el desarrollo de una enfermedad secundaria resultante de la aparición de una enfermedad primaria.

Por lo tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" a la que se hace referencia en el presente documento significa que las construcciones de ácido nucleico se administran al sujeto en una cantidad que puede ser eficaz cuando se administra a dicho sujeto, para tratar a ese sujeto.

Un protocolo de administración eficaz (es decir, administrar una composición farmacéutica de una manera eficaz) puede comprender parámetros de dosis adecuados y modos de administración que dan como resultado el tratamiento de una enfermedad. Los parámetros de dosis y modos de administración eficaces pueden determinarse usando procedimientos convencionales en la técnica para una enfermedad particular. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, determinación de tasas de supervivencia, efectos secundarios (es decir, toxicidad) y progresión o regresión de enfermedad.

Un tamaño de dosis única adecuado puede ser una dosis que sea capaz de tratar a un sujeto con enfermedad cuando se administra una o más veces durante un periodo de tiempo adecuado. Por ejemplo, un tamaño de dosis única adecuado puede inducir una reducción de la masa de células tumorales en un sujeto que lo necesite. Pueden usarse dosis de una composición farmacéutica adecuada para su uso con técnicas de inyección directa por un experto en la materia para determinar tamaños de dosis única apropiados para administración sistémica basándose en el tamaño de un sujeto.

Las vías adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir suministro oral, rectal, transmucoso, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, intraarteriales, intravesiculares (en la vejiga) o intraoculares.

Como alternativa, se puede administrar una preparación de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente a una región específica del cuerpo de un paciente o mediante administración directa en una cavidad corporal tal como la vejiga, útero, etc. Puede contemplarse la administración intralesional, por ejemplo inyección intratumoral.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicos, glicerina, propilenglicol (u otros disolventes sintéticos), agentes antibacterianos (por ejemplo, alcohol bencílico, metilparabenos), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, bisulfito sódico), agentes quelantes (por ejemplo, ácido etilendiamintetracético), tampones (por ejemplo, acetatos, citratos, fosfatos), y agentes que ajustan la tonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, dextrosa). El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico, por ejemplo. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a las composiciones sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor pretendido. Tales composiciones pueden comprender también agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Tales composiciones deberían comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector y/u otro agente terapéutico, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración apropiada al sujeto. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

Las composiciones pueden usarse para tratar cáncer solas o con otros regímenes terapéuticos establecidos o experimentales contra el cáncer. Los usos terapéuticos para tratamiento de cáncer adecuados para combinación con la presente invención incluyen quimioterapia, radioterapia, fototerapia y terapia fotodinámica, cirugía, terapia nutricional, terapia ablativa, radioterapia y quimioterapia combinadas, braquiterapia, terapia de haz de protones, inmunoterapia, terapia celular y terapia radioquirúrgica de haz de fotones.

Los fármacos antineoplásicos que pueden coadministrarse con las construcciones pueden incluir los siguientes: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adriamicina; adozelesina; aldesleuquina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; acetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbétimo; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambugilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbacina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguamina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorrubicina; clorhidrato de doxorrubicina; droloxfeno; citrato de droloxfeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolide; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprolol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazina; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; taxol; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofuirina; tirapazamina; clorhidrato de topotecán; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelin; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; y clorhidrato de zorubicina. Los agentes antineoplásicos adicionales incluyen los desvelados en el Capítulo 52, "Agentes Antineoplásicos" (Calabresi, P. y Chabner, B. A.), y la introducción al mismo, pp. 1202-1263, de Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Octava Edición, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division).

Los siguientes ejemplos se presentan en orden para ilustrar más completamente algunas realizaciones de la invención. No debería interpretarse de ninguna manera, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

#### Sección de detalles experimentales

60 Visión de conjunto de vectores de múltiples promotores

Se crearon vectores de expresión de promotor doble, que portaban en una única construcción dos genes separados que expresaban la toxina DTA, a partir de dos secuencias reguladoras diferentes, como sigue:

- promotores de H19 + P4 de IGF-II (en lo sucesivo en el presente documento “H19-DTA-P4-DTA”; representado en la Figura 1);
- promotores P3 de IGF-II + P4 de IGF-II (en lo sucesivo en el presente documento “P4-DTA-P3-DTA”; descrito posteriormente); y
- promotores de H19 + P3 de IGF-II; (en lo sucesivo en el presente documento “H19-DTA-P3-DTA”; descrito posteriormente).

## Transfecciones

10 Se realizaron transfecciones usando el reactivo de transfección *in vitro* jetPEI™ (Polyplus Transfection) como lo recomienda el fabricante. Después de 48 horas, las células se recogieron y se determinó la actividad luciferasa usando el kit de Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega). Se midió la producción de luz usando un aparato Lumac Biocounter. Se determinó el contenido proteico total de los lisados mediante el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad, y los resultados se normalizaron para la proteína total y se expresaron como unidades de luz/μg de proteína. Se usó un plásmido que expresa luciferasa bajo el control de transcripción de SV40, LucSV40 (Promega) como un control positivo para la eficacia de transfección, ya que contiene el promotor y potenciador de SV40, mientras que se usó un plásmido que contenía Luc1 pero carecía de secuencias reguladoras (Promega) como un control negativo para determinar la expresión de luciferasa no específica basal (esta fue insignificante en todas las líneas celulares). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

20 Creación de H19-DTA-P4-DTA

El casete de DTA sintético y casete de P4 sintético se ensamblaron cada uno a partir de productos de PCR y se subclonaron en pGA4 (ampR, disponible de GeneArt, Ratisbona, Alemania) usando sitios de restricción SacI y KpnI. Se purificó el ADN plasmídico (Pure Yield™ Plasmid Midiprep, Promega) de bacterias K12 XL10 gold transformadas y se determinó la concentración por espectroscopía UV. Las construcciones finales se verificaron por secuenciación y se nombraron 0704870 (SEC ID Nº: 21) y 0704867 (SEC ID Nº: 23), respectivamente. La congruencia de secuencia fue del 100 %.

El promotor P4 que se utilizó tuvo la siguiente secuencia:

acttcccggtcggtctgtgggtgcaggggtgccgcacatgtgtgattcgjgcctgcggccctggcctccgggtg  
cgggtggcggggccaggatggagaggggcccggatggcaggagtcatggcagacgccacatcgacatctccccacacc  
ccctctggctctgtcccaacattccaaacaggagatcccggagagggggagagggggctgctggctgaggctaagaaggcaga  
gccttcgacccggagagaggccggcccccgtcccagatggcagcgjggaagttccatacaaggaggtggaaaggagaccccc  
cccccccttcactgcccgtcagagatgagccgggggtgcaggatggagccatggcacttcgctacggatggtccagggctc  
ccgggtgggggtgcaggagagaagagactggctggagggagggagggcggagcaaaaggcgcggggagtggtcagcag  
ggagaggggtgggggttagggtgagccggctggagggagtggtcacaataaaagctgaggcactgaccgcctgcaaa  
ctggacattagcttcctgtgaaagagacttcagcttccttccttccttcctgcggccagcggcccttgctg  
tgttaggggatctctagagtgc (SEC ID N°: 9)

30 A continuación, se creó un vector que expresaba DTA a partir del promotor P4 de IGF-II. Para crear este vector, la secuencia de DTA se amplificó a partir de 0704870 y se subclonó en 0704867 usando sitios de restricción NheI y KpnI. El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias K12 KH10B transformadas y la concentración se determinó por espectroscopía UV. La construcción final (0704877) se verificó por secuenciación. La congruencia de secuencia fue del 100 %.

35 Para crear el vector H19-DTA-P4-DTA, el casete P4-DTA se amplificó a partir de 0704877, y se subclonó en 052966, un vector que expresa DTA a partir del promotor de H19, usando sitios de restricción NotI y KpnI. 052966 se denomina en lo sucesivo en el presente documento “H19-DTA” y tiene la siguiente secuencia:

ggtaccgacaaccctcaccaaggccaaggtggtaccgacggacccacagcggggggctggctggggagtcgaaactc  
gccagtcactccactcccaaccgtggtgcacgcgggctggagagtctgtgaggccgcaccgcctgtcagtagagtgc  
gcccgcgagccgtaagcacagccggcaacatcggtctcagacaggaaagtggccgcgaatggaccgggggtgcaccggc  
tgtggggactctgtccctgaaaaaccgg  
gcccaccagggggtttgcggcacttccctctgcccctcagcaccccccacccctactctccaggaacgtgagttctgagccgtgatggtg  
gcaggaagggggccctctgccccatccgagttcccccagggaccgcagctggcccccagccatgtgcaaaagtatgtcagggcgcgt  
gcaggcaggcaggcaggcatggtgcgggagacagtggctgggagggagaagtccctggaccctgagggaggtga  
tggggcaatgctcagccctgtctccggatgccaaggagggggtgcggggaggccgtcttggagaattccaggatgggtgcgggt  
agagagacgtgtgctggaaactgtccaggcggagggtggccctgcggggggccctcgggagggccctgctgattggccggcagg  
gcagggggccggaaatctggggccggccaccccaagttaaaaagcccccggctaggaccgaggcagggtgagggagaagctt  
ggcattccggactgttggtaaagccaccatggatcctgtatgtttgttgcgggggggggggggggggggggggggggggggg  
gggactaaacctggttatgttagattccattcaaaaaggatataaaaagccaaaatctgttacacaaggaaattatgacgatgtggaaa  
gggtttatagtagccgacaataatacgcgtcgggataactctgttagataatgaaaaccgcctctggaaaagctggaggcgtgg  
caaagtgcgtatccaggactgcgaagggtctcgactaaaagtggataatgcggaaactattaagaaagagtttagtttaagtctcac



aatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattaacgctacaatttgccattgccattcaggctgcgcaactgtgg  
gaagggcgatcggtgcgggccttcgcattacgcagccaaagctaccatgataagtaatattaaggtaacgggagggtacttgg  
agcggccgcaataaaatatcttatttcattacatctgtgtgtgtgtgaatcgatagtactaacatacgctctccatcaa  
aacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtgcaggtgccagaacattctatcgata (SEC ID Nº: 16)

El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias K12 KH10B transformadas y la concentración se determinó por espectroscopía UV. La construcción final se verificó por secuenciación. La congruencia de secuencia era del 100 %.

La secuencia de H19-DTA-P4-DTA fue:

ccctcaccaagggccaagggtggtgaccgacggacccacagcggggtggtggctggggagtcgaaactcgccagtcctccac  
tccactcccaaccgtggtgcggcacgcggcctggagagtcgtgaggccgcaccgttgtcagtagatgtgcgcggcggcc  
gtaagcacagccggcaacatgcggcttcagacaggaaagtggccgcgaatggaccgggtgcccagcggctgtggggactct  
gtcctgcggaaaccgcgggtgacgagcacaagctcggtcaactggatggaatcgccctggggctggcaccgcgcaccagg  
gggttgcggcactccctctgcccctcagcacccacccctactctccaggaacgtgagttctgagccgtatggcaggaggg  
gcctctgtgccatcccgagtccccagggacccgcagctggcccccagccatgtcacaagtatgtcagggcgctggcaggcagg  
agcagcaggcatggtgtccctgagggagacagtggctgggagggagaagtccctggaccctgagggagggtatgggcaatgc  
tcagccctgtccggatgccaaaggaggggtgcggggaggccgtttggagaattccaggatgggtctggtagagagacgt  
gtgctggaactgtccaggcgagggtggccctgcggggggccctcgggaggccctgcgtctgattggccggcagggcagggc  
ggaatccctggcggggccaccccagttagaaaaagccggctaggaccgaggcagggtgagggagaagctggcattccgg  
tactgttgtaaagccaccatggatcctgtatgttgttgcattctaaatcttgcattttgtatggaaaactttctcgatcc  
ctgggtatgttagattccattcaaaaaggatatacaaagccaaaatctgtacacaaggaaattatgacgtatggaaaagggttt  
accgacaataatacgacgcgtgcgggalactctgttagataatggaaaacccgcctctggaaaagctggaggcgtggca  
actgtacgtatccggatataactgggacaggcggaaagcgttaagcgttagaacttgagatattttggaaaacccgtgg  
aagatgcgtatgttagatatggctcaagcctgtgcaggaaatctgtcaggcgtatcttgcattttgtgaaagg  
taattggacaaactacctacagagattttgggatcccttagagtcggggcggccggcctcgagcagacatgata  
gagtttgtgacaaaccacaactagaatgcgtgaaaaaatgtttttgtgaaattttgtatgtcatttgcattttgt  
caataacaagtaacaacaacaattgcatttcattttatgtttcagggtcagggggagggtgtggagggtttta  
caaatgtggtaaaatcgataaggatccgtcgaccgtgccttgcggcggccgttgcattttgtgaaatcc  
gactatcgccgcacttgcgttgcggcggcgggtatcactcaaaaggcgttaatcgggtatcc  
tcgtgcgtcggtcggtcgccggcggcgggtatcactcaaaaggcgttaatcgggtatcc  
cacaatcgggtatcc



## Creación P4-DTA-P3-DTA

La construcción P4-DTA-P3-DTA se creó usando una estrategia muy similar a la usada para crear la construcción de H19-DTA-P4-DTA. La construcción final se verificó por secuenciación. La congruencia de secuencia fue del 100 %. El promotor P3 de IFG-II tenía la siguiente secuencia:

ggccatgcaggtaggatttgagctgtgttccgcctgtatccctctcctctggcggccggagcctccgtaggctccaagc  
ctggccagattcgccggcgccggccctccgcgtccgcacccatgggggtccgggtccggccggcaccgggg  
gctcggtatctggctaggctccaaggccgcgtggccgtccctgtggggcaggtggcggctgcgcgccccccggag  
cccaggggcccccctagccgcaacaaccagaaggaccccccgaetcagccccaaagccacctgcatctgactcagacggg  
caccggcagtgcagctccgtggggcgctggagccgcgtggccgtggccggagaccccaagctcacgagcacaggcc  
ggccggcaccaggaaacccggatggggccctgaattctctaggacggcattcagcatggcctggcgtctggcgtccctg  
ccccccacccagcctcgccccccgcgcaccccccagccctgcgaccgcgcgggggggggggggggggggggggg  
caccggccgccttggctcggttgcggggggccggccggggccggggccggggccggggccggggccgggg  
cgcgaggccagcgccccccgcgcggccctggccgcggctggcgcactataagagccggcgtggcccccgcagttgcctg  
ctctccggcgagctcggtgaggccggccggccggccggccggccctccggccggcccccgcctggcccaacgcctggcc  
ctctggccaccagcgccatcggtcaaggccggccggcgtcgac (SEC ID N°: 17).

P4-DTA-P3-DTA tenía la siguiente secuencia:

gcggccgcaataaaaatcttatttcattacatctgtgttgttttgtgaatcgatagactaacatacgtctccatcaa  
aacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcgaagtgcaggtgccagaacattctatcgataactccgg  
tcggctgtgggtgcagggggtgcgcctcacatgtgtattcgtgcctgcggccctggccgggtgcggtaacgaggag



tttgtgaaggAACCTTACTCTGTGGTGTGACATAATGGACAAACTACCTACAGAGATTGGGATCCTAGAGTCGGGCGGCCGGC  
CGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACTGGACAAACCAACTAGAATGCACTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTGT  
GATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAATTGCTTATGTTTCAGGTTCAGGGGAGGT  
GTGGGAGGTTTTAAAGCAAGTAAACCTTACAAATGTGGTAAATCGATAAGGATCGTCGACCGATGCCCTGAGAGCCTCAACC  
CAGTCAGCTCCTCCGGTGGCGCGGGCATGACTATCGTCGCCACTTATGACTGCTTCTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGC  
CGGCAGCGCTTCGGCTTCCTCGCTACTGACTCGCTCGCTCGTCGGCTGCCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGGT  
AAACGGTTATCCACAGAACATCAGGGATAACGCAAGGAAGAACATGAGGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAG  
GCCGCGTTGCGTGGCGTTTCATAGGCTTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGA  
CAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTCCCGTGAAGCTCCCTCGTCGCTCTCGTACGGTACAGGTTCTCGTCCAGCTGGCTGT  
CTTCTCCCTCGGAAGCGTGGCGTTCTCATAGCTCACGCTGTTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGTCCAGCTGGCTGT  
GTGACGAACCCCCCGTCAAGCCGACCGCTGCCCTAACCGTAACIATGCTTGAAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATGCC  
ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGGGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGC  
TACACTAGAACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGTAAGGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTGGTAGCTCTGATCCGGCAAACAAA  
CCACCGCTGGTAGGGTGGTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGAGAAAAAAAGGATCTCAAGAACATCCTTGTCTTCTACG  
GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACACTCACGTTAAGGGATTGGTCAAGGATTACGGAGGACTTACCTAGATCTTAAARTA  
AAAATGAAGTTAAATCAALCTAAAGTATATGAGTTAACACTGGTCTGACAGTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATT  
ATTCAATCAGGATTATCAATACCATAATTGAAAAAGCCGTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGACTTCCATAGGATGGCAA  
GATCCTGGTATCGGTCTCGATTCCGACTCGTCCAAACATCAAAACCTATAATTCCCTCGTCAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAA  
TCACCAAGGACTGACGACTGAATCCGGTGGAGAATGGCAAAAGTTATGCTTCCAGACTGTTCAACAGGCCAGGCTACGCTGT  
CATCAAAATCATCGCATCAACCAACCGTTATTCATCGTGTATCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAGGACAAT  
TACAAACAGGAATCGAACCGGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAAATTTCACCTGAATCAGGATAATTCTAAACCT  
GGAATGCTGTTCCGGGGATCGCAGTGGTAGGATTACCATGATCATCAGGAGTACGGATAAAAGCTTGAAGTGGTGGAGAGGCA  
AATTCCGTAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGAAACATATTGCAACGCTACCTTGCCTGTTCAAGAAACACTGGCGCATCG  
GGCTTCCCATACATCGATAGATTGTCGACCTGATTGCCGACATTATCGCAGGCCATTACCCATATAATCAGCATCCATGTTGA  
ATTAAATCGGGCTAGAGCAAGACGTTCCGGTTGAATATGGCTCATACTCTCCCTTCAATATTGAAAGCATTATCAGGGTATTGTCT  
CATGAGGGATACTATTGAAATGTTAGAAAAAAACAAATAGGGTTCCGGCACATTCCCGAAAAGTGGCAGGCCACTGACGCGCC  
CTGAGCGCGCATTAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTACGCGCAGCGTACACTGCCAGCGCCACTGCTTCCGTTAGGGTTCGATTAGTGETTAC  
GGCACCTCGACCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTACGCTAGGGCAGGCCCTGATAGACGGTTTGCCTTGCCTGACGTTGG  
AGTCACGTTAAATAGTGGACTCTGTTCCAACACTGGAACAAACACTCAACCTATCTGGTCTATTCTTGTATTAAAGGGATTGGCC  
ATTCCGGCTATTGGTTAAAAAAATGAGCCTGATTAAACAAATTAACGCGAATTAAACAAATATTACGCTTACAATTGGCATTGCGCATT  
CAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATGGCGGGCCTTCGCTTACGCCAGCCAAAGCTACCATGATAAGTAAGTAATATTAA  
AGGTAACGGGAGGTACTTGA (SEC ID N°: 24).

P3-DTA, que expresa DTA bajo el promotor P3 solamente, tenía la siguiente secuencia:

tcagtgaaacgaaaactcacgttaagggattttgtcatgagattatcaaaaaggatcttcaccttagatccctttaaaataaaaatgaagtttt  
aaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagtttagaaaaactcatcgagcatcaaactgcaatttattcatatcagga  
ttatcaataccatattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatctgtatc  
ggctgcatccgactcgtccaacatcaatacacaaccttataatttccctgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtg  
acgactgaatccggatggcaaaagttatgcatttcitccagacttgtcaacagggccattacgctgtatcaaaaatca  
cgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcgtgagcgagacgaaatacgcgatcgtttaaaaggacaattacaaacaggaa  
tcgaatgcaacccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatatttccctgaatcaggatattcttaataacctggaatgttttc  
ccggggatcgcatgtggtagtaaccatgcattcatcaggatcggataaaatgcgtatggcgaaagaggcataaattccgtcagcc  
agtttagtgcaccatctcatctgtaaacatcatggcaacgcacccatttgcgtttagaaacaactctggcgatcggccattccataca  
atcgatagatttgcgcacccgttgcgcacattatcgcgagccatttacccatataaaatcagcatccatgttggaaatttaatcgccgc  
ctagagcaagacgtttccctgtaaatggctcataactttccctttcaatattattgaagcatttacgggtattgtctcatgagccgata  
catatttgaatgttttagaaaaataaacaatagggttcccgccacatttccctgaaatgtgcacccctgacgcgcctgttagccgc  
attaagcgcggcgggttgggttacgcgcagcgtgaccgcacacttgcgcagcgccttagcgcgcctgtcccttgcgttcccttc  
tttctgcacgttgcggcttccctgtcaagctaaatggggctccctttagggttccgatttagtgccttacggcacctcgacc  
ccaaaaaaactgtatttagggtaggttgcgttacgttagtggccatgcgcctgttagacggtttgcgccttgcgttggagtcacgtt  
aatagtggactctgtccaaactggaaacaacactcaaccctatctcggttatttttgcgttataaggatttgcgcattcggctattt  
gtttaaaaatgagctgtttaaacaaaatttaacgcgaattttaaacaaaatattacgcgttacaatttgcgcattcggcttgcgttgc  
ctgttggaaaggcgatcgggtgcggcccttcgttattacgcgcagccaaagctaccatgataagtaagtaatattaaaggatcggagg  
tacttggagcggccgcaataaaatctttattttcattacatctgtgttgggttttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
aaacaaaacgaaacaaaacaaacttagcaaaaataggctgtccccagtgcaagtgcaggtgccagaacatttctatcgataggatcc  
aca (SEC ID N°: 19).

P4-DTA, un plásmido que expresa DTA bajo el promotor P4, se creó reemplazando el promotor P3 con el promotor P4 (SEC ID Nº: 9).

Además, se creó una construcción de control, P4-Luc-P3-Luc, usando la misma estrategia. La secuencia de P4-Luc-P3-Luc es como sigue:

gcccagtgggcagcgtggaagttccataacaaggaggtggaaaggagaccccccccccttactgcctgtgcagagatgagcc  
 ggggggtgcaggatgggagccatggcacttcgtacggatggccagggtcccggtgggggtgcaggagagaagagactggc  
 tgggaggagggagagggcgggagcaaaggcgccccggagtggtcagcagggagaggggtgggggttagggtagggcccg  
 gctgggaggagtcggctcacacataaaagctgaggcactgaccagcctgcaaaactggacattagttctccctgaaaagagacttca  
 gcttccctccctcccttccctccctccctgccccagcgagcctctgtagggatcttagactcggttagccat  
 tccggtaactgtggtaaaggcaccatggaagacgccaacataagaaaggccggccattctatccgttgcggatggacc  
 gctggagagcaactgcataaggctatgaagagatacgcctggcccttgcggatggaccatgtttacagatgcacatatcgaggtaggacat  
 cacttacgtgacttgcggatgtccgtcggtggcagaagactatgaaacgatatggctgaatacacaatcacaatcgctgtatg  
 cagtggaaaactcttcaattttatgcccgtgtggcgcttgcggatgtgcggatgtgcggcccgacacattataatgaac  
 tgaattgtcaacagtatggcatttcgcagcctaccgtgggttcgttccaaaaagggttgcaaaaaatttgcggatggcaaaaaaag  
 ctcccaatcatccaaaaatttattatcatggattctaaaacggattaccaggatgtcgtacatgttgcggatctcatcttac  
 ccggtttaatgaatacgtttgtccagactccctcgataggacaagacaattgcactgtatgcggatcttgcggatct  
 cctaaagggtgcgtcgcatagaactgcctgcgtgagattctcgcatgcggatcttgcggatcttgcggatcttgcggat  
 tgcgattttaatgtgttccattccatcacggtttggatgtttactacactcggtatgtgatatgtggatttgcggatcttgcggat  
 tttgaagaagagctgttgcggatccatcacggatgttgcggatccatcacggatgttgcggatccatcacggat  
 cactctgattgacaaatacgatttatctaatttacacgaaattgcgttgcggatccatcacggatgttgcggatccatcacggat  
 gtggatccatcgccaggatcaggcaaggatggctactgagactacatcagcttgcgttgcggatccatcacggat  
 ccggcgccgtcggtaaagggttccattttgcggatccatcacggatgttgcggatccatcacggat  
 cggactgtgtgagaggcctatgattatgtccggatgttgcggatccatcacggatccatcacggat  
 acattctggagacatagctactggacgaagacgaacacttgcgttgcggatccatcacggat  
 gtggatccatcacggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 tgaacttcccgccgcgttgcggatccatcacggatccatcacggat  
 ccggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 tggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 cacctagccccccgcgtccggatccatcacggatccatcacggat  
 ctccctcgatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 cgactcagcccccaagccacccatcgactcagacggccgcaccc  
 tgccctgcctgcggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 taggacggcaitcagcatggccttgcgttgcggatccatcacggat  
 gaccggccggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 gggggcgccggatccatcacggatccatcacggatccatcacggat  
 gcgcaactataagagccggatccatcacggatccatcacggat



## Creación de H19-CTA-P3-CTA

La construcción H19-DTA-P3-DTA se creó usando una estrategia muy similar a la usada para crear la construcción H19/P4. La construcción final se verificó por secuenciación. La congruencia de secuencia fue del 100 %.

5 H19-DTA-P3-DTA tenía la siguiente secuencia:

ccctcaccaaggccaaagggtggtacccgacggacccacagcggggctggggggactcgaaactcgccagtcac  
tccactcccaaccgtggtccccacgcgggcctggagagactgtgaggccgcaccgttgcagtagagtgcgcggcggcc  
gtaaggcacagcccgcaacatgcggcttcagacagggaaagtggccgcgaatgggaccgggtgcccagcggctgtggggactct  
gtcctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagactcggtcaactggatggaatcgccctgggggctggcaccgcgcaccagg  
gggttgcggcacttcctctgcctcctcagcaccccacccactctccaggaacgtgagttctgagccgtatggcaggaggg  
gcctctgtgccatccgagtcggcagggacccgcagctggcccccagccatgtgcaaagtatgtcagggcgtggcaggcagg  
agcagcaggcatggtgtccctcgagggagacagtggtctggagggagaagtctggaccctgagggaggtatggggcaatgc  
tcagccctgtctccggatgccaaaggaggggtgcggggaggccgtttggagaattccaggatgggtctgggtgagagagacgt  
gtgctggaaactgtccagggcggaggtggccctgcggggccctcgggagggccctgtctgattggccggcagggcagggcgc



ataaacaataggggatccgcgcacattccccaaaagtgcacactgacgcgcctgtacggcgcattaagcgccgggggtgg  
 tggttacgcgcagcgtgaccgcatacttgcgcagcgccctagcgccccgtcccttcgttttccttccttcgtccacgttcgcgg  
 ctccccgtcaagctcaaattcggggctccctttagggttccgatttagtgccttacggcacctcgacccaaaaacttgattagggt  
 atggttcacgttagtggccatgcgcctgatagacggtttcgccttgcgttgagtcacgttttaatagtgactctgtccaaa  
 ctggacaacaactcaaccctatcggcataatcttgcattataagggtttccgatitccgttttttttttttttttttttttttttt  
 caaaaatttaacgcgaatttaacaaaatattacgcattacaatttgcatttcgcattcaggctgcacactgttggaaggcgatcggt  
 gcccccttcgtattacgcagccaaagctaccatgataagtaagtaatattaaaggtaacgggaggtacttggagcggccgcaataa  
 aatatt  
 aacttagcaaaataggctgtcccaagtgcaagtgcagggtccagaacatttcgtatcgcatactcgaggccatgcaggttaggattgag  
 ctggtttccgccttgcatttcgccttcgcggccggagccctccgtaggctccaagccctggccagattcggcggcgcagccggc  
 ctccgcgcgtccgcacccatgcggggctccggggctccggcggcaccggggggcgtcggatctggctaggctccagg  
 cccgcgtggccggctccctcgtggggcagggtggcggctgcgcgcccccccggccagggccccctcagccgcaacaacc  
 agcaaggaccccccgcactcagcccaagccacccatgcacttcgcactcagacggggcgcacccgcagtgcagcccttggggc  
 ctgggagccgcctgccttgcctggccggagaccccgactcactcagcggcccttgcgcgtccctgcggccggagctgcgtgaggcc  
 cccctgaatttcgttaggacggcattcagcatggcccttggcgtctgcgcgtccctgcggccggagctgcgtgaggcc  
 cccctgcgaccgc  
 gcggggggggggccggggggcgagggctccgcggccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 ctggggccgcggctggcgcactataagagccggcggtggccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 cccggccccggccccccccctccggccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 agggggccccggcgactcagacaagcttagctacgcgtggcattccggtaactgttggtaaagccaccatggatcctgtatgttggatt  
 ctctaaatctttgtatggaaaacttttcgttgcattaccacggactaaacctggttatgttagattccattcaaaaaggatataaaaagg  
 atctgttacacaaggaaattatgacgtatggaaagggtttatgttagtaccgacaataatcgcgtgcgggactctgtatgtataat  
 gaaaacccgcctcgtggaaaagctggaggcggtggccaaagtgcgtatccaggactgcacggatctgcactaaaaggatggataatg  
 ccgaaaactattaaagaaagagttaggttaagtctcactgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt  
 atgggtgcgtcgcgttagtgcgtcgccttcgcgtggggagttcgtgtgtatataactggaaacaggcgaaagcggt  
 aagcgttagaacttggatataatttggaaacccgtggaaaacgtggccaaagatgcgtatgtatgtatgtatgtatgtatgt  
 atcgtgtcaggcgatttgtgaaggaacctacatcgtgggtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgtgcgt  
 acgttaggtaccgacaa (SEC ID N°: 18).

Además, se creó una construcción de control, H19-Luc-P3-Luc, usando la misma estrategia. La secuencia de H19-Luc-P3-Luc es como sigue:

gacaaccctaccaaggccaaagggtggtgaccgcggaccacagcggggtggctggggagtcgaaactcgccagtctccactc  
 cactcccaaccgtggtgcccccacgcggggctggagagtctgtgaggcccccaccgcgttgcgttagagtgcccccgcgagccgt  
 aagcacagccggcaacatgcggtctcagacaggaaagtggccgcgaatggaccgggtgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc

cctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagctggtaactggatggaatggcctggggggctggcaccgcgcaccagggg  
 gtttgcggcaactccctctgccccctcagcaccccccactctccaggaacgtgagttctgagccgtgatggtggcaggaaggggc  
 cctctgtgcacccatccgagtcggcagggacccgcagctggcccccagccatgtcaaagtatgtgcagggcgtgcaggcaggag  
 cagcaggcatggtgccctgaggggagacagtggctgggagggagaagtcctggccctgagggagggtatggggcaatgtca  
 gcccgtctccggatgcacccaggaggggtgcggggaggccgtcttggagaattccaggatgggtctgggtgagagagacgtgt  
 ctggaaactgtccaggggggagggtggccctgccccctggggggccctgggaggggccctgtctgtatggccggcaggcaggggcgg  
 attctggccggccaccccaagttagaaaaagcccggttaggaccgaggagcagggtgagggaaagcttggcattccggtaactgtt  
 ggtaaagccaccaatggaaagacgcacaaaacataaagaaaggccggccattctatccgttggaaagatggaaaccgtggagac  
 aactgcataaggctatgaagagatacgccttggatggaaacaattgtttacagatgcacatatcgaggtggacatcactacgctga  
 gtacttcgaaatgtccgttggcagaagctatgaaacgatatggctgaatacaatcagaatcgtcgatgcagtgaaaactc  
 tctcaattttatgcgggttggcgcgttattatcgagttgcagtgtgcggccgcgaacgcattataatgaacgtgaattgtca  
 cagtagggcatttcgcagccctaccgtgggttcggccaaaaagggttgcaaaaaaatttgaacgtgcaaaaaaagctcccaatcatc  
 caaaaaattattatcatggattctaaaacggattaccaggatttcagtcgttgcacacgttgcgttgcacatctcatctacccgg  
 aatacgattttgtccagagtccctcgataggacaagacaatgcactgtcatgaactccctgttactgttgcctaaagggtgt  
 gctctgcctcatagaactgcctgcgtgagatttcgcgttgcggccatccattttggcaatcaaattccggatactgcgtttaagt  
 gtttccattccatcagggtttggatgttactacactcggtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 ctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 caaatacgatttatctaatttacacgaaattgttctggcgctccctctcaaggaaatgtggggaaagcggttgcgttgcgttgc  
 ctgcaggatcaggcaaggatatggctcaactgagactacatcagtttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 tcggtaaagtgtccattttgaagcgaagggttggatctggatccggaaaacgcgtggcgtaatcaaaggcgaactgtgtgt  
 gagaggccatgttgcgggtatgttaaacaatccggaaagcgaacacttcatcggttgcaccgcctgttgcgttgcgttgcgttgc  
 catagttactggacgaagacgaacacttcatcggttgcaccgcctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 gaattggaaatccatctgtccaaacaccccaacatctgcacgcagggtgtcgccagggttccgcacgtgacgcgggtgaacttcc  
 cgccgttgttgttgtggagcacggaaagacgtacggaaaagagatcgtggattacgtcgccaggtaactacaaccgcga  
 gttgcgcggagggttgttgtggacgaagtaccgaaaggcttaccggaaaactcgacgcaggtaactacaaccgcga  
 aaggccaaagggcgaaagatcgcgtgtaaattctagatgcggggcgccggccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 gagtttgtgacaaaccacaactagaatgcagtgtaaaaatgttttgtgtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 caataacaactaaacaacaattgcattttatgtttcagggttgcggggagggtgtggggagggttttaaagcaagtaaaacc  
 caatgtggtaaaatcgataaggatccgtcgaccgtacgccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 gactatcgtcgcgcacttgcacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 tcgtcgctcggtcggtcggtcggtcggtcggtatcgctactcaaaggcggtaatcgggtatccacagaatcaggggataac  
 cggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggtaaaaaggccgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
 cccctgacgagcatcacaatcgacgtcaagtcaaggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccc



**Ejemplo 1: Actividad anti-carcinoma de vejiga superior por una construcción única que contiene genes de DTA expresados por separado a partir de los promotores de H19 y P4**

En primer lugar, se ensayó el efecto terapéutico antineoplásico de la construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA *in vitro* determinando su capacidad para lisar tres líneas de carcinoma de vejiga humano diferentes, en relación con las construcciones de promotor único. La actividad antitumoral se determinó por medición de la inhibición de la actividad luciferasa después de cotransfección con LucSV40. Se cotransfectaron las líneas celulares de cáncer de vejiga T24P, Umuc3 y HT-1376 con H19-DTA, P4-DTA, o H19-DTA-P4-DTA a las concentraciones indicadas y 2 µg de LucSV40. Se determinó la actividad luciferasa como un indicador de la supervivencia de las células transfectadas y se comparó con la de células transfectadas con LucSV40 solamente. H19-DTA y P4-DTA fueron capaces de dirigir la expresión del gen de DTA y reducir de este modo la actividad luciferasa de una manera de respuesta a dosis. H19-DTA-P4-DTA, sin embargo, mostró una eficacia muy superior en la lisis de las líneas celulares de cáncer, en relación con cada una de las construcciones del promotor único, en células T24P (Figuras 2A-C). Se obtuvieron resultados muy similares cuando el experimento se repitió con células UMUC3 (Figuras 3A-C) y HT-1376 (Figuras 4A-B).

Por lo tanto, un vector de expresión de DTA, que portaba en la misma construcción dos genes separados que expresaban la toxina DTA a partir de H19 y P4, mostró capacidad significativamente superior para lisar diversas líneas celulares de cáncer de vejiga humanas, en relación con vectores de expresión que portaban un de los genes solo.

**Ejemplo 2: Actividad anti-carcinoma de hígado superior por una construcción única que contiene genes de DTA expresados por separado a partir de promotores de H19 y P4**

Se ensayó el efecto terapéutico antineoplásico de las construcciones descritas en el Ejemplo 1 *in vitro* en células de cáncer de hígado humano Hep3B (carcinoma hepatocelular). Como se ha visto con las líneas celulares de carcinoma de vejiga, la construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA mostró eficacia muy superior en la lisis de líneas celulares cancerosas, en relación con cada una de las construcciones de promotor único (Figuras 4A-B).

Por lo tanto, los vectores de expresión de doble promotor H19-DTA-P4-DTA muestran capacidad significativamente superior para lisar células de carcinoma de hígado, en relación con cada gen solo.

**Ejemplo 3: Actividad anti-carcinoma de ovario superior por una construcción única que contiene genes de DTA expresados por separado a partir de promotores de H19 y P4**

Se ensayó el efecto terapéutico antineoplásico de las construcciones descritas en el Ejemplo 1 *in vitro* en células de cáncer de ovario humano ES-2 (carcinoma de células claras). Como se ha visto con las líneas celulares de carcinoma de vejiga, la construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA mostró eficacia muy superior en la lisis de líneas celulares de cáncer, en relación con cada una de las construcciones de promotor único (Figuras 5A-B).

Por lo tanto, los vectores de expresión de doble promotor H19-DTA-P4-DTA muestran capacidad significativamente superior para lisar células de carcinoma de ovario, en relación con cada gen solo.

**Ejemplo 4: Actividad anti-carcinoma pancreático superior por una construcción única que contiene genes de DTA expresados por separado a partir de los promotores de H19 y P4**

Se ensayó el efecto terapéutico antineoplásico de las construcciones descritas en el Ejemplo 1 *in vitro* en células de cáncer pancreático de hámster PC-1 (carcinoma ductal pancreático) y cáncer pancreático humano CRL-1469 (carcinoma epitelioide). Como se ha visto con las líneas celulares de carcinoma de vejiga, la construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA mostró eficacia muy superior en la lisis de las líneas celulares de cáncer pancreático de hámster (Figura 6A-B) y humano (Figura 7A-B), en relación con cada una de las construcciones de promotor único.

Por lo tanto, los vectores de expresión de doble promotor H19-DTA-P4-DTA muestran capacidad significativamente superior para lisar células de carcinoma pancreático, en relación con cada gen solo.

En general, los vectores de expresión H19-DTA-P4-DTA mostraron sistemáticamente capacidad superior cuando se ensayaron frente a un espectro amplio de células tumorales, en relación con los vectores de expresión que portan uno de los genes solo. La uniformidad de estos resultados a través de cada una de estas líneas celulares de cáncer demuestra la capacidad superior de las construcciones H19-DTA-P4-DTA contra cáncer en general.

**Ejemplo 5: Actividad superior por una construcción única que contiene genes de DTA dirigidos por P3 y P4 separados frente a seis tipos de carcinoma diferentes**

A continuación, se ensayó la actividad de la construcción de expresión de doble promotor, que expresa DTA a partir de los promotores P3 de IGF-II y P4 de IGF-II, P4-DTA-P3-DTA, frente a dos líneas celulares de carcinoma de vejiga humano diferentes (T24P y HT-1376), en comparación con las construcciones de promotor único correspondientes.

Las células se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y P3-DTA, P4-DTA o P4-DTA-P3-DTA a las concentraciones indicadas en las figuras. Se determinó la actividad luciferasa y se comparó con la de las células transfectadas con LucSV40 solamente. P3-DTA y P4-DTA fueron capaces de dirigir la expresión del gen de DTA y reducir de este modo la actividad luciferasa de una manera de respuesta a dosis en ambas líneas celulares. La construcción de doble promotor P4-DTA-P3-DTA sin embargo, mostró eficacia superior en la lisis de las líneas celulares cancerosas, en relación con cada una de las construcciones de promotor único, en células T24P (Figuras 8A-B) y células HT-1376 (Figuras 9A-B). Se obtuvieron resultados muy similares también en células de carcinoma de hígado humano Hep3B (Figuras 10A-B). Se obtuvieron resultados muy similares también en células de carcinoma de ovario humano ES-2 (Figuras 11A-B). Se obtuvieron resultados muy similares también en células de carcinoma pancreático de hámster PC-1 (Figuras 12A-B) y células de carcinoma pancreático humano CRL-1469 (Figuras 13A-B).

Por lo tanto, los vectores de expresión de DTA, que portaban en la misma construcción dos genes separados que expresaban la toxina DTA a partir de los promotores P3 de IGF-II y P4 de IGF-II, mostraron sistemáticamente capacidad significativamente superior cuando se ensayaron frente a seis líneas celulares de cáncer diferentes, en relación con vectores de expresión que portaban uno de los genes solo. La uniformidad de estos resultados a través de un amplio espectro de células tumorales demuestra la capacidad superior de las construcciones P4-DTA-P3-DTA frente a cánceres en general.

**Ejemplo 6: Actividad superior por una construcción única que contiene genes de DTA dirigidos por H19 y P3 separados frente a células de carcinoma de vejiga**

A continuación, se ensayó la capacidad de la construcción de expresión de doble promotor, H19-DTA-P3-DTA frente a las líneas celulares de carcinoma de vejiga humana T24P, en comparación con las construcciones de promotor

único correspondientes.

Se ensayó el efecto terapéutico de las construcciones *in vitro* determinando su capacidad para lisar líneas celulares de cáncer de vejiga humana, como se determinó por cotransfección con LucSV40 y medición de inhibición de la actividad luciferasa. La línea celular de cáncer de vejiga humana T24P se cotransfectó con 2 µg de LucSV40 y H19-  
5 DTA, P3-DTA o H19-DTA-P3-DTA a las concentraciones indicadas en las figuras. La actividad luciferasa se determinó y se comparó con la de las células transfectadas con LucSV40 solamente. H19-DTA y P3-DTA fueron capaces de dirigir la expresión del gen de DTA y reducir de este modo la actividad luciferasa de una manera de respuesta a dosis en las tres líneas celulares. La construcción de doble promotor H19-DTA-P3-DTA, sin embargo, mostró eficacia superior en la lisis de las líneas celulares de cáncer, en relación con cada una de las construcciones de promotor único (Figuras 14A-B).

Por lo tanto, los vectores de expresión de DTA, que portaban en la misma construcción dos genes separados que expresaban la toxina DTA a partir de los promotores de H19 y P3 de IGF-II, mostraron capacidad significativamente superior cuando se ensayaron frente a células de carcinoma de vejiga, en relación con los vectores de expresión que portaban cada gen solo.

**15 Ejemplo 7: Los genes de DTA expresados por separado a partir de los promotores de H19 y P4 muestran actividad antineoplásica mayor que la aditiva cuando están presentes en una construcción única**

A continuación, se ensayó la presencia de efecto antineoplásico mayor que el aditivo de la construcción de doble promotor H19-P4-DTA en líneas celulares de cáncer de vejiga humana T24P y HT-1376, la línea celular de cáncer de ovario humano ES-2, la línea celular de cáncer de hígado humano Hep3B, la línea celular pancreática de hámster PC-1 y la línea celular pancreática humana CRL-1469. T24P, ES-2, Hep3B, PC-1 y CRL-1469 se cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y (a) las concentraciones indicadas en las figuras de las construcciones de promotor único H19-DTA + P4-DTA en combinación, o (b) la misma cantidad de H19-DTA-P4-DTA que para una de las construcciones de promotor único. La cantidad total de ADN cotransfectado en las muestras que recibieron ambas construcciones de promotor único fue por lo tanto dos veces la de las células transfectadas con H19-DTA-P4-DTA. 20 La actividad luciferasa se determinó y se comparó con la de células transfectadas con LucSV40 solo. La construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA mostró eficacia superior en la lisis de líneas celulares de cáncer, en relación con la actividad combinada de ambas construcciones de promotor único (H19-DTA + P4-DTA), en células T24P (Figuras 15A-B). Se obtuvieron resultados muy similares en células cancerosas de hígado humano Hep3B (Figuras 16A-B), células de cáncer de ovario humano ES-2 (Figuras 17A-B), células pancreáticas de hámster PC-1 (Figuras 18A-B), células de cáncer pancreático humano CRL-1469 (Figuras 19A-B) y células HT-1376 (Figura 23A-B).

Por lo tanto, los genes que codificaban DTA dirigidos por P4 de IGF-II y dirigidos por H19 presentes en un vector de expresión único mostraron actividad antineoplásica mayor que la aditiva en relación con los vectores de expresión que portaban cada gen solo cuando se ensayaron frente a un amplio espectro de células tumorales. La uniformidad de estos resultados a través de cada una de estas líneas celulares de cáncer demuestra la capacidad superior de las construcciones de H19/P4 frente a cáncer en general.

**35 Ejemplo 8: Los genes de DTA expresados por separado a partir de los promotores P3 y P4 muestran actividad antineoplásica mayor que la aditiva cuando están presentes en una construcción sencilla**

A continuación, se ensayó la presencia de efecto antineoplásico mayor que el aditivo de los plásmidos de doble promotor P4-DTA-P3-DTA en células HT-1376, ES-2, Hep3B, PC-1 y CRL-1469, exactamente como se ha descrito en el ejemplo anterior. La construcción de doble promotor P4-DTA-P3-DTA mostró eficacia superior en la lisis de líneas celulares cancerosas, en relación con la actividad combinada de ambas construcciones de promotor único (P3-DTA + P4-DTA), en células HT-1376 (Figuras 20A-B). Se obtuvieron resultados muy similares en células ES-2 (Figuras 21A-B), células Hep3B (Figura 22) y células CRL-1469 (Figuras 24A-B).

40 Por lo tanto, los genes que codificaban DTA dirigidos por P4 de IGF-II y dirigidos por P3 de IGF-II presentes en un vector de expresión único mostraron actividad antineoplásica mayor que la aditiva en relación con vectores de expresión que portaban uno de los genes solo cuando se ensayaron frente a un amplio espectro de células tumorales. La uniformidad de estos resultados en cada una de estas líneas celulares demuestra la capacidad superior de las construcciones P3-DTA-P4-DTA frente a cáncer en general.

**45 Ejemplo 9: Modelo animal de carcinoma de vejiga**

***El modelo heterotópico para tumores de vejiga subcutáneos***

50 Se inyectaron por vía subcutánea  $2 \times 10^6$  células de carcinoma de vejiga humana T24P o  $3 \times 10^6$  HT-1376 en solución salina tamponada con fosfato en los dorsos de ratones hembra desnudos de 6-7 semanas de edad para establecer tumores de vejiga heterotópicos. 10 días después de la inoculación, aparecieron tumores medibles que se trataron con los vectores de expresión H19-DTA-P4-DTA, P4-DTA-P3-DTA y H19-DTA-P3-DTA.

### **Tratamiento de los tumores subcutáneos heterotópicos**

Los animales se separaron en grupos del mismo tamaño (n=6). Se administraron 3 inyecciones de 25 µg/tumor de los vectores de expresión (P4-DTA-P3-DTA, H19-DTA-P4-DTA, o H19-DTA-P3-DTA respectivamente) o el vector de control (P4-Luc-P3-Luc, H19-Luc-P4-Luc, o H19-Luc-P3-Luc respectivamente) a cada tumor. En cada punto

5 temporal, se midieron las dimensiones del tumor usando un calibrador, y se calculó el volumen tumoral de acuerdo con la fórmula de anchura<sup>2</sup> x longitud x 0,5. Los animales se sacrificaron 3 días después de la última inyección, se escindieron los tumores y se midieron el peso y el volumen *ex vivo*.

**Ejemplo 10: La construcción H19-DTA-P4-DTA muestra actividad antineoplásica mayor que la aditiva en varios modelos de cáncer de vejiga *in vivo***

10 **Resultados T24P**

Se ensayó la actividad terapéutica antineoplásica de H19-DTA-P4-DTA en un modelo de cáncer de vejiga *in vivo*. Se inyectaron por vía subcutánea células de carcinoma de vejiga humana T24P en los dorsos de ratones hembra atípicos para realizar un modelo de cáncer de vejiga heterotópico. 10 días después, los ratones desarrollaron tumores heterotópicos medibles. La potencia terapéutica de los vectores se ensayó administrando directamente 3 inyecciones de 25 µg/tumor de los vectores de expresión o el vector de control (H19-Luc, P4-Luc y H19-Luc-P4-Luc, que expresan luciferasa bajo el promotor de H19, promotor P4 o ambos promotores, respectivamente) en cada tumor de cáncer de vejiga heterotópico. Se determinó el tamaño del tumor y se calculó el aumento en veces *in vivo* del tamaño del tumor al final de cada tratamiento.

20 Tres inyecciones de H19-DTA (Figura 25) y P4-DTA (Figura 26) a intervalos de dos días fueron capaces de inhibir el desarrollo del tumor en al menos el 49 % y el 57 %, respectivamente en comparación con tratamiento con H19-Luc y P4-Luc, respectivamente. Sin embargo, tres inyecciones del plásmido de doble promotor H19-DTA-P4-DTA a intervalos de dos días inhibieron el desarrollo del tumor en al menos el 70 %, en comparación con el tratamiento con H19-Luc-P4-Luc (Figura 27). La construcción de doble promotor mostró por lo tanto capacidad potenciada para inhibir el desarrollo tumoral *in vivo*, en comparación con cada una de las construcciones de promotor único (H19-DTA y P4-DTA).

25 Para confirmar la diferencia entre los grupos de H19-DTA-P4-DTA y H19-Luc-P4-Luc, se escindieron tumores y se determinó su peso y volumen *ex vivo*. Los ratones tratados con H19-DTA-P4-DTA mostraron al menos una reducción del 61 % del volumen tumoral *ex-vivo* (Figura 28) y al menos una reducción del 54 % de peso tumoral *ex-vivo* (Figura 29) en comparación con el tratamiento con H19-Luc-P4-Luc.

30 Para ensayar si la actividad antineoplásica *in vivo* de H19-DTA-P4-DTA era mayor que la aditiva, se trató a un grupo adicional de ratones que contenían tumor T24P con tres inyecciones de 25 µg cada una de construcciones del promotor único H19-DTA + P4-DTA en combinación. La cantidad total de ADN cotransfектado administrada fue por lo tanto dos veces la del grupo de H19-DTA-P4-DTA. Como puede verse en la Figura 30, el desarrollo tumoral en ratones que recibieron plásmidos tanto H19-DTA como P4-DTA se inhibió en el 63 % en comparación con ratones tratados con H19-Luc + P4-Luc combinado. Se observó un efecto potenciado en los ratones tratados con la construcción de doble promotor H19-DTA-P4-DTA, en la que el desarrollo tumoral se inhibió en 70 % en comparación con los ratones tratados con el plásmido de control H19-Luc-P4-Luc (Figura 27). Por lo tanto, el vector H19-DTA-P4-DTA mostró actividad antineoplásica mayor que la aditiva *in vivo*.

40 La Figura 31 resume todos los datos del modelo de cáncer de vejiga T24P. H19-DTA-P4-DTA muestra claramente actividad superior a cada uno de los plásmidos promotores únicos solos y también superior a su actividad combinada.

**Resultados de HT-1376**

Se ensayó la capacidad terapéutica de H19-DTA-P4-DTA en otro modelo de cáncer de vejiga, HT-1376. Se realizaron experimentos como se describe para el modelo T24P. Se administró a los ratones que contenían tumores HT-1376 25 µg de cada uno de H19-DTA y P4-DTA en combinación o 25 µg de H19-DTA-P4-DTA. La administración de H19-DTA y P4-DTA en combinación inhibió el desarrollo tumoral en al menos el 64,5 % en comparación con tumores tratados con H19-Luc + P4-Luc combinado (Figura 32), mientras que H19-DTA-P4-DTA inhibió el desarrollo tumoral en al menos el 67 % en comparación con tratamiento con H19-Luc-P4-Luc (Figura 33). Por lo tanto, H19-DTA-P4-DTA mostró actividad antitumoral potenciada, en comparación con la actividad combinada de las construcciones de promotor único.

**Ejemplo 11: La construcción P4-DTA-P3-DTA muestra actividad antineoplásica mayor que la aditiva en un modelo de cáncer de vejiga *in vivo***

A continuación, se ensayó la actividad terapéutica antineoplásica de P4-DTA-P3-DTA en el modelo de cáncer de vejiga *in vivo* T24P descrito anteriormente en el presente documento en los Ejemplos 9-10. Se realizaron experimentos como se ha descrito anteriormente.

5 Tres inyecciones de P3-DTA a intervalos de dos días fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral en al menos el 50,5 % en comparación con tratamiento con P3-Luc (Figura 34), mientras que P4-DTA administrado de la misma manera inhibió el crecimiento tumoral en al menos el 57 % en comparación con el tratamiento con P4-Luc (Figura 35). Por el contrario, 3 inyecciones del plásmido de doble promotor P4-DTA-P3-DTA a intervalos de dos días  
10 inhibieron el desarrollo tumoral en al menos el 70 % en comparación con el tratamiento con P3-Luc/P4-Luc (Figura 36). Por lo tanto, P4-DTA-P3-DTA mostró actividad antitumoral potenciada, en comparación con cada una de las construcciones de promotor único (P3-DTA y P4-DTA).

15 Para ensayar si la actividad antineoplásica *in vivo* de P4-DTA-P3-DTA fue mayor que la aditiva, se trató a un grupo adicional de ratones que contenían tumor T24P con 3 inyecciones de 25 µg cada una de construcciones de promotor único P3-DTA + P4-DTA en combinación. La cantidad total de ADN cotransfектado administrado fue por lo tanto dos veces la del grupo de P4-DTA-P3-DTA. El desarrollo tumoral se inhibió en al menos el 63,3 % en comparación con tratamiento con P3-Luc + P4-Luc combinado (Figura 37), una cantidad menor del 70 % de la observada con el tratamiento con P4-DTA-P3-DTA (Figura 36). Por lo tanto, el vector P4-DTA-P3-DTA muestra actividad antineoplásica mayor que la aditiva *in vivo*.

20 **15 Ejemplo 12: Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* por vectores de expresión H19-DTA-P3-DTA**

25 A continuación, se ensayó la actividad terapéutica antineoplásica del plásmido de doble promotor H19-DTA-P3-DTA en el modelo de cáncer de vejiga *in vivo* T24P descrito anteriormente en el presente documento en los Ejemplos 9-10. Se realizaron experimentos como se ha descrito anteriormente.

30 Tres inyecciones de H19-DTA a intervalos de dos días fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral en al menos el 49 % en comparación con tratamiento con H19-Luc (Figura 25), y P3-DTA administrado de la misma manera inhibió el crecimiento tumoral en al menos el 50,5 % en comparación con el tratamiento con P3-Luc (Figura 38). Por el contrario, 3 inyecciones de H19-DTA-P3-DTA a intervalos de dos días inhibieron el desarrollo tumoral en al menos el 59 % en comparación con el tratamiento con H19-Luc/P3-Luc (Figura 39). Por lo tanto, H19-DTA-P3-DTA mostró actividad antitumoral potenciada, en comparación con cada una de las construcciones de promotor único (H19-DTA y P3-DTA).

35 En general, los resultados presentados en el presente documento demuestran que las construcciones de promotor múltiple muestran capacidad potenciada, mayor que la aditiva para inhibir el desarrollo tumoral, en comparación con las construcciones de promotor único correspondientes.

40 Listado de secuencias

30 <110> Yissum Research Development Company of the Hebrew university of Jerusalem Hochberg, Avraham Amit, Doron

35 <120> CONSTRUCCIONES QUE CONTIENEN MÚLTIPLES CASETES DE EXPRESIÓN PARA TERAPIA DE  
CÁNCER

40 <130> BCL 008 PCT

45 <160> 24

40 <170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 830

45 <212> ADN

<213> Homo sapiens

400 <400> 1

ctgcagggcc ccaacaaccc tcaccaaagg ccaaggtggt gaccgacgga cccacagcg 60  
 ggtggctggg ggagtcgaaa ctcgcagtc tccactccac tcccaaccgt ggtgccccac 120  
 gcgggcctgg gagagtctgt gaggccgccc accgcttgc agtagagtgc gcccgcgagc 180  
 cgttaagcaca gcccggcaac atgcggtctt cagacaggaa agtggccgag aatgggaccg 240  
 gggtgcccag cggctgtggg gactctgtcc tgccggaaacc gcggtgacga gcacaagctc 300  
 ggtcaactgg atggaaatcg gcctgggggg ctggcaccgc gcccaccagg gggtttgcgg 360  
 cacttccctc tgcccctcag caccggccac ccactctcca ggaacgtgag gtctgagccg 420  
 tgatggtggc aggaaggggc cctctgtgcc atccgagtcc ccagggaccc gcagctggcc 480  
 cccagccatg tgcaaagtat gtgcagggcg ctggcaggca gggagcagca ggcattgggt 540  
 cccctgaggg gagacagtgg tctggaggg agaggtcctg gaccctgagg gaggtgatgg 600  
 ggcaatgctc agccctgtct ccggatgcca aaggaggggt gcggggaggc cgtctttgga 660  
 gaattccagg atgggtgctg ggtgagagag acgtgtgctg gaactgtcca gggcggaggt 720  
 gggccctgcg gggccctcg ggagggccct gctctgattt gccggcaggg caggggcggg 780  
 aattctggcg ggccacccca gttaaaaaa gcccggcta ggaccgagga 830

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 833

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

gacaaccctc accaagggcc aaggtggta ccgacggacc cacagcgggg tggctggggg 60  
 agtcgaaact cgccagtctc cactccactc ccaaccgtgg tgcccccacgc gggcctggga 120  
 gagtctgtga ggccgcccac cgcttgcag tagagtgcgc ccgcgagccg taagcacagc 180  
 ccggcaacat gcggtcttca gacagggaaag tggccgcgaa tggaccggg gtgcccagcg 240  
 gctgtggggg ctctgtcctg cggaaaccgc ggtgacgagc acaagctcg tcaactggat 300  
 gggaatcggc ctggggggct ggcaccgcgc ccaccagggg gtttgcggca cttccctctg 360

cccctcagca ccccacccct actctccagg aacgtgagtt ctgagccgtg atggtggcag 420  
 gaagggggcc tctgtgccat ccgagtcacc agggacccgc agctggccccc cagccatgtg 480  
 caaagtatgt gcagggcgct ggcaggcagg gaggcaggcatgggtgtcc cctgaggggg 540  
 gacagtggtc tggggggag aagtccctggc cctgaggggag gtgatggggc aatgctcagc 600  
 cctgtctccg gatgccaaag gagggtgcg gggaggccgt ctttggagaa ttccaggatg 660  
 ggtgctgggt gagagagacg tggctggaa ctgtccaggc cgagggtggg ccctgcgggg 720  
 gccctcgaaa gggccctgcg ctgattggcc ggcaggcag gggcggaaat tctggcgggg 780  
 gccaccccaag ttagaaaaag cccgggctag gaccgaggag cagggtgagg gag 833

10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 877

<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

5 caaggacatg gaatttcgga cttctgtcc ccaccctctc tgctgagcct aggaacctct 60  
 gagcagcagg aaggccttgg gtctagagcc tagaaatgga ccccccacgtc cacctgcccc 120  
 gccttagaccc ccagcattga agggtgtca gacttcctgt gagaggaagc cactaagcgg 180  
 gatggacacc atcgcccaact ccaccggcc ctgcccagcc ctgcccagtc cagcccagtc 240  
 cagcccagcc ctgcccattcc cagccctgcc cagcccagct catccctgcc ctacccagcc 300  
 cagccctgtc ctgcccattcc cagcccagcc cagcccagcc ctgcccattcc ctgcccattcc 360  
 cttcccaagcc ctgacattcc cagccctgcc cagcccagct catccctgcc ctacccagct 420  
 cagccctgcc ctgcccattcc ctgcccattcc cagccctacc cagcccagcc ctgcccattcc 480  
 ctgcccagct cagccctgcc caccggcc cagcccagcc cagcatgcgt tctctggatg 540  
 gtgagcacag gcttgcaccc agaaagaggc tggcaacgag ggctgaggcc accaggccac 600  
 tgggtgctca cgggtcagac aagcccagag cctgctcccc tgccacgggt cggggctgtc 660  
 accggccagca tgctgtggat gtgcattggcc tcagggctgc tggctccagg ctgccccccgc 720  
 cctggctccc gaggccaccc ctcttatgcc atgaaccctg tgccacaccc acctctgagc 780  
 tgtccccgct cctgcccctg gcacccctg agcagcccccc tgtgtgtttc atgggagtct 840  
 tagcaaggaa ggggagctcg aatttcctgca gccccggg 877

<210> 4

<211> 1960

10 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc\_feature

15 <222> (1016)..(1016)  
<223> n e s a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

20 <222> (1126)..(1126)  
<223> n e s a, c, g o t

<400> 4

ccgggttaccg agctcccagg aagataaaatg atttcctcct ctctagagat ggggggtggga	60
tctgagcact cagagccaag ggcgcagtgg gtccgggcgg gggccctcct cggccctccc	120
aacatggggg ccaggaggtc agccctcaa cctggacccc ggctgggtct cagggaatgg	180
tctcccccag tggcccagct tgcttgcgtt ttcatgtgg tgcgtatggg tgcgtgtgt	240
tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg tgcgtgtgtg tgcgtatgcct gacaagcccc agagagccaa	300
agacctgagt ggagatcttgc tgacttctca aaagggggat tggaaagggttc gagaaagagc	360
tgtggtcagc cttgctctcc ctttaaggctg tgtaaccac actaggcata gcataggcct	420
gcgcggccgtc cttcccccctc tcctccgcgc ctctcccttc tctttctccc ccctctaccc	480
cgctccctgg cctgctcctg gtgacaccgt tgccccctt ccagggtga gggaaagccag	540
cgggggcccccc ttccctgaaag cccacctgca ggccggcttg ctggaaagggg gctgctctcg	600
cagaggctcc cgccccccct gcagccgtt cctggaagca gtcgctgtgg gtattctgtt	660
ccttgcagc actgtgcgttgc caaaagaaagc agacactgtg ctccctgtcc ttagggagcc	720
ccgctccatc acccaacacc tggctggaca caggcggagag gccgggtccg cggggagcgg	780
cgcgccggctg gggccggacc attaaacaca cacgggcgcc aggcactgca ggctccctcc	840
cctccctcctg cccagcgcct ctgctcacag gcacgtgcca agcccttagg ccaggaggcc	900
agcagtgggt gcagaacaag ctccctggaa ggggggtgcag ggcggacccc cggggagaag	960
ggctggcagg gctgtgggggg acgctgaccg tggcccccac gttgcagaaa actggntgcc	1020
tggctggaag atgggggaga tgccaagcct ctgaggcagc acgagcaggg tgcgtggagg	1080
ccggggcgcg gggaggctgc actgcagcat gcacccaaa gcccanaggg agtggagacc	1140
aggcccttggaa atcgagaagt agaaaggcgg ctggaggcc tcggaaaccgg ctgacccctca	1200
acagagtggg tctccagcct ggctctgccc tgccgcaggt cccctccct cattaccagg	1260
cctagaggctt ccagtcccg tggcccccag cccgagggtg aacggcctca ccctgggtcg	1320
tgggacagag ggcacgttca tcaagagtgg ctcccaaggg acacgtggct gttgcagtt	1380
cacaggaagc attcgagata aggagcttgc tttccctgt ggcacggagc cagcaggggg	1440
gctgtggggc agcccagggt gcaaggccag gctgtggggc tgcagctgcc ttggggccca	1500
ctcccaaggcc tttgcgggag gtggggaggcg ggaggcggca gctgcacagt ggcccccaggc	1560
gaggctctca gccccaggctg ctctccgggtt gggcagccca agagggtctg gctgagccctc	1620
ccacatctgg gactccatca cccaaacaact taattaaggc tgaatttcac gtgtccctgt	1680
acttgggttag acaaagcccc tgtccaaagg ggcagccagc ctaaggcagt ggggacggcg	1740
tgggtggcgg ggcacggggg agatggacaa caggaccgag ggtgtgcggg cgatggggga	1800
gatggacaac aggaccgagg gtgtgcgggc gatggggggag atggacaaca ggaccgaggg	1860
tgtgcgggac acgcatgtca ctcatgcacg ccaatggggg gcgtgggagg ctggggagca	1920
 gacagactgg gctggctgg gcgggaagga cgggcagatg	1960

<210> 5  
<211> 4085

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1016)..(1016)  
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1126)..(1126)  
 <223> n es a, c, g o t

15 <220>  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (2194)..(2194)  
 <223> n es a, c, g o t

20 <220>  
 20 <221> misc\_feature  
 <222> (3235)..(3235)  
 <223> n es a, c, g o t

25 <400> 5

ccgggtaccg	agctcccagg	aagataaaatg	atttcctcct	ctctagagat	gggggtggga	60
tctgagcact	cagagccaag	ggcgcagtgg	gtccgggcgg	gggcctcct	cggccctccc	120
aacatggggg	ccaggaggtc	agccctcaa	cctggacccc	ggctgggtct	caggaaatgg	180
tctccccag	tggcccagct	tgcgtgtgtt	ttcagatggg	tgtcatggg	tgtgtgtgt	240
tgtgtgtgt	tgtgtgtgt	tgtgtgtgt	tgtgtgcct	gacaagcccc	agagagccaa	300
agacctgagt	ggagatctt	tgacttctca	aaagggggat	tggaaaggttc	gagaaagagc	360
tgtggtcagc	tttgctctcc	cttaaggctg	tggtaaccac	actaggcata	gcataggcct	420
gcgcggcgtc	cctccttccc	tcctccgcgc	cttccttttc	tcttctccc	ccctctaccc	480
cgctccctgg	cctgctcctg	gtgacaccgt	tggcccccctt	ccagggtctga	ggaaagccag	540
cggggggccc	ttcctgaaag	cccacctgca	ggccggcttg	ctggaaaggg	gctgctctcg	600
cagaggctcc	cgcggccct	gcagccgtt	cctggaagca	gtcgctgtgg	gtattctgtt	660
ccttgcagc	actgtgctt	caaagaaagc	agacactgtg	ctccctgtcc	ttagggagcc	720
ccgctccatc	acccaacacc	tggctggaca	caggcgggag	gccgggtccg	cggggagcgg	780
cgcggggctg	gggcgggacc	attaaacaca	cacgggcgcc	aggcactgca	ggctcctcct	840
cctccctctg	cccagcgcct	ctgctcacag	gcacgtgcca	agcccttagg	ccaggaggcc	900
agcagtgggt	gcagaacaag	ctcctggaa	gggggtgcag	ggcggacccc	cggggagaag	960
ggctggcagg	gctgtggggg	acgctgaccg	tgggccccac	gttgcagaaa	actggntgcc	1020
tggctggaag	atggggaga	tgccaagcct	ctgaggcagc	acgagcaggg	tgcgtggagg	1080
ccggggcgcg	gggaggctgc	actgcagcat	gcacccaaa	gcccanaggg	agtggagacc	1140

aggccctgga atcgagaagt agaaaggcgg ctggaggcc tcggaaccgg ctgacacctca	1200
acagagtggg gccggccctg gaggcaaaga ggtgcccggg gtccggccct gcctggggga	1260
gctatgtgtc atgggcaagc cacaggatat gtagcccgct ctgagcctat ggacccaggg	1320
cagggctgca aggcaaggca ggggagacag cacgggggag caaggaggcag agagggggcc	1380
tcaggctctc ccaggaggaa cattctcccg acaggaggaa gagacggccc aggggtgact	1440
gtggggagcc atggtggcag ctggggtcgt ggcagatggg agagaggctg gcgaggtgaa	1500
ggtgcagggg tcagggctct ggggcccaca tgcctgtggg agcaggcagg cccagggctc	1560
tccgcccactc cccactcccg cttggctcat aggctgggcc caagggtggg gtggatgag	1620
caggagatgg ggcccagggg gcaagcaggg ccccaaagac atttagaaaa accggtttat	1680
gcaggcagca ttcagagcag gcggcgtgcg tggcgggggc cctggagca cagagaggca	1740
cacgtagggc ccccgagggg ctccccattt gccggcagtg acatcacccc tgtgtcaaca	1800
gtgatgtctg cagctccggc cagccagggt ttatggagcg agaccagcc cggcctggc	1860
cctcactccc caggcccaca cactagccca ctgttcaggg tccgggtgg cggcatggcc	1920
tgggggtcct ggcaccgctg ctcccttgcc caccctaact tcccggcattc gcggctgccc	1980
cctctgagcg tcccccaacca gtaagtgtgg ggcccagcag gcctggcgtc ctccctct	2040
tccctcttag agagaaacgt ggaggtcctg gggctggggg cgctcatagc cctgtgacac	2100
aggtagcatgg ggtcaggggt cccagaatgg cccctggaa ggacctcagc tggccggcg	2160
gctctaggct tcaggggtct gtctgcacag gggntagccc tcccccagacc tctgtgaagc	2220
cagtacgggc ctccccctccc tgccccgtgc tctgtccggg gcttccttggc ctgcactgc	2280
ggccactggc gagaggggtgg acagggaaagg gcccggcgtgg tgcctgttcc tgcccacctg	2340
gctgtgtggt cccctccaag tagggacaac ctttctgagg gcttgggggc accctgggt	2400
tgccagggcc tcccagagcc ctgtgagccc ctggggggtc tggcctgtatg ccccccctcca	2460
cgtccaggc cggctgtggc ccagaacccc agcttcccag caggccggc tgccgtgggt	2520
acccaggaga ggcctcgccct ccactgaggg gcccaccgacc tctgtcagac cacagagacc	2580
cccaaggagt ctgaaggctg gagaccgggg gctgggacca ggtggactt tcccacggag	2640
ccgtccccag gcccagctgg ggacacgtcc cccttctctc cagacacacc ctgcctgcca	2700
ccaggacaca cggccctgtt ggggtctct ttaagtgtct tgccactctg aggtgactgt	2760
ccctttccaa agaggtttct gggcccccagg tggatgcgt cggcctgagc aggaggatct	2820
gggcccggcag gggctggggc ctgtctcctg gggaaaggaag cgcctggag cgtgtgtct	2880
gacccaggac catccaggaa ggcccgtctg tggggcaagc gggaaaggag cggctggaga	2940
ggcttggccg ccccccgcct gcctcccatt ccttagctcc atgcctgtca acctctgtca	3000
cccagtgagt gatgtccagg ggccctggaa aggtcacagc atgtttgagc ggggtgagag	3060
agagggggaaa ggcggggggcg gggaaaagta cgtggaggaa gctttaggccc caaggaagga	3120
gacagggttc tggagggag ggagccactg gggccggccgg gaaggtccct gcttgcgtct	3180

gccaccaga accctcgccct cttagcttagc ccccgagcc ccagccttgc tggcntgtgg	3240
ccctctcccc catccccagg tgtccctgtgc aaccaggcct tggacccaaa ccctccctgccc	3300
cccttcctctc cctcctcacc ctcccaatgc agtggctc agcctggctc tgccctgccc	3360
caggtccccct cccctcatta ccaggcctag agcctccagt cccggtgccccc cccagccccga	3420
gggtgaacgg cctcaccctg ggtcggtggga cagagggcac gttcatcaag agtggctccc	3480
aaggcacacg tggctgtttg cagttcacag gaagcattcg agataaggag cttgtttcc	3540
cagtggcac ggagccagca gggggctgt ggggcagccc agggtcaag gccaggctgt	3600
ggggctgcag ctgccttggg ccccaactccc aggcccttgc gggaggtggg aggccggagg	3660
cggcagctgc acagtggccc caggcgaggc tctcagcccc agtcgtctc cgggtggca	3720
gcccaagagg gtctggctga gcctcccaca tctggactc catcacccaa caacttaatt	3780
aaggctgaat ttcacgtgtc ctgtgacttg ggttagacaaa gcccctgtcc aaaggggcag	3840
ccagcctaag gcagtgggaa cggcgtgggt ggcgggcgac gggggagatg gacaacagga	3900
ccgaggggtgt gcggggcgatg ggggagatgg acaacaggac cgaggggtgtg cggggcgatgg	3960
gggagatgga caacaggacc gaggggtgtgc gggacacgca tgtcaactcat gcacgccaat	4020
ggggggcggtg ggaggctggg gagcagacag actgggctgg gctggggcggg aaggacgggc	4080
agatg	4085

<210> 6

<211> 591

5 <212> ADN

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

<400> 6

atggatcctg atgatgttgt tgattttctt aaatcttttgc tgatggaaaaa cttttcttcg	60
taccacggga ctaaacctgg ttatgttagat tccattcaaa aaggtataca aaagccaaaa	120
tctggtacac aaggaaattt tgacgatgat tggaaagggt tttatagtac cgacaataaa	180
tacgacgctg cgggatactc tgttagataat gaaaacccgc tctctggaaa agctggaggc	240
gtggtcaaag tgacgtatcc aggactgacg aaggttctcg cactaaaagt ggataatgcc	300
gaaactatta agaaagagtt aggttaagt ctcactgaac cgttgatgga gcaagtcgga	360
acggaagagt ttatcaaaag gttcggtgat ggtgcttcgc gtgttagtgc cagccttccc	420
ttcgctgagg ggagttctag cgttgaatat attaataact gggAACAGGC gaaAGCgtta	480
agcgtagaac ttgagattaa ttttggaaacc cgtggaaaac gtggccaaga tgcgtatgtat	540
gagtatatgg ctcaaqccctg tgcaaggaaaat cgtgtcaggc gatcttttgt a	591

10

<210> 7

<211> 196

<212> PRT

15

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

<400> 7

Met Asp Pro Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu

1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile  
20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp  
35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala  
50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly  
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys  
85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr  
100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe  
115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly  
130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu  
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln  
165 170 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val  
180 185 190

Arg Arg Ser Leu  
195

<210> 8

<211> 891

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

gagctcgccc	atgcaggtag	gattttagct	gtgtttcccg	ccctgatcct	ctctcctctg	60
gcggccggag	cctccgtagg	ctccaagcct	ggcccagatt	cggcggcgca	gccggccctc	120
cgcgcgtccg	cacctagcgg	gggctccggg	gctccggcgc	ggcaccgggg	ggcgctcggg	180
atctggctga	ggctccaagg	cccgcgtggc	cggtctccctc	tgctggggca	ggtggcggt	240
gcgcgccccg	cccgagccca	ggggcccccct	cagccgcaac	aaccagcaag	gaccccccga	300
ctcagccccca	agccacactc	atctgcactc	agacggggcg	<u>cacccgcagt</u>	gcagcctcct	360
ggtgtgggcgc	tgggagcccg	cctgcccctg	cctgcccggg	gacccagct	cacgagcaca	420
ggccgcccgg	gcacccaga	aaccggat	ggggcccccctg	aattctctag	gacgggcatt	480
cagcatggcc	ttggcgctct	gcggctccct	gccccccacc	cagcctcgcc	cccgcgacc	540
ccccagcccc	tgcgaccgccc	gccccccccc	ccggggcccc	agggcccccag	cccgaccccc	600
ccgccccgct	tttggctcgg	gttgcggggg	cgggccgggg	gcggggcgag	ggctccgcgg	660
gcgccttatt	gcgcgggcgc	gaggccagcg	gccccgcgcg	gccttggcc	gcggctggcg	720
cgactataag	agccggcgt	gggcgcgc	attcgcctg	ctctccggcg	gagctgcgt	780
aggcccggcc	ggcccccggcc	cccccttcc	ggccgcgggg	gcctcctggc	ccacgcctgc	840
ccgcgcctcg	cccaccagcg	cctccatcgg	gcaaggcgcc	cccgcgtcga	c	891

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 785

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

acttcccggt	cggctctgtgg	gtgcaggggg	tgccgcctca	catgtgtat	tcgtgccttg	60
cggccctgg	cctccggggt	gctggtaac	gaggaggggc	gcggagccgc	agaagccac	120
cctggtatgt	tgacgcggtg	ccagcgagac	cgcgagagga	agacgggggt	gggcggggcc	180
aggatggaga	ggggccgagt	tggcaggagt	catggcagac	gccacattcg	cgacatctcc	240
cccacacccc	ctctggctct	gtccgcaaca	tttccaaaca	ggagtcccgg	gagaggggga	300
gaggggctgc	tggcttgagg	ctaagaaggg	cagacccccc	gacccggaga	gaggccgcgg	360
cccccgtccca	gtggcagcg	tggaaatttc	catacaagga	ggtggaaagg	agacccccc	420
cccccttcac	tgccctgtgc	agagatgagc	cgggggtgc	ggatggagc	ccatggcact	480
tcgctacggg	atggtccagg	gctcccggtt	gggggtgcag	gagagaagag	actggctggg	540
aggagggaga	gggcgggagc	aaaggcgcgg	gggagtggtc	agcagggaga	gggggtggggg	600
gtagggtgga	gcccggctg	ggaggagtcg	gctcacacat	aaaagctgag	gcactgacca	660
gcctgcaaac	tggacattag	tttctctgt	gaaagagact	tccagcttcc	tcctcctcct	720
tttctcttc	tcctcctgc	cccgacgagc	tttctgtga	gctgttaggg	gatcttctag	780
agtcg						785

<210> 10  
<211> 8837  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
5  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (238)..(239)  
<223> n es a, c, g o t  
10  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (733)..(733)  
<223> n es a, c, g o t  
15  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3178)..(3203)  
<223> n es a, c, g o t  
20  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7393)..(7393)  
<223> n es a, c, g o t  
25  
<400> 10

cccaaccccg	cgcacagcgg	gcactggttt	cgggcctctc	tgtctcctac	gaagtccgta	60
gagcaactcg	gatttggaa	atttctctct	agcggtgccc	aaacacactt	gggtcggccg	120
cgcgccctca	ggacgtggac	agggaggggct	tccccgtgtc	cagggaaagcg	accggggcatt	180
gcccccaagtc	tcccccaat	ttgggcattt	tccccgggtc	ttccaaacgga	ctggggcgng	240
ctcccgacac	ctgaggactg	gccccgggtt	ctcgctcacc	ttcagcagcg	tccaccgcct	300
gccacagagc	gttcgatcgc	tcgctgcctg	agctcctggt	gcgcccgcgg	acgcagcctc	360
cagcttcgcg	gtgagctccc	cgccgcgcgg	atccccctccg	cctctgcgc	cctgaccggc	420
tctcggcccc	catctgctgc	tgtcccgcg	gtgctggcgc	tcgtccgcgt	cgccggggag	480
gccggcgtgg	ggcgcgggac	acggctgcgg	acttgcggct	gcgctgcgct	cgctcctgct	540
gggcgcggcc	aaatccgcgc	cacttcgtt	tgctcattgc	aaagatctca	tttgtggga	600
aagcggctgg	agggtcccaa	agtggggcgg	gcagggggct	ggggcgaggg	acgcggagga	660
gaggcgctcc	cgccgggcgg	taaagtgcct	ctagcccgcg	ggcctaggac	tccgcccggga	720
gggcgcgcgg	agngcgaagt	gattgatggc	ggaagcgggg	ggcaagggg	ggcagggggg	780
cgcgggattc	cgccggcgac	cccttccct	tggctaggct	taggcggcgg	ggggctggcg	840
gggtgcggga	ttttgtgcgt	ggtttttgac	tttgtaaaaa	tcacagtgt	ttcttacatc	900
gttcaaactc	tccaggagat	ggtttccca	gaccccaaaa	ttatcgtggt	ggcccccgag	960
accgaactcg	cgtctatgca	agtccaaacgc	actgaggacg	ggtaaccat	tatccagata	1020
ttttgggtgg	gccgcaaagg	cgagctactt	agacgcaccc	cggtagctc	ggccatgcag	1080
gtaggatttg	agctgtgtt	ccgcctctga	tccctctctcc	tctggcggcc	ggagcctccg	1140
taggctccaa	gcctggccca	gattcggcgg	cgcagccggc	cttccgcgcg	tccgcaccta	1200
gcgggggctc	cggggctccg	gcgcggcacc	ggggggcgct	cgggatctgg	ctgaggctcc	1260
aaggcccccg	tggccggctc	ctcctgctgg	ggcaggtggc	ggctgcgcgc	cccgcggag	1320
cccaggggccc	ccctcagccg	caacaaccag	caaggacccc	ccgactcagc	cccaagccac	1380
ctgcacatctgc	actcagacgg	ggcgcacccg	cagtgcagcc	tcctgggtgg	gcgcgtggag	1440
cccgcctgcc	cctgcctgcc	cggagacccc	agctcacgag	cacaggccgc	ccggggcacccc	1500
cagaaacccg	ggatggggcc	cctgaattct	ctaggacggg	cattcagcat	ggccttggcg	1560
ctctgcggct	ccctgcccccc	cacccagcct	cgcccccgcg	caccccccag	ccccctgcgac	1620

cgccgcccccc	ccccccgggg	ccccagggcc	ccagcccga	ccccccgccc	cgctttggc	1680
tcgggttgcg	ggggcgggcc	gggggccccggg	cgagggctcc	gcgggcgccc	attggcgccg	1740
gcgcgaggcc	agcggccccg	cgccgcctg	ggccgcggct	ggcgcgacta	taagagccgg	1800
gcgtgggcgc	ccgcagttcg	cctgctctcc	ggcggagctg	cgtgaggccc	ggccggcccc	1860
ggccccccccc	ttccggccgc	ccccgcctcc	tggcccacgc	ctgcccgcgc	tctgcccacc	1920
agcgcctcca	tcgggcaagg	cgccccgcg	tcgacgcccgc	ccgctgcctc	gctgctgact	1980
cccgtccccgg	gcccgcgtccg	cggggtcgcg	ctccgcgggg	cctgcggatt	ccccgcccgc	2040
tcctcttcat	ctacctaacc	tccccccatc	cccgcttcgc	ccgaggaggc	ggttcccccc	2100
gcaggcagtc	cggctcgca	gccgcggcg	ttgtcacccc	ccccgcgc	ccccctccagc	2160
cctccccccg	gcgcgcagcc	tcgggcccgt	cccccttccg	cgctgcgtcc	cgagcgccgc	2220
ccgggtgccgc	caccgcctgt	ccccctcccg	aggccccggc	tcgcgacggc	agagggctcc	2280
gtcggcccaa	accgagctgg	gcgcggcg	tccgggtgca	gcctccactc	cgccccccag	2340
tcaccgcctc	ccccggccccc	tcgacgtggc	gcccttccct	ccgcttctct	gtgctccccg	2400
cgcggcttcc	ggcgtctggc	ccccggccccc	gcttttctc	ccgcaacctt	cccttcgc	2460
cctcccggtcc	ccccagctc	ctagcctccg	actccctccc	ccccacgc	ccgcctctc	2520
gccttcgcg	aaccaaagtg	gattaattac	acgctttctg	tttctctccg	tgctgttctc	2580
tcccgcgtg	cgccgtccccg	cctctcgctg	tcctctctcc	ccctgc	ctttcgccc	2640
ccccctttc	acgttca	tgtctctccc	actatctcg	ccccctcta	tccttgatac	2700
aacagctgac	ctcatttccc	gatacctttt	ccccccgaa	aagtacaaca	tctggccgc	2760
cccagcccga	agacagccccg	tcctccctgg	acaatcagac	gaattctccc	ccccccccc	2820
aaaaaaaagcc	atccccccgc	tctgccccgt	cgcacattcg	gccccgcga	ctcgccaga	2880
gcggcgctgg	cagaggagtg	tccggcagga	gggccaacgc	ccgctgttcg	tttgcgaca	2940
cgcagcagg	agggtgggcgg	cagcgtcgcc	ggcttccagg	taagcggcgt	gtgcggccg	3000
ggccggggcc	ggggctgggg	cgccgcgggc	ttgcggcgac	gcccggccct	tcctccgccc	3060
gctcccgcc	cggggcctgc	ggggctcggc	ggggcggctg	agccgggggg	gaggaggagg	3120
aggaggagga	ggacggacgg	ctgcgggtcc	cgttccctgc	gcggagccccg	cgctaccnnn	3180
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnngacgtcc	ccgctgaagg	gggtcggtct	gtgggtgcag	3240
gggtgtccgc	ctcacatgtg	tgattcgtgc	ttgcgggccc	ctggcctccg	gggtgctggg	3300
taacgaggag	gggcgcggag	ccgcagaagc	ccacccttgt	gtcgttgacg	ccgggtgccag	3360
cgagaccgcg	agaggaagac	gggggcgggc	ggggccagga	tggagaggggg	ccgagttggc	3420
aggagtcatg	gcagacgcca	cactcgac	catctcccc	acaccctct	ggcctctgtc	3480
cgcaacattt	ccaaacagga	gtcccggag	agggggagag	gggctgctgg	tctgaggcta	3540
agaagggcag	agccttcgac	ccggagagag	gccgcggccg	cctgccccag	tggcaacgtt	3600
gaagtttcc	ataacaacgga	ggtcgggaag	gagacccccc	cccccttca	ctgcccgttg	3660

aagagatgag ccgggggtgc aggatggag cccatggcac ttgcgtacgg	3720
gctccggttg ggggtgcagg agagaagaga ctggctggga ggagggagag ggcgggagca	3780
aaggcgccgg ggtgtggtca gagggagagg ggtgggggtt aggtggagcc cgggctggga	3840
ggagtccgct cacacataaa actgaggcac tgaccagcct gcaaactgga tattagcttc	3900
tcctgtgaaa gagacttcca gcttcctcct ctcctcttc tcctcctcc tcctgccccca	3960
gcgagccttc tgctgagctg taggtAACCA gggctgtggga gtgaaggacc cccgctgcca	4020
tcccactcca gcctgaggca gggcagcagg gggcacggcc cacgcctggg cctcgggccc	4080
tgcagccccc agcccgctgc ctctggaca gcaccccccct cccctttttt cctctgcccc	4140
tgccccacc tggcgtctct gctccctcac ctgctcttc ctttctgtt cttcccttc	4200
ggcccccctcc ttgcccagct caggactttt cctggggccct cacctgctcc gcaccgctgc	4260
atgcttcctg tcctgctttc tgccggtccc ctgacccgga cctccaagcg cagagtggtg	4320
gggcttggtg cggaaagcgcg gcgagggcta gagtgccag ctggcggagt gtgcttttag	4380
aatttggaaag ggggtggcag agggggcggt gagaggactg gccagggtcc gccatgtcaa	4440
ggagatgacc aaggaggctt tcagatcctc ggccgcgtcg cccactagtc tttagagagg	4500
gcatgcaaag ttgtgcttct gtcccactgc ctgctcagtc gtcacataa tttagatgc	4560
caaaaactcc cctgggtctg cggagcaagg ctggggctgc ccgcctggag ggtaccacct	4620
tctgcaggag cagggccaac ttgctgtggt ggctcccgcc ctcccacccc cgagtgggtt	4680
acccggccct gtgacctgca gcctgtggag ggggtgtgcc taagactggc ctcccccttc	4740
agattgttagt ctggggaaacc tgggtgtcgga ctcccaggt ggcctgagct ggtctttca	4800
gctccacggg gagagttgg tagcgcaaattt agggagatgt tctggggcccc tggccttact	4860
ggttcgatTTT gaggcctgga aaggaggctc tggcgtgtg tgggtgtgtt tgggggtacc	4920
caaggcagac tggagttgga gaactgggtg actggaaaaa caaggTTTCT agagcatggg	4980
tggcgtggtt gtgttaacca ttggagtcgc ttgacccagg cctggctcag ctgcagactg	5040
gaaaggtgga aaagccaggg ggagggcgg ggctggccca gcaggactgg cctgctgctt	5100
tgagggcgat ggtcctcctg gaccccccct gtcagctgg gggttgtggg gaggaagggg	5160
ctggtcctcc ttggagcaca tgctctgttag gggtggggct gtctgccatc ttggcggcgc	5220
tggaggcctg agaagtggcg atgtaacgct gggctggccc tgccccatg gtgtcatagg	5280
acggaggcag gtcgggtgtc cagcctggc ccctgcagct gtggatgccc ctgagctcct	5340
gcaataatga ccgtgcagat ggtcacccct cgtgtaaaat tactagtgtct tcttgcaaatt	5400
ggaaggaact gggcttttc tgggtgtttc tggacgcttc attctgcaca tggccctgcg	5460
ccctcacctc ggcattatga cctgtgtgtt acttttgtaa taaaataat gtttatagga	5520
aagccgtgct ttcaattttc aactgaattt gttaggtggc aaatttggtt tgggaggggc	5580
acctctggcc tggggcttgg cctggctgcc ccgcgtcacgc cacttctctc ccgcacccag	5640
acaccaatgg gaatccaaat gggaaagtcg atgctggtgc ttctcacctt cttggccttc	5700

gcctcggtct gcattgtgc ttaccgcccc agtgagaccc tggcggcgg ggagctggtg	5760
gacaccctcc agttcgctcg tggggaccgc ggcttctact tcagtaagta gcagggaggg	5820
gcttcctcag acctggtcag gcccctagag tgaccggtaa ggatctccca tcctcaagcc	5880
aggggagcac actccttaggt cagcagccca gccgcttgc ctgagacttt gaccttcccg	5940
ccgcgtttct gagcacgtgc ggtgtcccag ggcattccaca ccagctgcct ttcccatcac	6000
acgcctcctt cgaagggtgg gccagaggtg ccccttagac gtcaggggca tctacagggg	6060
tctccctggg catcagaatt tctgttgggg gccgtgaggc tcctgctcct gaggcaccgc	6120
acgcctagtg cagggcttca ggctctggag gaagagcctg ctttcttcc tgcacccccc	6180
ggacattttgc acaagggacg tgcgttcggt gaatgatcag aattaaaatc aataaaagtga	6240
tttatataat taaaatcaat aagacaagtgc cagttggtgg gtggcagggg tgagcgggtgc	6300
atgcgcctcc ttgggccccca aggctgccgt ggggggtgcc cacctgctga cctcaaggac	6360
gcttcagcct ttccctcatgt ttctctcttgc gttctccagc ctggggctg gcaggtgggt	6420
gcattggccca ttgtccttga gaccccaccc ccagataggg gggctgggtg gatgcagagg	6480
caggcatggt gcctggcat gcctgatggg gcaggggagg ggccgcctt tactggcaga	6540
ggccgcact tattccaccc gacactcacc acgtgacatc tttaccacca ctgcttactc	6600
acgctgtgaa atgggctcac aggatgcaaa tgcacttcaa agttctctc taaaaagttc	6660
ctgctgcttgc actctggaaag cccctgcccc ccctggcctc tcctgtgccccc tctctttgc	6720
ctgccccatt tgggggttagg aagtggcact gcagggcctg gtgccagcca gtccttgccc	6780
agggagaagc ttccctgcac caggcttcc tgagaggagg ggagggccaa gcccccaattt	6840
ggggggcccccc gtgacggggc ctccctgtcc ctccctccggc tgcgtgcacc tgccctttgg	6900
caccccaagg tggagcccccc agcgacccctc cccttccagc tgagcattgc tgtggggag	6960
agggggaaaga cgggaggaaa gaagggagtg gttccatcac gcctcctcag cctccctcc	7020
tccctgtttc tcctctcctg cccttgcctc cctgtctcag cagctccagg ggtgggtgtgg	7080
gccccctccag cctcccaagg ggtgccaggc cagagtccaa gtcacggac agcagtccctc	7140
ctgtggggc cctgaactgg gtcacatcc cacacatccc ccaaaaccact cccattgtga	7200
gcctttggtc ctgggtgggtt ccctctggtt gtgggaccaa gagcttgc ccattttca	7260
tctgaggaag gaggcagcag aagtacggg ctgggtctggg ccccaactcac ctccccctctc	7320
acctctcttc ttccctggac gcctctgcct gccggctctc acttccctcc cctgacccgc	7380
agggtggctg cgncccttcca gggcctggcc tgagggcagg ggtgggttgc tgggggttcg	7440
gcctccgggg gctgggggttc ggtgcgggtgc taacacggct ctctctgtgc tgtggactt	7500
ccaggcaggc ccgcaagccg tgtgagccgt cgccagccgtg gcatcggtga ggagtgcgtgt	7560
ttcccgagct gtgacctggc cctccctggag acgtactgtg ctaccccccgc caagtccgag	7620
agggacgtgt cgacccctcc gaccgtgtttt ccgggtgagggg tcctggggccc ctttcccaact	7680
ctctagagac agagaaatag ggcttcgggc gcccagcggtt tcctgtggcc tctgggacact	7740

cttggccagg gacaaggacc cgtgacttcc ttgcttgc tggtggccgg gagcagctca	7800
gacgctggct cttctgtcc ctctgcccgt ggacattagc tcaagtcact gatcagtcac	7860
aggggtggcc tgtcaggtca ggcggcgcc tcaggcggaa gagcgtggag agcaggcacc	7920
tgctgaccag ccccttcccc tcccaggaca acttccccga gataccccctg ggcaagttct	7980
tccaatatga cacccttggaaag cagtccaccc agcgccctgcg caggggcctg cctgcccctcc	8040
tgcgtgcccgc ccgggggtcac gtgctcgcca aggagctcga ggcgttcagg gaggccaaac	8100
gtcaccgtcc cctgattgct ctacccaccc aagacccccgc ccacgggggc gcccccccaag	8160
agatggccag caatcggaag tgagcaaaac tgccgcaagt ctgcagcccg gcgccaccat	8220
cctgcagcct cctccctgacc acggacgttt ccatcaggtt ccatcccgaa aatctctcg	8280
ttccacgtcc cctggggctt ctcctgaccc agtccccgtg ccccgccctcc ccgaaacagg	8340
ctactctcct cggccccctc catcgggctg aggaagcaca gcagcatctt caaacatgta	8400
caaaatcgat tggctttaaa cacccttcac ataccctccc cccaaattat ccccaattat	8460
ccccacacat aaaaaatcaa aacattaaac taacccctt cccccccccc cacaacaacc	8520
ctcttaaaac taattggctt tttagaaaca ccccacaaaaa gtcagaaat tggctttaaa	8580
aaaaacaacc accaaaaaaaaa atcaattggc taaaaaaaaa aagtattaaa aacgaattgg	8640
ctgagaaaca attggcaaaa taaaggaatt tggcactccc cacccttcc tttctttct	8700
cccttggact ttgagtcaaa ttggcctgga cttgagtccc tgaaccagca aagagaaaaag	8760
aaggggccca gaaatcacag gtgggcacgt cgcgcttacc gccatctccc ttctcacggg	8820
aattttcagg gtaaact	8837

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 6045

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

10 &lt;400&gt; 11

ccctcaccaa	gggccaaggt	ggtgaccgac	ggacccacag	cggggtggct	gggggagtcg	60
aaactcgcca	gtctccactc	caactccaaac	cgtggtgccc	cacgcgggcc	tggagagtc	120
tgtgaggccg	cccaccgctt	gtcagtagag	tgcgcccgcg	agccgttaagc	acagcccgcc	180
aacatgcggt	cttcagacag	gaaagtggcc	gcgaatggga	ccggggtgcc	cagcggctgt	240
ggggactctg	tcctgcggaa	accgcggta	cgagcacaag	ctcggtaaac	tggatggaa	300
tcggcctggg	gggctggcac	cgcgcacc	agggggtttg	cggcacttcc	ctctgcccct	360
cagcacccca	cccctactct	ccaggaacgt	gagttctgag	ccgtgatggt	ggcaggaagg	420
ggccctctgt	gccatccgag	tccccaggg	cccgcagctg	gcccccagcc	atgtcaaag	480
tatgtgcagg	gcgctggcag	gcagggagca	gcaggcatgg	tgtcccctga	ggggagacag	540
tggctctggga	gggagaagtc	ctggaccctg	agggaggtga	tggggcaatg	ctcagccctg	600

tctccggatg ccaaaggagg ggtgcgggga ggccgtctt ggagaattcc aggatgggtg	660
ctgggtgaga gagacgtgtg ctggaaactgt ccagggcggg ggtggccct gcggggcc	720
tcgggagggc cctgctctga ttggccggca gggcaggggc gggaaatcctg ggcggggcca	780
ccccagttag aaaaagcccg ggctaggacc gaggagcagg gtgagggaga agcttggcat	840
tccggtactg ttggtaaagc caccatggat cctgatgatg ttgttatttc ttctaaatct	900
tttgtatgg aaaacttttc ttcttaccac gggactaaac ctggttatgt agattccatt	960
aaaaaaggta tacaaaagcc aaaatctggt acacaaggaa attatgacga tgattggaaa	1020
gggtttata gtaccgacaa taaatacgac gctgcgggat actctgtaga taatgaaaac	1080
ccgctctctg gaaaagctgg aggcgtggc aaagtgcgt atccaggact gacgaaggtt	1140
ctcgcaactaa aagtggataa tgccgaaact attaagaaaag agttaggtt aagtctca	1200
gaaccgttga tggagcaagt cggaacggaa gagtttatca aaaggttcggtg tgatggtgct	1260
tcgcgtgtag tgctcagcct tcccttcgct gaggggagtt ctgcgttga atatattaat	1320
aactggaaac aggcgaaagc gttaagcgta gaacttgaga ttaatttga aaccctgtgaa	1380
aaacgtggcc aagatgcgtat gtatgagttt atggctcaag cctgtgcagg aaatcggtc	1440
aggcgatctt tgtgaaggaa ctttacttctt gtgggtgtgac ataattggac aaactaccta	1500
cagagatttgc gggatcctctt agagtcgggg cgccggccg cttcgagcag acatgataag	1560
atacattgtat gagtttggac aaaccacaac tagaatcgag tgaaaaaaat gctttatttg	1620
tgaaatttgt gatgctatttgc ctttatttgc aaccattata agctgcaata aacaagttaa	1680
caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta	1740
aagcaagttaa aacccctaca aatgtggtaa aatcgataag gatccgtcga ccgatgcctt	1800
tgagagcctt caacccagtc agctccctcc ggtggcgccg gggcatgact atcgctgc	1860
cacttatgac tgtcttctttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca ggcgtcttcc	1920
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcgt gtcgttccggc tgccggcagc ggtatcagct	1980
cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	2040
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgcgt ggcgttttc	2100
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	2160
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct	2220
cctgttccga ccctgcccgt tacccgatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg	2280
gcgccttc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcggt gtttaggtcgt tcgcgttcaag	2340
ctgggctgtg tgcacgaacc cccccgtcag cccgaccgct gcgccttac cggtaactat	2400
cgtcttgcgtt ccaacccgggt aagacacgcac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	2460
aggatttagca gagcgggtt gtttaggcgtt gctacagagt tcttgaagtgt gtggccta	2520
tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccttcc	2580
ggaaaaagag ttggtagctc ttgtatccggc aaacaaacca ccgcgttgcgt ggggttttt	2640

tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tccttgatc	2700
ttttctacgg	ggtctgacgc	tca	gaaactcac	gttaaggat	tttggat	2760
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	ctttaaatt	aaaaatgaag	ttttaatca	2820
atctaaagta	tat	atgagta	aacttggtct	gacagttag	aaaactcatc	2880
tgaaactgca	atttattcat	atcaggatta	tcaataccat	attttgaaa	aagccgttc	2940
tgt	aatgaag	gagaaaaactc	accgaggcag	ttccatagga	tggcaagatc	3000
tctgcgttcc	cgactcgatc	aacatcaata	caacctatta	at	ttcccctc	3060
agg	ttatcaaa	gtgagaaatc	accatgatg	acgactgaat	ccggtgagaa	3120
ttatgcattt	cttccagac	ttgttcaaca	ggccagccat	tacgctcg	atcaaaatca	3180
ctcgcatcaa	ccaaaccgtt	attcattcg	gattgcgcct	gagc	gagacg	3240
tcgctgtt	aaaggacaatt	acaacacagga	atcgaatgca	accggcgcag	gaacactg	3300
agcgc	atcaaa	caatatttc	acctgaatca	ggatattctt	ctaatacctg	3360
ttcccg	gggta	tcgcagtgg	gagtaaccat	gcatcatcag	gagtacggat	3420
atgg	tggaa	gaggcataaa	ttccgtc	cagtttagtc	tgaccatctc	3480
tcattgg	caa	cgctac	ttt	gccatgtt	ctggcgc	3540
tacaatcgat	agattgt	ac	ctgtattgc	ccgacattat	cgcgagccc	3600
tataaaatcag	catccat	gtt	ggaatttaat	cgcggcctag	agcaagacgt	3660
atatgg	ctca	tact	tttcaat	tattgaagca	tttattcagg	3720
atgagcggat	acatattt	ga	atgtatttag	aaaaataaaac	aaatagggt	3780
tttccc	gaa	aagtgc	ccacc	tgacgc	ccc	3840
gtgg	ttacgc	gc	cg	ctacactt	gccagc	3900
ttcttcc	ttt	cctt	ctcg	cacgtt	cc	3960
ctcc	tttag	ggttcc	gatt	tagtgc	ttcg	4020
ggtgat	gg	cacgt	gttgg	gccatgc	ccc	4080
gagtcc	acgt	tgc	tttt	tgatagacgg	tttgc	4140
ttttgat	ttt	ataagg	tttgc	gat	tttgc	4200
gagctgat	ttt	aaat	taacgc	aat	tttgc	4260
cattcgccat	tcagg	ctgc	caactgttgg	gaagg	cgat	4320
ttacg	ccagg	tacc	atgataagta	agtaatatta	aggtacgg	4380
gcgg	ccg	caa	taaaatatct	ttat	tacatctgt	4440
cgat	at	act	aatatct	tacat	tttttt	4500
agg	gttccc	cag	tgca	gt	ttgt	4560
gg	tc	gt	ca	tttct	ttgc	4620
ctcc	gggg	tt	ggta	agg	ggcgc	4680
gttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	

gacgcggtgc cagcgagacc gcgagaggaa gacgggggtg ggcggggcca ggatggagag	4740
gggccgagtt ggcaggagtc atggcagacg ccacattcg c gacatctccc ccacaccccc	4800
tctggctctg tccgcaacat ttccaaacag gagtcccggg agagggggag aggggctgct	4860
ggtctgaggc taagaaggc agagccttcg acccggagag aggccgcggc ccctgcccag	4920
tgggcagcgt ggaagtttcc atacaaggag gtgggaagga gacccccc ccccttcact	4980
gccctgtgca gagatgagcc gggggtgcag gatgggagcc catggcactt cgctacggga	5040
tggtccaggg ctcccggtt ggggtgcagg agagaagaga ctggctggga ggagggagag	5100
ggcgggagca aaggcgcggg ggagtggta gcagggagag ggggggggg tagggtgag	5160
cccgccctgg gaggagtcgg ctcacacata aaagctgagg cactgaccag cctgcaaact	5220
ggacattagc ttctcctgtg aaagagactt ccagttcct ctccttcctc ttcccttc	5280
tcctcctgccc ccagcgagcc ttctgctgag ctgtaggggg atcttctaga gtcggctagc	5340
ggcattccgg tactgttggt aaagccacca tggatcctga ttagtgggtt gattttctta	5400
aatctttgt gatggaaaac ttttctcgt accacggac taaacctggt tatgttagatt	5460
ccattcaaaa aggtatacaa aagccaaaat ctggcacaca agggaaattat gacgatgatt	5520
ggaaagggtt ttatagtacc gacaataat acgacgctgc gggatactct gtagataatg	5580
aaaacccgct ctctggaaaa gctggaggcg tggtaaagt gacgtatcca ggactgacga	5640
aggttctcgc actaaaagt gataatgccg aaactattaa gaaagagttt ggttttagtc	5700
tcactgaacc gttgatggag caagtccgaa cggaaagagtt tatcaaaagg ttccgtgt	5760
gtgcttcgcg tgttagtgctc agccttcct tcgctgaggg gagttcttagc gttgaatata	5820
ttaataactg ggaacaggcg aaagcgtaa gcgtagaact tgagattaat tttgaaaccc	5880
gtggaaaacg tggccaagat gcgtatgtatg agtataatggc tcaaggctgt gcaggaaatc	5940
gtgtcaggcg atctttgtga aggaacccta cttctgtggt gtgacataat tggacaaact	6000
acctacagag atttggggat ccctcgagac gttagggtacc gacaa	6045

<210> 12  
 <211> 632  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

gacgggggtg ggccgggcca ggatggagag gggccgagtt ggcaggagtc atggcagacg	60
ccacattcgc gacactctcc ccacacccccc tctggctctg tccgcaacat ttccaaacag	120
gagtcccggg agagggggag aggggctgct ggtctgaggc taagaaggc agagccttcg	180
acccggagag agggcgcggc ccctgcccag tgggcagcgt ggaagttcc atacaaggag	240
gtgggaagga gacccccc ccccttcaact gcccgtgca gagatgagcc gggggtgcag	300
gatgggagcc catggcactt cgctacgggta tggtcagggc tcccggttgg gggtgca	360
gagaagagac tggctggag gagggagagg gcgggagcaa aggccgcggg gagtggtcag	420
cagggagagg ggtgggggtt agggtgagc ccgggctggg aggagtccgc tcacacataa	480
aagctgaggc actgaccagc ctgcaaactg gacattagct tctcctgtga aagagacttc	540
cagcttcctc ctccctctt ccctcctt cctcctgccc cagcagcct tctgctgagc	600
tgttagtaac cagggccgtg gatgagactc tc	632

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 870

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

ggatccccaa aatgtgttcc ttgcttcat ctgccaattt tacgtaatat ggctctacgg	60
caaaattccc aatttcatat ggagaatttt cttaactac ccctcctcac aaattggtcc	120
cccaagctag ctggccctta tttgagacct ctttctctat gttcccaatt gcatggagca	180
acttctctca tcccccaaac ctgtaatcta tttttctgga gtctcgagtt tagtcatcaa	240
tcacggttcc cacattaacg gatccccgg ggtccctcc tccaggacac ccattcgta	300
agcccgcaag gcagaaagaa ctctgccttg cgttccccaa aatttggca ttgttccggc	360
tcgcccggcca cccactgcag cttcccaac cccgcgcaca gcgggcactg gtttcgggccc	420
tctctgtctc ctacgaagtc cccagagcaa ctcggatttg ggaaatttct ctctagcgtt	480
gccccaaacac acttgggtcg gccgcgcgc ctcaggacgt ggacagggag ggcttccccg	540
tgtccaggaa agcgaccggg cattgccccc agtctccccca aatttggc attgtccccg	600
ggtcttccaa cggactgggc gttgctcccg gacactgagg actggccccg gggtctcgct	660
cacccctcagc agcgtccacc gcctgcacaca gagcgttcga tcgctcgctg cctgagctcc	720
tggtgccccc gcggacgcag ctcagcttt cgcggtgagc tccccccgc gccgatcccc	780
tccgcctctg cggccctgac cggctctcg gcccgcattcg ctgctgtccc gccggtgctg	840
gcgcgtctt ccggctgccc ccggggaggc	870

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 720

10 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

tcatgagcac	cgagagcatg	atcagggatg	tggagctggc	cgaggaggcc	ctgcccaga	60
aaacaggcgg	ccctcagggc	agcagaagat	gcctgttcc	gagcctgttc	agtttccctga	120
tcgtggccgg	agccaccacc	ctgttctgcc	tgctgaactt	cggcgtgatc	ggcccccaga	180
gagaggagtt	ccccagagac	ctgagcctga	tctcccccct	ggcccaggct	gtgagaagca	240
gcagcagaac	ccccagcgcac	aagcccgtgg	cccacgtggt	ggccaaccccc	caggccgagg	300
gccagctgca	gtggctgaac	agaagagcca	acgcccgtct	ggccaacggc	gtggagctga	360
gagacaacca	gctggtggtg	cccagcgagg	gcctgtacct	gatctacagc	caggtgctgt	420
tcaagggccca	gggctgcccc	agcaccacg	tgctgctgac	ccacaccatc	agcagaatcg	480
ccgtgtccta	ccagaccaag	gtgaacctgc	tgtccgccat	caagagccct	tgccagagag	540
agaccccccga	gggcgcccag	gccaagccct	ggtacgagcc	tatctacctg	ggcggcgtgt	600
tccagctgga	gaaggggcgac	agactgagcg	ccgagatcaa	cagacccgac	tacctggatt	660
tcgcccagag	cggccaggtg	tacttcggca	tcatgcctt	gtgataatct	agaaccatgg	720

5 &lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

10 &lt;400&gt; 15

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala  
 1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe  
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe  
 35 40 45

Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro  
 50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
 65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro  
 85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu  
 100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser  
 115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly  
 130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala  
 145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro  
 165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu  
 180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu  
 195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly  
 210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 225 230

<210> 16  
 <211> 4560

5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

&lt;400&gt; 16

ggtaccgaca accctcacca	60
agggccaagg tggtgaccga	
cggaccacca gcggggtgtgc	
tgggggagtc gaaactcgcc	120
agtctccact ccactccaa	
ccgtggtgcc ccacgcgggc	
ctgggagagt ctgtgaggcc	180
gcccaccgct tgtcagtaga	
gtgcgcccgc gagccgtaag	
cacagcccg	240
caacatgcgg tttcagaca	
ggaaagtggc cgcaatggg	
accggggtgtc	
ccagcggctg tggggactct	300
gtcctgcgga aaccgcggtg	
acgagcacaa gctcggtcaa	
ctggatggga atcggcctgg	360
ggggctggca ccgcgcccac	
cagggggttt gcggcacttc	
cctctgcccc tcagcacccc	420
acccctactc tccaggaacg	
tgagttctga gccgtgatgg	
tggcaggaag gggccctctg	480
tgccatccga gtccccaggg	
acccgcagct ggcccccagc	
catgtgcaa gtatgtgcag	540
ggcgctggca ggcagggagc	
agcaggcatg gtgtccccctg	
aggggagaca gtggctctgg	600
agggagaagt cctggaccct	
gagggaggtg atggggcaat	
gctcagccct gtctccggat	660
gccaaaggag gggtgcgggg	
aggccgtctt tggagaattc	
caggatgggt gctgggtgag	720
agagacgtgt gctggaaactg	
tccagggcgg aggtgggccc	
tgcgggggcc ctcgggaggg	780
ccctgctctg attggccggc	
agggcagggg cgggaatcct	
gggcggggcc accccagtt	840
aaaaagccc gggctaggac	
cgaggagcag ggtgagggag	
aagttggca ttccgtact	900
gttggtaaag ccaccatgg	
tcctgtatgt gttgttgatt	
cttctaaatc ttttgtatg	960
aaaaactttt cttcgtacca	
cgggactaaa cctggttatg	
tagattccat tcaaaaaggt	1020
ataaaaaagc caaaatctgg	
tacacaagga aattatgacg	
atgattggaa agggtttat	1080
agtaccgaca ataaatacga	
cgctgcggga tactctgtag	
ataataaaa cccgctctct	1140
ggaaaagctg gaggcgtggt	
caaagtgacg tatccaggac	
tgacgaaggt tctcgacta	1200
aaagtggata atgccaaac	
tattaagaaa gagtttagtt	
taagtctcac tgaaccgttg	1260
atggagcaag tcggaacgga	
agagtttatac aaaaggttcg	
gtgatggtgc ttgcgtgta	1320
gtgcgtcagcc ttcccttcgc	
tgagggaggt tctagcgttg	
aatatattaa taactggaa caggcgaaag	1380
cgttaagcgt agaacttgag	
attaattttg	
aaacccgtgg aaaacgtggc	1440
caagatgcga tgtatgagta	
tatggctcaa gcctgtgcag	
gaaatcgtgt cagggatct	1500
ttgtgaagga accttacttc	
tgtggtgtga cataattgga	
caaactacct acagagattt	
ggggatcctc tagagtcggg	
gcggccggcc gcttcgagca	1560

gacatgataa gatacattga tgagtttggaa caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaaa 1620  
tgcttttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttgc taaccattat aagctgcaat 1680  
aaacaagttt acaacaacaa ttgcattcat tttatgttcc aggttcaggg ggaggtgtgg 1740  
gaggttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta aaatcgataa ggatccgtcg 1800  
accgatgccc ttgagagcct tcaacccagt cagctcccttc cgggtggcgc ggggcatgac 1860  
tatcgctgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgca ctcgtaggac aggtgcccggc 1920  
agcgctcttc cgccctctcg ctcactgact cgctgcgtc ggtcgttcgg ctgcggcgg 1980  
cggtatcagc tcactcaaag gcggtaatac gtttatccac agaatcaggg gataacgcag 2040  
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc 2100  
tggcgaaaaa ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc 2160  
agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccctt ggaagctccc 2220  
tcgtgcgtc tcctgttccg accctgcccgc ttaccggata cctgtccgccc tttctccctt 2280  
cggtaaagcgt ggccgtttctt catagctcac gctgttaggtt tctcagttcg gtgttaggtcg 2340  
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgcggc tgccgccttat 2400  
ccggtaacta tcgtctttagt tccaaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag 2460  
ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgttaggcgg tgctacagag ttcttgaagt 2520  
ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtattttg tatctgcgtc ctgctgaagc 2580  
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta 2640  
gcgggtggttt ttttgggttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag 2700  
atccttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtggaa cgaaaaactca cggttaaggga 2760  
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcaccttagat ctttttaat taaaaatgaa 2820  
gttttaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagtttag aaaaactcat 2880  
cgagcatcaa atgaaaactgc aatttattca tatcaggatt atcaataccaa tattttgaa 2940  
aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaaact caccgaggca gttccatagg atggcaagat 3000  
cctggtatcg gtctgcgttccgactcggtc caacatcaat acaacattt aatttccccct 3060  
cgtaaaaaat aagggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa tccgggtgaga 3120  
atggcaaaag tttatgcatt tctttccaga cttgttcaac aggccagcca ttacgcgtcgt 3180  
catcaaaaatc actcgcatca accaaaccgt tattcattcg tgattgcgc c tgagcgagac 3240  
gaaatacgcg atcgctgtta aaaggacaat tacaaacagg aatcgaatgc aaccggcgc 3300  
ggaacactgc cagcgcatca acaatatttt cacctgaatc aggtatattct tctaatacc 3360  
ggaatgctgt tttccgggg atcgactgg tgagtaacca tgcatcatca ggagtacgga 3420  
taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa attccgtcag ccagtttagt ctgaccatct 3480  
catctgttaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt cagaaaacaac tctggcgc 3540  
cgggctccccc atacaatcga tagattgtcg cacctgatttgc cccgacatttgcgagcccc 3600

atttataaccc atataaatca gcatccatgt tggaaattaa tcgcggccta gagcaagacg	3660
tttcccgttg aatatggctc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg	3720
gttattgtct catgagcggta tacatatttg aatgtatTTT gaaaaataaaa caaatagggg	3780
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg	3840
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc cttagcgcgg	3900
ctccttcgc tttttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc	3960
taaatcgggg gctccctta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa	4020
aacttgatta gggtgatggt tcacgttagt ggcacatcgcc ctgatagacg gttttcgcc	4080
ctttgacgtt ggagtccacg ttcttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	4140
tcaaccctat ctcggctat tctttgatt tataaggat tttgccgatt tcggcctatt	4200
ggttaaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc	4260
ttacaatttgc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttggaa ggaagggcga tcgggtgcggg	4320
cctcttcgct attacgcccag cccaaagctac catgataagt aagtaatatt aaggtacggg	4380
aggtaacttgg agcggccgca ataaaatatc tttatTTTca ttacatctgt gtgttggtt	4440
tttgtgtgaa tcgatagttac taacatacgc tctccatcaa aacaaaacga aacaaaacaa	4500
actagcaaaa taggctgtcc ccagtgcag tgcagggtgcc agaacatttc tctatcgata	4560

5 <210> 17

<211> 885

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> construcción recombinante

<400> 17

ggccatgcag	gtaggattt	agctgtgtt	cccgccctga	tcctctctcc	tctggcgccc	60
ggagcctccg	taggctccaa	gcctggccca	gattcggcgg	cgcagccggc	cttccgcgcg	120
tccgcaccta	gcgggggctc	cggggctccg	gcgcggcacc	ggggggcgct	cgggatctgg	180
ctgaggctcc	aaggcccgcg	tggccggctc	ctcctgctgg	ggcaggtggc	ggctgcgcgc	240
cccgccccag	cccaggggccc	ccctcagccg	caacaaccag	caaggacccc	ccgactcagc	300
cccaagccac	ctgcatctgc	actcagacgg	ggcgcaccccg	cagtgcagcc	tcctggtggg	360
gcgctggag	cccgccctgcc	cctgcctgcc	cggagacccc	agtcacgag	cacaggccgc	420
ccgggcaccc	cagaaaacccg	ggatggggcc	cctgaattct	ctaggacggg	cattcagcat	480
ggccttggcg	ctctgcggct	ccctgcccccc	cacccagcct	cgcccccgcg	caccccccag	540
ccccctgcac	cgccgcccccc	ccccccgggg	ccccagggcc	ccagcccgca	ccccccgccc	600
cgctcttggc	tcggggttgcg	ggggcgggccc	gggggcgggg	cgagggctcc	gcgggcgccc	660
attggcgcgg	gcgcgaggcc	agcggccccc	cgcgccctg	ggccgcggct	ggcgcgacta	720
taagagccgg	gcgtgggccc	ccgcagttcg	cctgctctcc	ggcggagctg	cgtgaggccc	780
ggccggcccc	ggccccccccc	ttccggccgc	ccccgcctcc	tggcccacgc	ctgcccgcgc	840
tctgcccacc	agcgccctcca	tcgggcaagg	cggccccgcg	tcgac		885

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 6163

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

10

&lt;400&gt; 18

ccctcaccaa	ggcccaaggt	ggtgaccgac	ggacccacag	cggggtggct	gggggagtcg	60
aaactcgcca	gtctccactc	caactccaaac	cgtggtgccc	cacgcgggcc	tgggagagtc	120
tgtgaggccg	cccaccgctt	gtcagtagag	tgcgcccgcg	agccgtaagc	acagcccggc	180
aacatgcggt	cttcagacag	gaaagtggcc	gcaaatggga	ccggggtgcc	cagcggctgt	240
ggggactctg	tcctgcggaa	accgcggtga	cgagcacaag	ctcggtcaac	tggatggaa	300
tcggcctggg	gggctggcac	cgcgcccacc	agggggtttg	cggcaattcc	ctctgcccct	360
cagcacccca	ccccctactct	ccaggaacgt	gagttctgag	ccgtgatggt	ggcaggaagg	420
ggccctctgt	gccatccgag	tccccaggg	cccgcagctg	gcccccagcc	atgtgcaaag	480
tatgtgcagg	gcgctggcag	gcagggagca	gcaggcatgg	tgtccctga	ggggagacag	540
tggtctggga	gggagaagtc	ctggaccctg	agggaggtga	tggggcaatg	ctcagccctg	600
tctccggatg	ccaaaggagg	ggtgcgggga	ggccgtcttt	ggagaattcc	aggatgggtg	660
ctgggtgaga	gagacgtgtg	ctggaaactgt	ccagggcgg	ggtggccct	gcgggggccc	720
tcgggagggc	cctgctctga	ttggccggca	ggcaggggc	ggaaatcctg	ggcggggcca	780
ccccagttag	aaaaagcccc	ggctaggacc	gaggagcagg	gtgagggaga	agttggcat	840
tccggtaactg	ttggtaaagc	caccatggat	cctgatgatg	ttgttatttc	ttctaaatct	900
tttgtatgg	aaaactttc	ttcgtaccac	gggactaaac	ctggttatgt	agattccatt	960
aaaaaggta	tacaaaagcc	aaaatctggt	acacaaggaa	attatgacga	tgattggaaa	1020
gggtttata	gtacccgacaa	taaatacgac	gctgcgggat	actctgtaga	taatgaaaac	1080
ccgctctctg	aaaaagctgg	aggcgtggtc	aaagtgcgt	atccaggact	gacgaaggtt	1140
ctcgactaa	aagtggataa	tgccgaaact	attaagaaag	agtttagttt	aagtctcaact	1200
gaaccgttga	tggagcaagt	cggaacggaa	gagtttatca	aaaggttcgg	tgatgggtct	1260
tcgcgttag	tgctcagcct	tcccttcgct	gagggagtt	ctagcgttga	atatattaat	1320
aactgggaac	aggcgaaagc	gttaagcgta	gaacttgaga	ttaatttga	aaccgtgga	1380
aaacgtggcc	aagatgcgt	gtatgagtat	atggctcaag	cctgtgcagg	aaatcgtgtc	1440
aggcgatctt	tgtgaaggaa	ccttacttct	gtgggtgtgac	ataattggac	aaactaccta	1500
cagagattt	gggatcctct	agagtcgggg	cggccggccg	cttcgagcag	acatgataag	1560
atacattgtat	gagtttgac	aaaccacaac	tagaatgcag	tgaaaaaaat	gttttatttg	1620

tgaaatttgt gatgttattt ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa	1680
caacaacaat tgcatcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta	1740
aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtaa aatcgataag gatccgtcga ccgatgccct	1800
tgagagccctt caacccagtc agctccctcc ggtggcgcg gggcatgact atcgtcgccg	1860
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgttaggaca ggtgcccggca gcgctttcc	1920
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgtcgt gtcgttcggc tgccggcagc ggtatcagct	1980
cactcaaagg cggttaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	2040
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc	2100
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	2160
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgtct	2220
cctgttccga ccctgcccgt tacggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg	2280
gcgcgttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcgg tgttagtcgt tcgctccaag	2340
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat	2400
cgtcttgagt ccaacccggc aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	2460
aggattagca gagcggagta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	2520
tacggctaca ctagaagaac agtatttgtt atctgcgtc tgctgaagcc agttaccttc	2580
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaaacca ccgctggtag cggtggttt	2640
tttggggca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2700
tttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaaaggat tttggtcgt	2760
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaatcaa	2820
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttaga aaaactcatc gagcatcaa	2880
tgaaaactgca atttattcat atcaggattt tcaataccat atttttggaaa aagccgtttc	2940
tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg	3000
tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccctc gtcaaaaata	3060
aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt	3120
ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgat atcaaaatca	3180
ctcgcatcaa ccaaaccgtt attcattcgat gattgcgcct gagcagacg aaatacgcga	3240
tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag gaacactgccc	3300
agcgcataa caatatttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg gaatgtgtt	3360
ttcccgggga tcgcagtgggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat aaaatgctt	3420
atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgttaaca	3480
tcattggcaa cgctacctt gccatgttcc agaaacaact ctggcgcatac gggcttccca	3540
tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca tttataccca	3600
tataaaatcgat catccatgtt ggaatttaat cgccggcctag agcaagacgt ttcccgttga	3660

atatggctca tactcttcct tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc	3720
atgagcgat acatatttga atgtattna aaaaataaaac aaataggggt tccgcgcaca	3780
tttccccaa aagtgccacc tgacgcgccc ttagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg	3840
gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgg tagcgcggc tccttcgct	3900
ttcttccctt ctttctcgac cacgttcgccc ggcttcccc gtcaagctct aaatcggggg	3960
ctccctttag gggtccgatt tagtgctta cgccaccccg accccaaaaa acttgattag	4020
ggtgatggtt cacgtatggg gccatcgccc tgatagacgg ttttcgccc tttgacgttg	4080
gagtccacgt tcttaatag tggactcttgg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc	4140
tcggtctatt ctttgattt ataaggatt ttgccgattt cggcctattt gttaaaaaat	4200
gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacgct tacaatttgc	4260
cattcgccat tcaggctgac caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta	4320
ttacgccagc ccaagctacc atgataagta agtaatatta aggtacggga ggtactttgga	4380
gcggccgcaa taaaatatct ttatttcat tacatctgtg tggtgttttt ttgtgtgaat	4440
cgtatgtact aacatacgct ctccatcaaa acaaaacgaa acaaaacaaa ctagcaaaat	4500
aggctgtccc cagtgcagt gcaggtgcca gaacatttct ctatcgatac tcgagggcca	4560
tgcaggttagg atttgagctg tgtttccgc cctgatcctc tctcccttgg cggccggagc	4620
ctccgttaggc tccaagcctg gcccagattt ggcggcgcaag ccggccttcc gcgcgtccgc	4680
acctagcggg ggctccgggg ctccggcgca gcaccggggg ggcgtcggga tctggctgag	4740
gctccaaggc ccgcgtggcc ggctccctc gctggggcag gtggcgctg cgcgcggcgc	4800
ccgagcccaag gggccccctc agccgcaca accagcaagg acccccccac tcaaaaaaa	4860
gccacctgca tctgcactca gacggggcgc acccgcaatg cagcctcctg gtggggcgct	4920
gggagccgc ctgccccctgc ctgccccggag accccagctc acgagcacag gccgccccgg	4980
caccccaagaa accccggatg gggccccctga attctctagg acgggcattt acgtatggcct	5040
tggcgctctg cggctccctg ccccccaccc agcctcgccc ccgcgcaccc cccagcccc	5100
gcgaccgcgc ccccccccccc cggggccccca gggcccccagc ccgcacccccc cgccccgctc	5160
ttggctcggg ttgcgggggc gggccggggg cggggcgagg gctccgcggg cgcccatgg	5220
cgcgggcgcg aggccagcgg cccccgcgcgg ccctggggcgg cggctggcgac gactataaga	5280
gccgggcgtg ggcgcggcga gttcgctcgc tctccggcgg agctgcgtga ggcccggcgg	5340
gccccggccc ccccccttccg gccgcggcc cctcctggcc cacgcctgccc cgcgccttc	5400
ccaccagcgc ctccatcgaa caaggcgcc cgcgcgtcgc aagcttagct acgctagcgg	5460
cattccggta ctgttggtaa agccaccatg gatcctgtatg atgttggta ttcttctaaa	5520
tctttgtga tggaaaactt ttcttcgtac cacggacta aacctggta ttagattcc	5580
attcaaaaaag gtataaaaaa gccaatctt ggtacacaag gaaattatga cgtatgttgg	5640
aaagggtttt atagtaccga caataaatac gacgcgtcgg gatactctgt agataatgaa	5700

aacccgctct	ctggaaaagc	tggaggcgtg	gtcaaagtga	cgtatccagg	actgacgaag	5760
gttctcgcac	taaaaagtgga	taatgccaa	actattaaga	aagagttagg	tttaagtctc	5820
actgaaccgt	tgatggagca	agtcggaacg	gaagagttt	tcaaaaggtt	cggtgatggt	5880
gcttcgcgtg	tagtgctcag	ccttcccttc	gctgagggga	gttctagcgt	tgaatatatt	5940
aataactggg	aacaggcgaa	agcgtaagc	gtagaacttg	agattaattt	tgaaaccgt	6000
ggaaaacgtg	gccaaagatgc	gatgtatgag	tatatggctc	aagcctgtgc	aggaaatcgt	6060
gtcaggcgat	ctttgtgaag	gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattt	gacaaactac	6120
ctacagagat	ttggggatcc	ctcgagacgt	agggtaccga	caa		6163

<210> 19

<211> 4657

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción recombinante

10 <400> 19

tctatcgata ggtaccgaca accctcacca agggccaagg tggtgaccgg ccatgcaggt	60
aggatttgag ctgtgtttcc cgccctgatc ctctctccctc tggcgccgg agcctccgta	120
ggctccaagc ctggcccaga ttcggcgccg cagccggcct tccgcgcgtc cgcaccta	180
gggggctccg gggctccggc gcggcaccgg ggggcgctcg ggatctggct gaggctccaa	240
ggcccgcgtg gccggctcct cctgctgggg caggtggcg ctcgcgcctc cgcacccat	300
caggggcccc ctcagccgca acaaccagca aggacccccc gactcagccc caagccaccc	360
gcacatctgcac tcagacgggg cgaccccgca gtgcagcctc ctggtgccgc gctggagcc	420
cgcctgcccc tgcctgcccc gagaccccg ctcacgagca caggccgccc gggcacccca	480
gaaacccggg atggggcccc tgaattctct aggacggca ttcagcatgg cttggcgct	540
ctgcggctcc ctgcctccca cccagcctcg ccccccgcga ccccccagcc ctcgcgaccg	600
ccgccccccc ccccggggccc ccagggcccc agcccgacc ccccgccccg ctcttgctc	660
gggttgcggg ggcgggcccgg gggcgccgg agggctccgc gggcgcccat tggcgccggc	720
gcgaggccag cggcccccgcg cggccctggg ccgcggctgg cgcgactata agagccggc	780
gtggcgccc gcagttcgcc tgctctccgg cggagctgcg tgaggcccgg ccggccccgg	840
ccccccctt ccggccgccc ccgcctcctg gcccacgcct gcccgcgcct tgcccaccag	900
cgcctccatc gggcaaggcg gccccgcaag cttggcattc cggtaactgtt gttaaagcca	960
ccatggatcc tggatgtt gttgattctt ctaaatcttt tggatggaa aactttctt	1020
cgtaccacgg gactaaacct gtttatgtat attccattca aaaaggata caaaagccaa	1080
aatctggatc acaaggaaat tatgacgatg attggaaagg gttttatagt accgacaata	1140
aatacgacgc tgcggatac tctgtagata atgaaaaccc gctctctgga aaagctggag	1200
gcgtggtcaa agtgcacgtat ccaggactga cgaaggttct cgcactaaaa gtggataatg	1260

ccgaaactat taagaaagag ttaggttaa gtctactga accgtttagt gagaactcg	1320
gaacgaaaga gtttatcaa aggttcggtg atggtgcttc gcgttagtg ctcagccttc	1380
ccttcgctga ggggagttct agcgtgaat atattaataa ctggaaacag gcgaaagcgt	1440
taagcgtaga acttgagatt aattttgaaa cccgtggaaa acgtggccaa gatgcgtatgt	1500
atgagtatat ggctcaagcc tgtgcaggaa atcgtgtcag gcgatcttg tgaaggaacc	1560
ttacttctgt ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttggg gatcctctag	1620
agtcggggcg gccggccgct tcgagcagac atgataagat acattgatga gtttggacaa	1680
accacaacta gaatgcagtg aaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga tgctattgct	1740
ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaaa caagtttaaca acaacaattt cattcatttt	1800
atgtttcagg ttcagggggg ggtgtggag gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa	1860
tgtggtaaaa tcgataagga tccgtcgacc gatgcccctt agagccttca acccagtcag	1920
ctccctccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat	1980
catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctttccgc ttctcgctc actgactcgc	2040
tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt	2100
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	2160
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttcca taggctccgc ccccctgacg	2220
agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	2280
accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgtctcc tggccgacc ctgcccgtta	2340
ccggataacct gtccgcctt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	2400
gtaggtatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	2460
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tctttagtcc aacccggtaa	2520
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	2580
taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag	2640
tatttggtat ctgcgtctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	2700
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tggggcaag cagcagatta	2760
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	2820
agtggAACGA aaactcacgt taagggatTT tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca	2880
ccttagatcct tttaaattaa aaatgaagtt tttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa	2940
cttggctga cagttagaaa aactcatcga gcatcaaattt aaactgcaat ttattcatat	3000
caggattatc aataccatat ttttgggggg gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac	3060
cggggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgtatccg actcgccaa	3120
catcaataca acctattaaat ttccctcggt caaaaataag gttatcaagt gagaatcac	3180
catgagtgac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaaagttt atgcatttct ttccagactt	3240
gttcaacagg ccagccatta cgctcgcat caaaatcact cgcatcaacc aaaccgttat	3300

tcattcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgatc	gctgttaaaa ggacaattac	3360
aaacaggaat cgaatgcaac cggcgccagga acactgccag	cgcatcaaca atatttcac	3420
ctgaatcagg atattcttct aatacctgga atgctgtttt	cccggggatc gcagtggtga	3480
gtAACCCATGC ATCATCAGGA GTACGGATAA AATGCTTGAT	GGTCGGAAGA GGCATAAAATT	3540
CCGTCAGCCA GTTGTCTG ACCATCTCAT CTGTAACATC	ATTGGCAACG CTACCTTC	3600
CATGTTCAAG AAACAACCTCT GGCGCATCGG GCTTCCATA	CAATCGATAG ATTGTGAC	3660
CTGATTGCCCG GACATTATCG CGAGCCCATT TATACCCATA	TAATCAGCA TCCATGTTGG	3720
AATTAAATCG CGGCCTAGAG CAAGACGTTT CCCGTTGAAT	ATGGCTCATC CTCTTC	3780
TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC ATATTGAAT	3840
GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTG CGCGCACATT	TCCCCGAAAAA GTGCCACCTG	3900
ACGCGCCCTG TAGCGCGCA TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT	GGTTACGCGC AGCGTGACCG	3960
CTACACTTGC CAGCGCCCTA GCGCCCGCTC CTTCGCTTT	CTTCCCTTCC TTTCTGCCA	4020
CGTTCGCCGG CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGCT	CCCTTAGGG TTCCGATTAA	4080
GTGCTTACG GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG	TGATGGTTCA CGTAGTGGC	4140
CATCGCCCTG ATAGACGGTT TTTGCCCTT TGACGTTGGA	GTCCACGTTT TTTAATAGT	4200
GACTCTTGTG CCAAACACTGGA ACAACACTCA ACCCTATCTC	GGTCTATTCT TTTGATTAT	4260
AAGGGATTTCG GCCGATTTCG GCCTATTGGT TAAAAAATGA	GCTGATTAA CAAAAATTAA	4320
ACGCGAATT TAAACAAATA TTAACGCTTA CAATTGCCA	TTCGCCATTG AGGCTGCGCA	4380
ACTGTTGGGA AGGGCGATCG GTGCGGGCCT CTTCGCTATT	ACGCCAGCCC AAGCTACCAT	4440
GATAAGTAAG TAATATTAAG GTACGGGAGG TACTTGGAGC	GGCCGCAATA AAATATCTT	4500
ATTTCTTATTA CATCTGTGTG TTGGTTTTT GTGTGAATCG	ATAGTACTAA CATACTCT	4560
CCATCAAAAC AAAACGAAAC AAAACAAACT AGCAAAATAG	GCTGCCCCA GTGCAAGTGC	4620
AGGTGCCAGA ACATTTCTCT ATCGATAGGT ACCGACA		4657

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 8162

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

10 &lt;400&gt; 20

gacaaccctc accaagggcc aaggtggta ccgacggacc cacaggggg tggctgggg	60
agtcgaaact cgccagtctc cactccactc ccaaccgtgg tgccccacgc gggcctggga	120
gagtctgtga ggccgcccac cgcttgcag tagagtgcgc ccgcgagccg taagcacagc	180
ccggcaacat gcggtcttca gacagggaaag tggccgcgaa tgggaccggg gtgcccagcg	240
gctgtgggga ctctgtcctg cgaaaccgc ggtgacgagc acaagctcgg tcaactggat	300
gggaatcggc ctggggggct ggcaccgcgc ccaccagggg gtttgcggca cttccctctg	360

ccccctcagca	ccccacccct	actctccagg	aacgtgagtt	ctgagccgtg	atggtggcag	420
gaaggggccc	tctgtgccat	ccgagtcccc	agggacccgc	agctggccccc	cagccatgtg	480
caaagtatgt	gcagggcgct	ggcaggcagg	gagcagcagg	catggtgtcc	cctgagggg	540
gacagtggtc	tgggagggag	aagtccctggc	cctgagggag	gtgatggggc	aatgctcagc	600
cctgtctccg	gatgccaaag	gaggggtgcg	gggaggccgt	ctttggagaa	ttccaggatg	660
ggtgctgggt	gagagagacg	tgtgctggaa	ctgtccaggg	cggaggtggg	ccctgcgggg	720
gccctcggga	gggcctgtct	ctgattggcc	ggcagggcag	gggcgggaat	tctgggcggg	780
gccaccccaag	ttagaaaaaaag	cccggtctag	gaccgaggag	cagggtgagg	gaagcttggc	840
attccgtac	tgttggtaaa	gccaccatgg	aagacgccaa	aaacataaaag	aaaggcccg	900
cgccattcta	tccgctggaa	gatggAACCG	ctggagagca	actgcataag	gctatgaaga	960
gatacgcct	ggttcctgga	acaattgctt	ttacagatgc	acatatcgag	gtggacatca	1020
cttacgctga	gtacttcgaa	atgtccgttc	ggttggcaga	agctatgaaa	cgatatggc	1080
tgaatacaaa	tcacagaatc	gtcgtatgca	gtgaaaactc	tcttcaattc	tttatgcgg	1140
tgttggcgc	gttattttatc	ggagttgcag	ttgcgcccgc	gaacgacatt	tataatgaac	1200
gtgaattgct	caacagtatg	ggcatttcgc	agcctaccgt	ggtgttcgtt	tccaaaaagg	1260
ggttgcaaaa	aattttgaac	gtgcaaaaaa	agctcccaat	catccaaaaa	attattatca	1320
tggattctaa	aacggattac	cagggatttc	agtcgtatgt	cacgttcgtc	acatctcatc	1380
tacctcccg	tttaatgaa	tacgattttg	tgccagagtc	cttcgtatagg	gacaagacaa	1440
ttgcactgat	catgaactcc	tctggatcta	ctggtctgcc	taaaggtgtc	gctctgcctc	1500
atagaactgc	ctgcgtgaga	ttctcgatg	ccagagatcc	tattttggc	aatcaaatca	1560
ttccggatac	tgcgatttt	agtgttggc	cattccatca	cggtttgg	atgtttacta	1620
cactcggata	tttgatatgt	ggatttcgag	tcgtcttaat	gtatagattt	gaagaagagc	1680
tgttctgag	gaggccttcag	gattacaaga	ttcaaagtgc	gctgctgg	ccaaacccat	1740
tctccttctt	cgcacaaagc	actctgattt	acaaatacga	tttatctaatt	ttacacgaaa	1800
ttgcttctgg	tggcgctccc	ctctctaagg	aagtcgggg	agcgggtgcc	aagaggttcc	1860
atctgccagg	tattcaggcaa	ggatatggc	tcactgagac	tacatcagct	attctgatta	1920
cacccgaggg	ggatgataaa	ccgggcgcgg	tcggtaaagt	tgttccattt	tttgaagcga	1980
aggttgtgga	tctggatacc	gggaaaacgc	tggcgtaaa	tcaaagaggc	gaactgtgt	2040
tgagaggtcc	tatgattatg	tccggttatg	taaacaatcc	ggaagcgacc	aacgccttga	2100
ttgacaagga	tggatggcta	cattctggag	acatagctt	ctgggacgaa	gacgaacact	2160
tcttcatcgt	tgaccgcctg	aagtctctga	ttaagtacaa	aggctatcag	gtggctccc	2220
ctgaattgga	atccatcttg	ctccaacacc	ccaaacatctt	cgacgcaggt	gtcgcaggtc	2280
ttcccgcacga	tgacgcccgt	gaacttcccg	ccgcccgttgt	tgtttggag	cacggaaaga	2340
cgatgacgga	aaaagagatc	gtggattacg	tcgcccagtca	agtaacaacc	gcgaaaaagt	2400

tgcgcgagg agttgtgtt	2460
gtggacgaag taccgaaagg	
tcttaccgga aaactcgacg	
caagaaaaat cagagagatc	2520
ctcataaaagg ccaagaaggg	
cgaaaagatc gccgtgtaat	
tctagagtgcg gggcgccgg	2580
ccgcttcgag cagacatgat	
aagatacatt gatgagttt	
gacaaaccac aactagaatg	2640
cagtgaaaaa aatgctttat	
ttgtgaaatt tgtgtatgcta	
ttgctttatt tgtaaccatt	2700
ataagctgca ataaacaagt	
taacaacaac aattgcattc	
atttatgtt tcaggttcag	2760
ggggaggtgt gggaggtttt	
ttaaagcaag taaaacctct	
acaaaatgtgg taaaatcgat	2820
aaggatccgt cgaccgatgc	
ccttgagagc cttcaaccca	
gtcagctcct tccgggtggc	2880
gcggggcatg actatcgatcg	
ccgcacttat gactgtcttc	
tttatcatgc aactcgtagg	2940
acaggtgccg gcagcgctct	
tccgcttcct cgctcaactga	
ctcgctgcgc tcgggtcgatc	3000
ggctgcggcg agcggtatca	
gctcaactcaa aggccgtaat	
acggttatcc acagaatcag	3060
gggataacgc agggaaagaac	
atgtgagcaa aaggccagca	
aaaggccagg aaccgtaaaa	3120
aggccgcgtt gctggcgatc	
ttccataggc tccgcccccc	
tgacgagcat cacaaaaatc	3180
gacgctcaag tcagaggtgg	
cgaaaacccga caggactata	
aagataccag gcgtttcccc	3240
ctggaaagctc ctcgtgcgc	
tctcctgttc cgaccctgccc	
gcttaccgga tacctgtccg	3300
cctttctccc ttccggaaagc	
gtggcgcttt ctcatagctc	
acgctgttagg tatctcagtt	3360
cggtgttaggt cgttcgctcc	
aagctggct gtgtgcacga	
accccccgtt cagcccgacc	3420
gctgcgcctt atccgtaac	
tatcgcttg agtccaaccc	
ggtaagacac gacttatcgc	3480
cactggcagc agccactgg	
aacaggatta gcagagcgag	
gtatgttaggc ggtgctacag	3540
agttcttcaa gtggggcct	
aactacggct acactagaag	
aacagtattt ggtatctgcg	3600
ctctgctgaa gccagttacc	
ttcggaaaaa gagttggtag	
ctcttgatcc ggcaaacaaa	3660
ccaccgctgg tagcggtgg	
ttttttgttt gcaagcagca	
gattacgcgc agaaaaaaag	3720
gatctcaaga agatccttg	
atctttcta cggggctctga	
cgctcagtgg aacgaaaact	3780
cacgttaagg gatttggc	
atgagattat caaaaaggat	
cttcacctag atcctttaa	3840
attaaaaatg aagttttaaa	
tcaatctaaa gtatatatga	
gtaaaacttgg tctgacagtt	3900
agaaaaactc atcgagcatc	
aaatgaaaact gcaattttatt	
catatcagga ttatcaatac	3960
catattttg aaaaagccgt	
ttctgtatg aaggagaaaa	
ctcaccgagg cagttccata	4020
ggatggcaag atcctgtat	
cggtctgcga ttccgactcg	
tccaaacatca atacaaccta	4080
ttaatttccc ctcgtcaaaa	
ataaggttat caagtgagaa	
atcaccatga gtgacgactg	4140
aatccggtga gaatggcaa	
agtttatgca tttctttcca	
gacttggca acaggccagc	4200
cattacgctc gtcataaaaa	
tcactcgcat caaccaaacc	
gttattcatt cgtgattgcg	4260
cctgagcgag acgaaatacg	
cgatcgctgt taaaaggaca	
attacaaaca ggaatcgaat	4320
gcaaccggcg caggaacact	
gccagcgcat caacaatatt	
ttcacctgaa tcaggatatt	4380
cttctaatac ctggaaatgct	
gttttcccgg ggatcgcatg	
ggtgagtaac catgcatcat	4440
caggagtacg gataaaatgc	
ttgatggtcg gaagaggcat	

aaattccgtc agccagttt a	gtctgaccat ctcatctgt a	acatcattgg caacgctacc	4500
tttgcatgt ttcagaaaca a	ctctggcgc atcgggcttc c	cataacaatc gatagattgt	4560
cgcacctgat tgcccacat t	atcgcgagc ccattatac c	catataaat cagcatccat	4620
gttggaaattt aatcgccgc tagagcaaga c	gtttcccg tgaatatggc tcatacttt	catacttt	4680
ccttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt c	tcatgagcg gatacatatt	tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgc acattcccc gaaaagtgcc	4740
acctgacgcg ccctgttagcg gcgcattaag cgcggcggt gtggtggtta cgccgacgt	4800		
gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttgc gcttcttcc cttccttct	4860		
cgccacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcg gggctccctt tagggttccg	4920		
atttagtgtt ttacggcacc tcgacccaa aaaacttgc tagggtgatg gttcacgtag	4980		
tgggccatcg ccctgtataga cggttttcg cccttgacg ttggagtcca cggtctttaa	5040		
tagtgactc ttgttccaaa ctggaaacaac actcaaccct atctcggtct attctttga	5100		
tttataaggg atttgccga ttccggccta ttggtaaaa aatgagctga tttaacaaaa	5160		
atttaacgcg aatttaaca aaatattaac gcttacaatt tgccattcgc cattcaggct	5220		
gcfgcaactgt tgggaaggc gatcggtgcg ggcctctcg ctattacgc agcccaagct	5280		
accatgataa gtaagtaata ttaaggtacg ggaggtactt ggagcggccg caataaaaata	5340		
tctttattt cattacatct gtgtgttgg ttttgtgt aatcgatagt actaacatac	5400		
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgc	5460		
agtgcagggt ccagaacatt tctctatcga tactcgaggg ccatgcaggt aggatttgag	5520		
ctgtgtttcc cgccctgatc ctctctctc tggcgccgg agcctccgt a	ggctccaagc	5580	
ctggcccaga ttccggcgcg cagccggct tccgcgcgtc cgacccatgc gggggctccg	5640		
gggctccggc gcggcaccgg gggcgctcg ggatctggct gaggctccaa ggcccgctgt	5700		
gccggctccct cctgctgggg caggtggcgg ctgcgcgc ccccgagcc caggggcccc	5760		
ctcagccgca acaaccagca aggacccccc gactcagccc caagccaccc gcatctgcac	5820		
tcagacgggg cgcacccgca gtgcagcctc ctgggtgggc gctggagcc cgccctgcccc	5880		
tgcctgccc gagaccccg ctcacgagca caggccgccc gggcacccca gaaacccggg	5940		
atggggcccc tgaattctct aggacggca ttca	gcatgg cttggcgct ctgcggctcc	6000	
ctgcccccca cccagcctcg ccccccgc a	ccccccagcc cctgcgaccg ccgccccccc	6060	
ccccggggcc ccagggcccc agcccgaccc ccccgccccg ctcttggctc gggttgcggg	6120		
ggcgccggccgg gggcgccggcg agggctccgc gggcgcccat tggcgccggc gcgaggccag	6180		
cggcccccg cggccctggg ccgcggctgg cgca	ctactata agagccggc gtggcgccc	6240	
gcagttcgcc tgctctccgg cggagctgcg tgaggccgg ccggccccgg ccccccctt	6300		
ccggccgccc cgcctcctg gcccacgcct gcccgcgtc tgcccaccag cgccctccatc	6360		
ggcaaggcg gccccgcgtc gacaagctt a	ctacgcgtag cgccattccg gtactgttgg	6420	
90	6480		

taaagccacc	atggaagacg	ccaaaaacat	aaagaaaggc	ccggcgccat	tctatccgct	6540
ggaagatgga	accgctggag	agcaactgca	taaggctatg	aagagatacg	ccctggttcc	6600
tggaacaatt	gctttacag	atgcacatat	cgaggtggac	atcacttacg	ctgagtactt	6660
cgaaatgtcc	gttcgggtgg	cagaagctat	gaaacgatat	gggctgaata	caaatcacag	6720
aatcgtcgt	tgca	actctttca	attctttatg	ccgggtgg	gcgcgttatt	6780
tatcgagtt	gcagttgcgc	ccgcaacga	catttataat	gaacgtgaat	tgctcaacag	6840
tatgggcatt	tcgcagccta	ccgtgggttt	cgttccaaa	aagggttgc	aaaaaatttt	6900
gaacgtgcaa	aaaaagctcc	caatcatcca	aaaaattatt	atcatggatt	ctaaaacgga	6960
ttaccaggga	tttcagtcga	tgtacacgtt	cgtcacatct	catctacctc	ccggttttaa	7020
tgaatacgat	tttgtgccag	agtccttcga	tagggacaag	acaattgcac	tgatcatgaa	7080
ctcctctgga	tctactggtc	tgcctaaagg	tgtcgctctg	cctcatagaa	ctgcctgcgt	7140
gagattctcg	catgccagag	atcctatttt	tggcaatcaa	atcattccgg	atactgcgat	7200
tttaagtgtt	gttccattcc	atcacggttt	tggaatgttt	actacactcg	gatatttgat	7260
atgtggattt	cgagtcgtct	taatgtatag	atttgaagaa	gagctgtttc	tgaggaggcct	7320
tcaggattac	aagattcaaa	gtgcgctgct	ggtgccaaacc	ctattctcct	tcttcgccaa	7380
aagcactctg	attgacaaat	acgatttatac	taatttacac	gaaattgctt	ctgggtggcgc	7440
tccccctct	aaggaagtgc	gggaagcggt	tgccaagagg	ttccatctgc	caggtatcag	7500
gcaaggat	gggctcactg	agactacatc	agctattctg	attacacccg	agggggatga	7560
taaaccgggc	gcggtcggta	aagttgttcc	attttttgaa	gcgaaggttg	tggatctgga	7620
taccgggaaa	acgctggcgc	ttaatcaaag	aggcgaactg	tgtgtgagag	gtcctatgat	7680
tatgtccggt	tatgtaaaca	atccggaagc	gaccaacgccc	ttgattgaca	aggatggatg	7740
gctacattct	ggagacatag	cttactggga	cgaagacgaa	cacttctca	tcgttgaccg	7800
cctgaagtct	ctgattaagt	acaaaggcta	tcaggtggct	cccgcgtaat	tggaatccat	7860
cttgcctccaa	caccccaaca	tcttcgacgc	aggtgtcgca	ggtctcccg	acgatgacgc	7920
cggtaactt	cccgccgccc	ttgttgtttt	ggagcacgga	aagacgatga	cggaaaaaaga	7980
gatcgtggat	tacgtcgcca	gtcaagtaac	aaccgcgaaa	aagttgcgcg	gaggagttgt	8040
gtttgtggac	gaagtaccga	aaggcttac	cggaaaaactc	gacgcaagaa	aaatcagaga	8100
gatcctcata	aaggccaaga	agggcggaaa	gatgccgtg	taatctcgag	acgttagggta	8160
cc						8162

<210> 21  
<211> 3579

5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> construcción recombinante

10 <400> 21

ctaaattgt a	60
agcgtaata	
ttttgttaaa	
attcgctta	
aattttgtt	
aatcagctc	
attttttaac	120
caataggccg	
aatcggcaa	
aatcccttat	
aatcaaaag	
aatagaccga	
gatagggttg	180
agtgttgttc	
cagttggaa	
caagagtcca	
ctattaaaga	
acgtggactc	
caacgtcaaa	240
ggcgaaaaaa	
ccgtctatca	
gggctatggc	
ccactacgtg	
aaccatcacc	
ctaatacg	300
tttttgggt	
cgaggtgccg	
taaagcacta	
aatcggAAC	
ctaaaggag	
cccccgattt	360
agagcttgac	
ggggaaAGCC	
ggcgaacgtg	
gcgagaaagg	
aagggaaagaa	
agcgaaagga	420
gcgggcgcta	
gggcgctggc	
aagtgttagcg	
gtcacgctgc	
gcgttaaccac	
cacacccgCC	480
gcgttaatg	
cgccgctaca	
gggcgcgtcc	
cattGCCat	
tcaggctgcg	
caactgttgg	540
gaagggcgat	
cggcgcgggc	
ctcttcgcta	
ttacGCCAGC	
tggcgaaagg	
gggatgtgct	600
gcaaggcgat	
taagttgggt	
aacGCCAGGG	
ttttcccagt	
cacgacgtt	
taaaacgacg	660
gccagtgagc	
gcgcgtata	
cgactcacta	
tagggcgaat	
tgggtaccct	
acgtctcgag	720
ggatccccaa	
atctctgtag	
gtagttgtc	
caattatgtc	
acaccacaga	
agtaaggttc	780
cttcacaaag	
atgcctgac	
acgatttcct	
gcacaggctt	
gagccatata	
ctcatacatc	840
gcatcttggc	
cacgtttcc	
acgggtttca	
aaattaatct	
caagttctac	
gcttaacgct	900
ttcgccctgtt	
cccagttatt	
aatatattca	
acgctagaac	
tcccctcagc	
gaagggaaagg	960
ctgagcacta	
cacgcgaagc	
accatcaccg	
aacttttga	
taaaactcttc	
cgttccgact	1020
tgctccatca	
acggttcagt	
gagacttaaa	
cctaactctt	
tcttaatagt	
ttcggcatta	1080
tccactttta	
gtgcgagaac	
cttcgtcagt	
cctggatacg	
tcactttgac	
cacgcctcca	1140
gcttttccag	
agagcgggtt	
ttcattatct	
acagagtatc	
ccgcagcgtc	
gtatTTATTG	1200
tcggtactat	
aaaacccttt	
ccaatcatcg	
tcataatttc	
tttgttacc	
agattttggc	1260
ttttgtatac	
cttttgaat	
ggaatctaca	
taaccaggTT	
tagtcccgtg	
gtacgaagaa	1320
aagttttcca	
tcacaaaaga	
tttagaagaa	
tcaacaacat	
catcaggatc	
catggtggt	1380
ttaccaacag	
tacggaaatg	
ccgctagcgt	
agctgggGCC	
gcgagctcca	
gcttttgttc	1440
cctttagtga	
gggttaattt	
cgcgttggc	
gtaatcatgg	
tcatactgt	
ttccctgttg	1500
aaattgttat	
ccgctcacaa	
ttccacacaa	
catacgagcc	
ggaagcataa	
agtgtaaAGC	1560
ctgggggtGCC	
taatgagtga	
gctaactcac	
attaattgcg	
ttgcgtctac	
tgcccgcttt	1620
ccagtcggga	
aacctgtcgt	
gccagctgca	
ttaatgaatc	
ggccaacgcg	
cggggagagg	1680
cggtttgcgt	
attgggcgt	
cttccgcttc	
ctcgctca	
gactcgctgc	
gctcggtcgt	1740
tcggctgccc	
cgagcggtat	
cagctcactc	
aaaggcggta	
atacggttat	
ccacagaatc	1800
aggggataac	
gcaggaaaga	
acatgtgagc	
aaaaggccag	
caaaaggCCA	
ggaaccgtaa	1860
aaaggccgcg	
ttgctggcgt	
ttttccatag	
gctccgcccc	
cctgacgagc	
atcacaaaaa	1920
tcgacgctca	
agtcaaggtt	
ggcgaaaccc	
gacaggacta	
taaagatacc	
aggcgTTTCC	1980
cccttggaaagc	
tccctcgctc	
gctctccctgt	
tccgaccctg	
ccgcttaccg	
gataacctgtc	2040
cgccTTTCTC	
ctttcgggaa	
gcgtggcgct	
ttctcatagc	
tcacgctgt	

ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcggtcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccgg	2100
ttcagccga	ccgctgcgcc	ttatccgta	actatcgct	tgagtccaac	ccggtaagac	2160
acgacttatac	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	2220
gcggtgctac	agagttcttg	aagtggtggc	ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	2280
ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtt	ccttcggaaa	aagagtttgt	agctcttgat	2340
ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcggtg	gttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	2400
gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatctttc	tacgggtct	gacgctcagt	2460
ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttacacct	2520
agatccttt	aaattaaaaaa	tgaagtttaa	aatcaatcta	aagtatataat	gagtaaactt	2580
ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	2640
gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	2700
catctggccc	cagtgctgca	atgataccgc	gagaaccacg	ctcaccggct	ccagatttat	2760
cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccc	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	2820
cctccatcca	gtcttattaaat	tgttgccggg	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttataa	2880
gtttgcgcaa	cgttgcgtcc	attgctacag	gcatcgtgg	gtcacgctcg	tcgtttggta	2940
tggcttcatt	cagctccggt	tcccaacgat	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgc	3000
gcaaaaaagc	ggtagctcc	ttcggtcctc	cgatcggtt	cagaagtaag	ttggccgcag	3060
tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	3120
gatgctttc	tgtgactgg	gagtactcaa	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	3180
gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	3240
taaaagtgt	catcattgga	aaacgttctt	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	3300
tgttgagatc	cagttcgatg	taacccactc	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	3360
ctttcaccag	cgttctggg	tgagcaaaaa	caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	3420
taagggcgac	acggaaatgt	tgaataactca	tactcttcct	ttttcaatata	tattgaagca	3480
tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	acatatttga	atgtatttag	aaaaataaaac	3540
aaataggggt	tccgcgcaca	tttccccgaa	aagtgccac			3579

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 8086

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

10 &lt;400&gt; 22

ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagcc caagctacca tgataagtaa gtaatattaa	60
ggtacgggag gtacttggag cggccgcaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt	120
gttgggtttt tgtgtgaatc gatagtacta acatacgctc tccatcaaaa caaaacgaaa	180

caaaacaaac tagcaaata ggctgtcccc agtgcaagtg caggtgccag aacatttctc	240
tatcgataac ttcccggtcg gtctgtgggt gcagggggtg ccgcctcaca tgtgtgattc	300
gtgccttgcg ggccctggcc tccgggggtgc tgggtaacga ggaggggcgc ggagccgcag	360
aagcccaccc tggtatgttg acgcggtgcc agcgagaccg cgagaggaag acgggggtgg	420
gcggggccag gatggagagg ggccgagttg gcaggagtca tggcagacgc cacattcgcg	480
acatctcccc cacacccct ctggctctgt ccgcaacatt tccaaacagg agtcccggga	540
gagggggaga ggggctgctg gtctgaggct aagaaggcga gagccttcga cccggagaga	600
ggccgcggcc cctgcccagt gggcagcgtg gaagttcca tacaaggagg tggaaaggag	660
accccccccc cccttcactg ccctgtgcag agatgagccg ggggtgcagg atggagccc	720
atggcacttc gctacggat ggtccaggc tcccggttgg gggtgcagga gagaagagac	780
tggctggag gagggagagg gcgggagcaa aggccgggg gagtggtcag cagggagagg	840
ggtggggggt agggtggagc ccgggctggg aggagtcggc tcacacataa aagctgaggc	900
actgaccagc ctgcaaactg gacattagct tctcctgtga aagagacttc cagttccctc	960
ctcctccctc tcctccctc cctcctgccc cagcagcct tctgctgagc tgtaggggga	1020
tcttctagag tcggctagcg gcattccggt actgttggta aagccaccat ggaagacgcc	1080
aaaaacataa agaaaggccc ggcgcattc tatccgctgg aagatggaac cgctggagag	1140
caactgcata aggctatgaa gagatacgcc ctggttcctg gaacaattgc ttttacagat	1200
gcacatatcg aggtggacat cactacgct gagtacttcg aatgtccgt tcggttggca	1260
gaagctatga aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa tcgtcgatg cagtaaaaac	1320
tctttcaat tctttatgcc ggtgttggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgcc	1380
gcgaacgaca tttataatga acgtgaattt ctcaacagta tgggcatttc gcagcctacc	1440
gtggtgttcg tttccaaaaa ggggttgcaa aaaatttga acgtcaaaa aaagctccca	1500
atcatccaaa aaattattat catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg	1560
tacacgttcg tcacatctca tctacccccc ggttttaatg aatacgattt tgtgccagag	1620
tccttcgata gggacaagac aattgcactg atcatgaact cctctggatc tactggtctg	1680
cctaaaggtg tcgctctgcc tcatagaact gcctgcgtga gattctcgca tgccagagat	1740
cctatttttgc gcaatcaaatt cattccggat actgcgattt taagtgttgc tccattccat	1800
cacggttttgc gaatgtttac tacactcgga tatttgcattt gttggatgc agtcgtctta	1860
atgtatagat ttgaagaaga gctgtttctg aggagccccc aggattacaa gattcaaagt	1920
gcgcgtgtgg tgccaaaccct attctccccc ttgcggaaaaa gcactctgat tgacaaatac	1980
gatttatcta atttacacga aattgcattt ggtggcgctc ccctctctaa ggaagtcggg	2040
gaagcgggttg ccaagagggtt ccatctgccca ggtatcaggc aaggatatgg gctcaactgag	2100
actacatcgat ctattctgat tacacccgag gggatgata aaccgggcgc ggtcggtaaa	2160
gttggccat ttttgaagc gaagggtgtg gatctggata ccggaaaaac gctggcggtt	2220

aatcaaagag	gcgaactgtg	tgtgagaggt	cctatgatta	tgtccggta	tgtaaacaat	2280
ccggaagcga	ccaacgcctt	gattgacaag	gatggatggc	tacattctgg	agacatagct	2340
tactggacg	aagacgaaca	cttcttcatc	gttgaccgcc	tgaagtctct	gattaagtac	2400
aaaggctatc	aggtggctcc	cgctgaattt	gaatccatct	tgctccaaca	ccccaaacatc	2460
ttcgacgcag	gtgtcgcagg	tcttcccac	gatgacgccc	gtgaacttcc	cggccgcgtt	2520
gttgtttgg	agcacggaaa	gacgatgacg	aaaaaaagaga	tcgtggatta	cgtcgccagt	2580
caagtaacaa	ccgcgaaaaaa	gttgcgcgga	ggagttgtgt	ttgtggacga	agtaccgaaa	2640
ggcggaaaga	tcgcccgtta	atctcgaggg	ccatgcaggt	aggatttgag	ctgtgtttcc	2700
cgcctgatc	ctctctccctc	tggcggccgg	agccctccgt	ggctccaagc	ctggcccaga	2820
ttcggcggcg	cagccggcct	tccgcgcgtc	cgcacccatgc	gggggctcccg	gggctccggc	2880
gcggcaccgg	ggggcgctcg	ggatctggct	gaggctccaa	ggcccgctgt	gccggctccct	2940
cctgctgggg	caggtggcgg	ctgcgcgccc	cgcacccagcc	cagggggccc	ctcagccgca	3000
acaaccagca	aggacccccc	gactcagccc	caagccacct	gcatctgcac	tcagacgggg	3060
cgcacccgca	gtgcagccctc	ctgggtgggc	gctgggagcc	cgcctggccc	tgcctgccc	3120
gagacccca	ctcacgagca	caggccgccc	ggcacccca	gaaacccggg	atggggcccc	3180
tgaattctct	aggacgggca	ttcagcatgg	ccttggcgct	ctgcccgtcc	ctgccccccca	3240
cccagccctcg	cccccccgca	ccccccagcc	cctgcgaccg	ccgccccccc	ccccggggcc	3300
ccagggcccc	agcccgccacc	ccccgccccg	ctcttggctc	gggttgcggg	ggcggggccgg	3360
gggcggggcg	agggctccgc	gggcgcctat	tggcgcgggc	gcgaggccag	cggccccgcg	3420
cggccctgg	ccgcggctgg	cgcgactata	agagccgggc	gtgggcgc	gcagttcgcc	3480
tgctctccgg	cggagctgcg	tgaggcccg	ccggccccgg	ccccccctt	ccggccgc	3540
ccgcctcccg	gcccacgcct	gcccgcgtc	tgcaccacag	cgcctccatc	ggcaaggcg	3600
gccccgcgtc	gacaagcttg	gcattccgt	actgttggta	aagccaccat	ggaagacgc	3660
aaaaacataa	agaaaggccc	ggcgcatttc	tatccgctgg	aagatgaaac	cgtggagag	3720
caactgcata	aggctatgaa	gagatacgcc	ctggttcccg	gaacaattgc	ttttacagat	3780
gcacatatcg	aggtggacat	cacttacgt	gagtacttcg	aatgtccgt	tcgggtggca	3840
gaagctatga	aacgatatgg	gctgaataca	aatcacagaa	tcgtcgatg	cagtaaaaac	3900
tctcttcaat	tctttatgcc	ggtgttgggc	gcgttattta	tcggagttgc	agttgcgc	3960
gcgaacgaca	tttataatga	acgtgaattt	ctcaacagta	tggcatttc	gcagcctacc	4020
gtgggtttcg	tttccaaaaaa	gggttgc	aaaatttga	acgtgc	aaaaaa	4080
atcatccaaa	aaatttattat	catggattct	aaaacggatt	accaggatt	tcagtcgat	4140
tacacgttcg	tcacatctca	tctacccccc	ggtttaatg	aatacgattt	tgtgccagag	4200
tccttcgata	gggacaagac	aattgcactg	atcatgaact	cctctggatc	tactggtctg	4260

cctaaagggtg tcgctctgcc tcatagaact gcctgcgtga gattctcgca tgccagagat 4320  
cctattttg gcaatcaaat cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat 4380  
cacggtttg gaatgtttac tacactcgga tatttgatat gtggatttcg agtcgtctt 4440  
atgtatagat ttgaagaaga gctgtttctg aggagccttc aggattacaa gattcaaagt 4500  
gcgctgctgg tgccaaaccct attctcccttc ttgcccaaaa gcactctgat tgacaaatac 4560  
gatttatcta atttacacga aattgcttct ggtggcgctc ccctctctaa ggaagtcggg 4620  
gaagcggttg ccaagaggtt ccacatcgcca ggtatcaggc aaggatatgg gctcaactgag 4680  
actacatcag ctattctgat tacacccgag ggggatgata aaccgggcgc ggtcggtaaa 4740  
gttgttccat ttttgaagc gaagggttgtg gatctggata ccggggaaaac gctggcggtt 4800  
aatcaaagag gcgaactgtg tgtgagaggt cctatgatta tgtccggtaa tgtaaacaat 4860  
ccggaagcga ccaacgcctt gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct 4920  
tactggacg aagacgaaca cttcttcattc gttgaccgcc tgaagtctct gattaagtac 4980  
aaaggctatc aggtggctcc cgctgaattt gatatccatct tgctccaaca ccccaacatc 5040  
ttcgacgcag gtgtcgagg tttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgccgcccgtt 5100  
gttgtttgg agcacggaaa gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgcccagt 5160  
caagtaacaa ccgcgaaaaaa gttgcgcgga ggagtttgtt ttgtggacga agtaccgaaa 5220  
ggtcttaccg gaaaactcga cgcaagaaaa atcagagaga tcctcataaaa ggccaagaag 5280  
ggcggaaaaga tcgcccgtta attcttagagt cggggcggcc ggccgcttc agcagacatg 5340  
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 5400  
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgttttta tttgtAACCA ttataagctg caataaacaa 5460  
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt 5520  
ttttaagca agtaaaaccc tacaatgt ggtaaaatcg ataaggatcc gtcgaccgat 5580  
gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccggtgg gcgcggggca tgactatcg 5640  
cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacaggtgc cggcagcgct 5700  
cttccgcttc ctcgctcaact gactcgctgc gctcggtcg tccggctgcgg cgagcggat 5760  
cagctcaactc aaaggcggtta atacggttat ccacagaatc agggataac gcaggaaaga 5820  
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 5880  
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 5940  
ggcggaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaaagc tccctcggtc 6000  
gctctccgtt tccgaccctg ccgcttaccg gataacctgtc cgccttctc cttccggaa 6060  
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgtta ggtatctcag ttcgggttag gtcgttcgct 6120  
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccgg tttagccccga ccgctgcgccttccatccggta 6180  
actatcgctc tgagtccaaac ccggtaagac acgacttatac gccactggca gcagccactg 6240  
gtAACAGGAT tagcagagcg aggtatgttag gcgggtctac agagttcttgc aagtgggtggc 6300

ctaactacgg	ctacactaga	agaacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtt	6360
ccttcggaaa	aagagtttgt	agctcttgat	ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcggtg	6420
gttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	6480
tgatctttc	taaaaaaaaa	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttgg	6540
tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttacacct	agatccttt	aaattaaaaa	tgaagttta	6600
aatcaatcta	aagtatata	gagtaaactt	ggtctgacag	ttagaaaaac	tcatcgagca	6660
tcaaataaaaa	ctgcaattt	ttcatatcag	gattatcaat	accatattt	tgaaaaagcc	6720
gtttctgtaa	tgaaggagaa	aactcaccga	ggcagttcca	taggatggca	agatcctggt	6780
atcggtctgc	gattccgact	cgtccaaacat	caatacaacc	tattaatttc	ccctcgtaa	6840
aaataaggtt	atcaagttag	aaatcaccat	gagtgacgac	tgaatccggt	gagaatggca	6900
aaagtttatg	catttcttc	cagacttgtt	caacaggcca	gccattacgc	tcgtcatcaa	6960
aatcaactcgc	atcaaccaaa	ccgttattca	ttcgtgattt	cgcctgagcg	agacgaaata	7020
cgcgatcgct	gttaaaagga	caattacaaa	caggaatcga	atgcaaccgg	cgcaggaaca	7080
ctgccagcgc	atcaacaata	tttcacctg	aatcaggata	ttcttcta	acctggaatg	7140
ctgtttccc	ggggatcgca	gtggtgagta	accatgcattc	atcaggagta	cggtttttat	7200
gtttgatggt	cggaaagaggc	ataaaattccg	tcagccagtt	tagtctgacc	atctcatctg	7260
taacatcatt	ggcaacgcta	cctttccat	gtttcagaaa	caactctggc	gcatcgggct	7320
tcccatacaa	tcgatagatt	gtcgcacctg	attgcccgac	attatcgcg	gcccatttat	7380
acccatataa	atcagcatcc	atgttggaat	ttaatcgcg	cctagagcaa	gacgtttccc	7440
gttgaatatg	gctcataactc	ttccttttc	aatattattt	aagcattttat	cagggttatt	7500
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaaa	taaacaata	ggggttccgc	7560
gcacatttcc	ccgaaaaagtg	ccacctgacg	cgcctgttag	cggcgcatta	agcgcggcgg	7620
gtgtgggtgt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccttagcg	ccgcctcctt	7680
tcgctttctt	cccttcctt	ctcgccacgt	tcgcccgtt	tccccgtcaa	gctctaaatc	7740
gggggctccc	tttagggttc	cgattttagt	cttacggca	cctcgacccc	aaaaaaacttg	7800
attagggtga	tggttcacgt	agtggccat	cgcctgata	gacggttttt	cgcctttga	7860
cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	acactcaacc	7920
ctatctcggt	ctattcttt	gatttataag	ggattttgcc	gatttcggcc	tattggttaa	7980
aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattttaa	caaaatatta	acgcttacaa	8040
tttgcattc	gccattcagg	ctgcgcaact	gttgggaagg	gcgatc		8086

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 3843

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

<400> 23

ctaaattgt a agcgtaata ttttgtaaa attcggtta aattttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcgca aatccctat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggtt agtgttgttc cagttggaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggctatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatcaagt ttttgggt cgaggtgccc taaagcacta aatcggaacc ctaaaggag	300
cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgttaaccac	420
cacacccgcc gcgtttaatg cgccgctaca gggcgcttcc cattcgccat tcaggctg	480
caactgttgg gaagggcgat cggtgcgggc ctcttcgcta ttacgcccgc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgcccaggg ttttccagt cacgacgtt	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtataa cgactcacta tagggcgaat tgggtaccct	660
acgtctcgag gtagctgcta gccgactcta gaagatcccc ctacagctca gcagaaggct	720
cgctgggca ggaggaggag gaggaagagg aggaggagga agctggaagt ctcttcaca	780
ggagaagcta atgtccagtt tgcaggctgg tcagtgcctc agctttatg tgtgagccga	840
ctcctccag cccgggctcc accctacccc ccacccctct ccctgctgac cactccccg	900
cgcccttgct cccgcctct ccctccccc agccagtctc ttctctccgt caccggaaac	960
cgggagccct ggaccatccc gtagcgaagt gccatggct cccatcctgc acccccggct	1020
catctctgca cagggcagtg aagggggggg ggggtctcct tcccacctcc ttgtatggaa	1080
acttccacgc tgcccactgg gcaggggccc cggcctctct ccgggtcgaa ggctctgccc	1140
ttcttagcct cagaccagca gcccctctcc ccctctcccg ggactcctgt ttggaaatgt	1200
tgcggacaga gccagagggg gtgtggggga gatgtcgca atgtggcgtc tgccatgact	1260
cctgccaact cggccctctcc ccatcctggc cccgcccacc cccgtcttcc tctcgccggtc	1320
tcgctggcac cgctcaaca taccagggtg ggcttctg gctccgcgcc cctcctcg	1380
acccagcacc ccggaggcca gggcccaca ggcacgaatc acacatgtga ggcggcaccc	1440
cctgcaccca cagaccgacc gggaaattat cgatagagaa atgttctggc acctgcactt	1500
gcactgggaa cagcctattt tgctagttt tttgtttcg tttgtttt atggagagcg	1560
tatgttagta ctatcgattc acacaaaaaa ccaacacaca gatgtaatga aaataaagat	1620
attttattgc ggccgcgagc tccagctttt gttcccttta gtgagggtt attgcgcgt	1680
tggcgtaatc atggtcatacg ctgtttccgt tggaaattt tttccgttcc acaattccac	1740
acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg tgcctaattga gtgagctaac	1800
tcacattaat tgcgttgcgc tcactgccc ctttccgttcc gggaaacctg tcgtgcgc	1860
tgcattaaatg aatcgccaa cgcgcgggaa gaggcggtt gcttattggg cgctttccg	1920
cttcctcgct cactgactcg ctgcgcgttgc ttgttccgttcc gggcgagcg gtatcagctc	1980

actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt	2040
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcggtgctg gcgttttcc	2100
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	2160
acccgacagg actataaaaga taccaggcgt ttcccccgtt aagctccctc gtgcgctctc	2220
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg	2280
cgctttctca tagctcacgc tgttaggtatc tcagttcggt gtaggtcggt cgctccaagc	2340
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgcccttatcc ggtaactatc	2400
gtctttagtgc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca	2460
ggatttagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact	2520
acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgtctc gctgaagcca gttaccttcg	2580
aaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt	2640
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct	2700
tttctacggg gtctgacgct cagtggAACG aaaaactcact ttaagggatt ttggcatga	2760
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaattt aaaaatgaagt tttaaatcaa	2820
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac	2880
ctatctcagc gatctgtcta tttcggtcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	2940
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagaac	3000
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgc	3060
gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgtgc cgggaagcta	3120
gagtaagtag ttcgcccattt aatagttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg	3180
tggtgtcacg ctcgtcggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc	3240
gagttacatg atccccatg ttgtcaaaaa aagcggttag ctccctcggt cctccgatcg	3300
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt	3360
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt	3420
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttgc cccggcgtca atacggata	3480
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc	3540
aaaaactctc aaggatcttta ccgctgttga gatccagttc gatgtAACCC actcgtgcac	3600
ccaaactgatc ttctacttca ccagcggttcc tgggtgagca aaaacaggaa	3660
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	3720
tccttttca atattattga agcatttatac agggttatttgc tctcatgagc ggatacatat	3780
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag ggggtccgcg cacatttcccc cgaaaagtgc	3840
cac	3843

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 6084

&lt;212&gt; ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción recombinante

5

<400> 24

gcggccgcaa	taaaaatatct	ttatTTcat	tacatctgtg	tgttggtttt	ttgtgtgaat	60
cgatagtact	aacatacgct	ctccatcaaa	acaaaacgaa	acaaaacaaa	ctagcaaaat	120
aggctgtccc	cagtgcagt	gcaggtgcca	gaacatttct	ctatcgataa	cttcccggtc	180
ggtctgtggg	tgcaggggt	gccgcctcac	atgtgtgatt	cgtgccttgc	gggccttggc	240
ctccgggtg	ctgggtaacg	aggagggcg	cggagccgca	gaagcccacc	ctggtatgtt	300
gacgcggtgc	cagcgagacc	gcgagaggaa	gacgggggtg	ggcggggcca	ggatggagag	360
gggccgagtt	ggcaggagtc	atggcagacg	ccacattcgc	gacatctccc	ccacaccccc	420
tctggctctg	tccgcaacat	ttccaaacag	gagtcccggg	agagggggag	aggggctgct	480
ggtctgaggc	taagaaggc	agagccttcg	acccggagag	aggccgcggc	ccctgcccag	540
tggcagcgt	ggaagttcc	atacaaggag	gtgggaagga	gacccccc	ccccttca	600
gccctgtca	gagatgagcc	gggggtgcag	gatgggagcc	catggcactt	cgctacggga	660
tggtccaggg	ctcccggtt	ggggtgcagg	agagaagaga	ctggctggga	ggagggagag	720
ggcgggagca	aaggcgcggg	ggagtggtca	gcagggagag	gggtgggggg	tagggtggag	780
cccgggctgg	gaggagtcgg	ctcacacata	aaagctgagg	cactgaccag	cctgcaaact	840
ggacattagc	ttctcctgt	aaagagactt	ccagcttcct	cctccctc	ttcctcctcc	900
tcctcctgcc	ccagcgagcc	ttctgctgag	ctgtaggggg	atcttctaga	gtcggctagc	960
ggcattccgg	tactgttggt	aaagccacca	tggatcctga	tgttgtt	gattttctta	1020
aatctttgt	gatggaaaac	ttttcttcgt	accacgggac	taaacctggt	tatgttagatt	1080
ccattcaaaa	aggtatacaa	aagccaaaat	ctgg tacaca	aggaattat	gacgatgatt	1140
ggaaagggtt	ttatagtacc	gacaataat	acgacgctgc	gggatactct	gtagataatg	1200
aaaacccgct	ctctggaaaa	gctggaggcg	tggtcaaagt	gacgtatcca	ggactgacga	1260
aggttctcgc	actaaaagt	gataatgccg	aaactattaa	gaaagagtta	ggtttaaagtc	1320
tcactgaacc	gttgcggag	caagtcggaa	cggaaagagtt	tatcaaagg	ttcggtgatg	1380
gtgcttcgcg	tgttagtgctc	agccttcct	tcgctgaggg	gagttctagc	gttgaatata	1440
ttaataactg	ggaacaggcg	aaagcgttaa	gcgtagaact	tgagattaat	tttgaacccc	1500
gtggaaaacg	tggccaagat	gcgtatgtat	agtatatggc	tcaaggctgt	gcaggaaatc	1560
gtgtcaggcg	atcttgtga	aggaacctta	cttctgtggt	gtgacataat	tggacaaaact	1620
acctacagag	atttggggat	ccctcgaggg	ccatgcaggt	aggattttag	ctgtgtttcc	1680
cgccctgatc	ctctcctc	tggcggccgg	agcctccgt	ggctccaagc	ctggcccaga	1740
ttcggcggcg	cagccggcct	tccgcgcgtc	cgcacctagc	gggggctccg	gggctccggc	1800
gcggcaccgg	ggggcgctcg	ggatctggct	gaggctccaa	ggcccgctg	gccggctcct	1860

cctgctgggg caggtggcg	ctgcgcgccc cgccc gagcc caggggcccc	ctcagccgca	1920
acaaccagca aggacccccc	gactcagccc caagccacct	gcatctgcac	1980
cgcacccgca gtgcagcctc	ctggtggggc gctgggagcc	cgcctgcccc	2040
gagacccag ctcacgagca	caggccgccc gggcacccca	gaaacccggg	2100
tgaattctct aggacggca	ttcagcatgg ccttggcgct	ctgcggctcc	2160
cccagcctcg ccccccgc	ccccccagcc cctgcgaccg	ccgcggggcc	2220
ccagggcccc agcccgcacc	ccccgccccg ctcttggctc	gggttgcggg	2280
gggcggggcg agggtccgc	gggcgccccat tggcgccggc	gcgaggccag	2340
cggccctggg ccgcggctgg	cgcgactata agagccggc	gtggcgccc	2400
tgctctccgg cggagctgcg	tgaggccccgg ccccccctt	ccggccgc	2460
ccgcctcctg gcccacgcct	gcccgcgctc tgcccaccag	cgcctccatc	2520
gccccgcgtc gacaagcttg	gcattccgt actgttgta	aagccaccat	2580
gatgttggtt attcttctaa	atctttgtg atggaaaact	tttctcgta	2640
aaacctggtt atgtagattc	cattcaaaaa ggtatacataa	agccaaaatc	2700
ggaaattatg acgatgattg	gaaagggttt tatagtaccg	acaataaata	2760
ggatactctg tagataatga	aaacccgctc tctggaaaag	ctggaggcgt	2820
acgtatccag gactgacgaa	ggttctcgca ctaaaagtgg	ataatgccga	2880
aaagagttag gtttaagtct	cactgaaccg ttgatggagc	aagtccgaac	2940
atcaaaaggt tcggtgatgg	tgcttcgctgtragtgc	gcctccctt	3000
agttctagcg ttgaatatat	taataactgg gaacaggcga	aagcgttaag	3060
gagattaatt ttgaaacccg	tggaaaacgt ggccaagatg	cgatgtatga	3120
caaggctgtg cagggaaatcg	tgtcaggcga tctttgtgaa	ggaaccttac	3180
tgacataatt ggacaaaacta	cctacagaga tttggggatc	ctctagagtc	3240
gccgcttcga gcagacatga	taagatacat tcatgatgtt	ggggcggccg	3300
gcagtgaaaa aaatgctta	tttgtgaaat ttgtgatgct	attgctttat	3360
tataagctgc aataaacaag	ttaacaacaa caattgcatt	cattttatgt	3420
gggggagggtg tgggaggttt	tttaaagcaa gtaaaacctc	tacaaatgtg	3480
taaggatccg tcgaccgatg	cccttgagag cttcaaccc	agtcagctcc	3540
cgcggggcat gactatcg	gccgcactta tgactgtctt	ctttatcatg	3600
gacaggtgcc ggcagcgctc	ttccgcttcc tcgctca	actcgctgcg	3660
cggctgcggc gagcggtatac	agtcactca aaggcgtaa	tacggttatac	3720
ggggataacg cagggaaagaa	catgtgagca aaaggccagc	aaaaggccag	3780
aaggccgcgt tgctggcg	tttccatagg ctccgcccc	ctgacgagca	3840
cgacgctcaa gtcagagg	gtcagagg	acaggactat	3900
gcaaaacccg	gcaaaacccg	aaagatacca	ggcg

cctggaaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc	3960
gcctttctcc cttcggaaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt	4020
tcggtgttagg tcgtrtcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac	4080
cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatacg	4140
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgttagg cggtgctaca	4200
gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc	4260
gctctgctga agccagttac cttcgaaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa	4320
accaccgctg gtacgggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa	4380
ggatctcaag aagatcctt gatctttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac	4440
tcacgttaag ggatttttgtt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta	4500
aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtataatag agtaaacttg gtctgacagt	4560
tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcataatcagg attatcaata	4620
ccatattttt gaaaaagccg tttctgtat gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat	4680
aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc gtccaaacatc aatacaacct	4740
attaatttcc cctcgtcaaa aataaggta tcaagtgaga aatcaccatg agtgcgact	4800
gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttcttcc agacttgttc aacaggccag	4860
ccattacgct cgtcatcaaa atcaactcgca tcaaccaaacc cgttattcat tcgtgattgc	4920
gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgctg taaaaggac aattacaaac aggaatcgaa	4980
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgc tcaacaatat tttcacctga atcaggatat	5040
tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgacg tggtagttaa ccatgcatca	5100
tcaggagtac ggataaaaatg cttgatggtc ggaagaggca taaattccgt cagccagtt	5160
agtctgacca tctcatctgt aacatcattt gcaacgctac ctttgcctat tttcagaaac	5220
aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagatttgc tgcacctga ttgcccgaca	5280
ttatcgcgag cccattataa cccatataaa tcagcatcca tggtagttaa taatcgcggc	5340
ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcatactct tccttttca atattattga	5400
agcatttatac agggttatttgc tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat tttagaaaaat	5460
aaacaaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgc gcccgttagc	5520
ggcgcattaa ggcggcggg tgggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc	5580
gccctagcgc cggctccctt cgctttcttc cttcccttc tgcacgtt cgccggctt	5640
ccccgtcaag ctctaaatcg gggctccctt ttagggttcc gattttagtgc ttacggcac	5700
ctcgacccca aaaaacttgc ttaggggtat gggtcacgtt gtggccatc gcccgtatag	5760
acggtttttc gccccttgac gttggagtcc acgttctta atagtggact ctgtttccaa	5820
actggaaacaa cactcaaccc tatctcgttc tattcttttgc atttataagg gattttgcgg	5880
atttcggcctt attggtaaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaatttttaac	5940

<b>aaaatattaa cgcttacaat ttgccattcg ccattcaggc tgcgcaactg ttgggaaggg</b>	<b>6000</b>
<b>cgatcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagcccaagc taccatgata agtaagtaat</b>	<b>6060</b>
<b>attaaggtac gggaggtact tgga</b>	<b>6084</b>

## REIVINDICACIONES

## 1. Una construcción de ácido nucleico, que comprende:

5 un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19; y

10 un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando el segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción de IGF-II seleccionada de las secuencias P4 de IGF-II y P3 de IGF-II,  
o que comprende:

15 un primer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho primer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II; y

20 un segundo marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho segundo marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II,  
en la que:

25 la secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 es un promotor cuya secuencia es SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 2; la secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II es una secuencia seleccionada de SEC ID Nº: 9 y SEC ID Nº: 13; y la secuencia P3 de IGF-II es SEC ID Nº: 17 o se selecciona de SEC ID Nº: 8 y SEC ID Nº: 12;

## 2. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la toxina diftérica es toxina diftérica A (DTA).

## 3. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 2, en la que la toxina diftérica comprende una secuencia como se expone en SEC ID Nº: 7.

## 4. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha construcción de ácido nucleico es un plásmido.

## 5. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el primer marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y el segundo marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

## 25 6. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que el primer marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 y el segundo marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II.

## 30 7. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicho primer marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P3 de IGF-II y dicho segundo marco abierto de lectura está unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

## 8. Un vector de expresión eucariota que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1.

## 35 9. Una construcción de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 para uso en el tratamiento de un tumor, o inhibición de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral en un sujeto humano que lo necesite, en la que una célula de dicho tumor es capaz de expresar un transcripto dirigido por el promotor de H19, un transcripto dirigido por el promotor P3 de IGF-II o un transcripto dirigido por el promotor P4 de IGF-II.

## 40 10. La construcción de ácido nucleico para uso en el tratamiento de un tumor, o inhibición de la progresión tumoral o inhibición de metástasis tumoral de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho tumor es un carcinoma.

## 45 11. La construcción de ácido nucleico para uso en el tratamiento de un tumor, o inhibición de la progresión tumoral o inhibición de metástasis tumoral de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho tumor se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de ovario y un carcinoma pancreático.

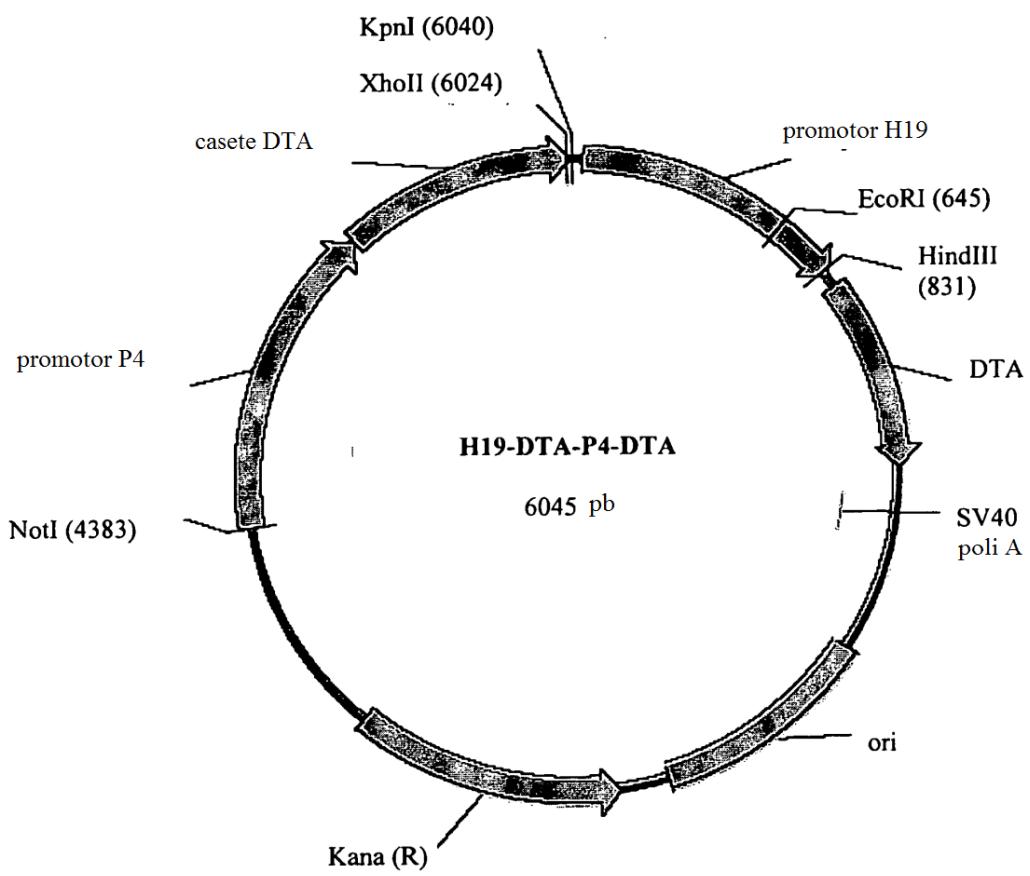
## 50 12. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 7, en la que dicha construcción de ácido nucleico comprende además un tercer marco abierto de lectura que codifica una toxina diftérica, estando dicho tercer marco abierto de lectura unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción específica de H19.

## 45 13. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en el tratamiento de un tumor, inhibición de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral en un sujeto humano que lo necesite, en la que una célula de dicho tumor es capaz de expresar un transcripto dirigido por el promotor P3 de IGF-II o un transcripto dirigido por el promotor P4 de IGF-II.

## 50 14. La construcción de ácido nucleico para uso en el tratamiento de un tumor, inhibición de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho tumor es un carcinoma.

## 55 15. La construcción de ácido nucleico para uso en el tratamiento de un tumor, inhibición de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicho tumor se selecciona del

grupo que consiste en un carcinoma de vejiga, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma de ovario y un carcinoma pancreático.



**Figura 1**

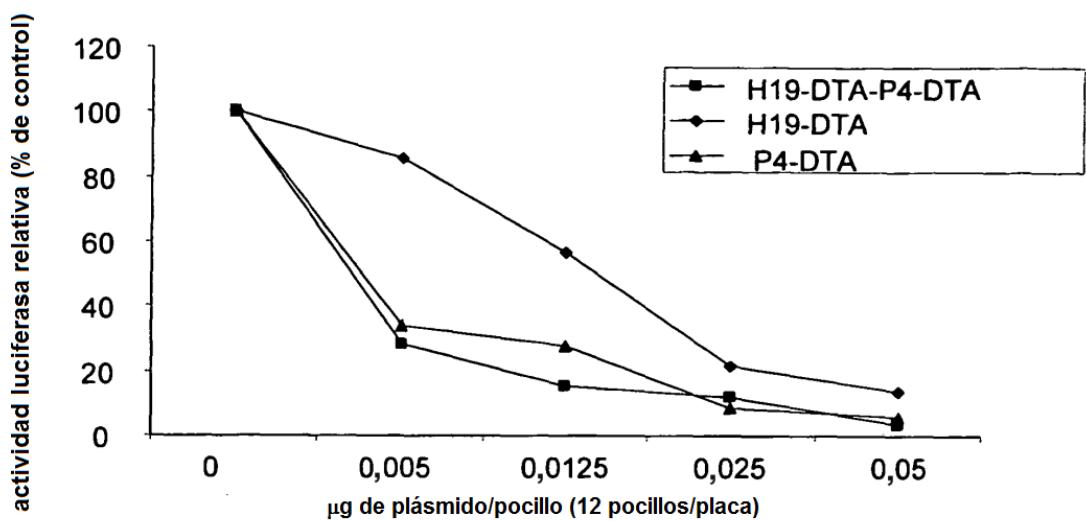


Figura 2A

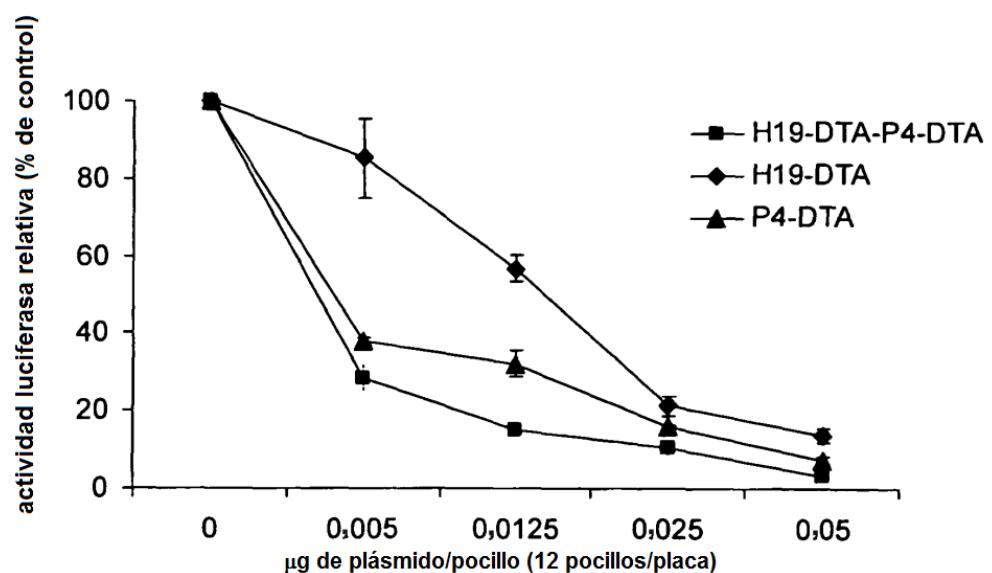
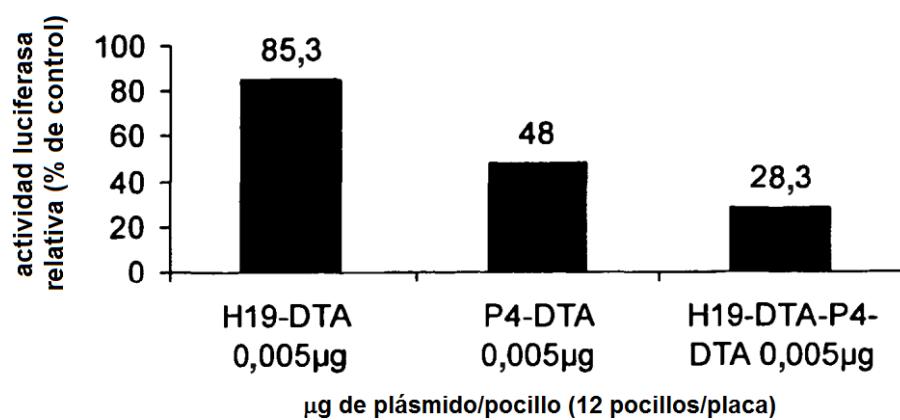


Figura 2B



**Figura 2C**

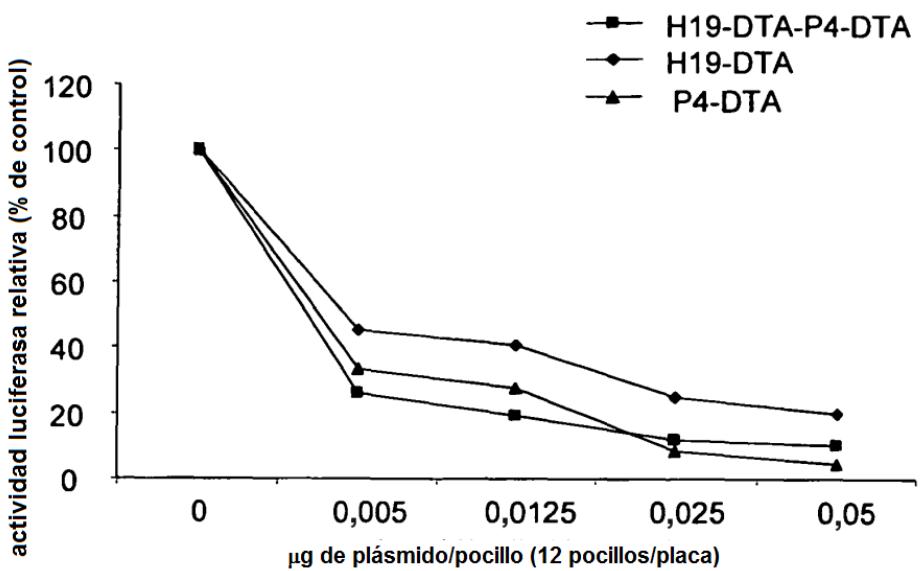


Figura 3A

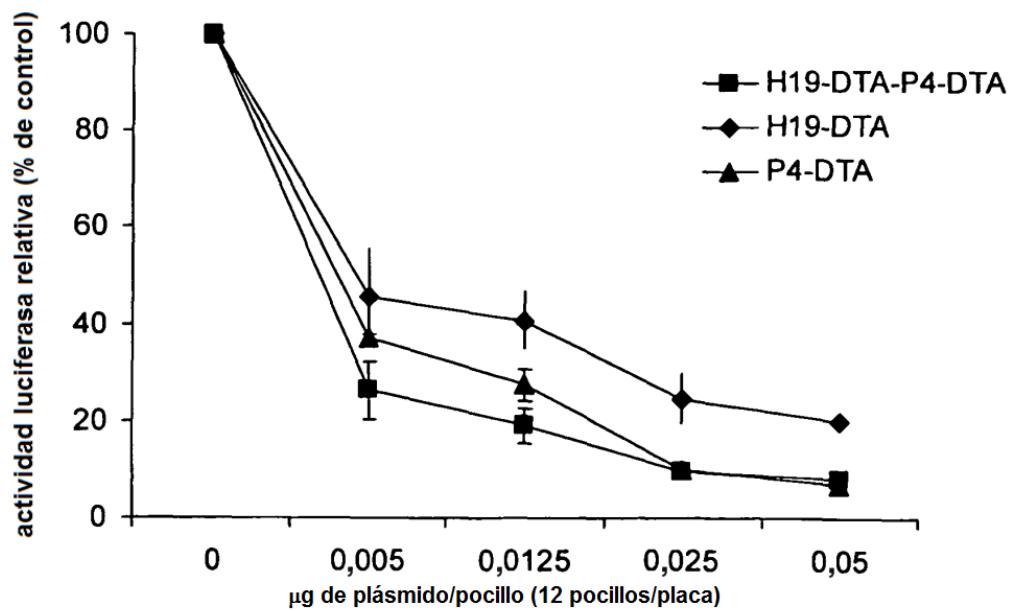
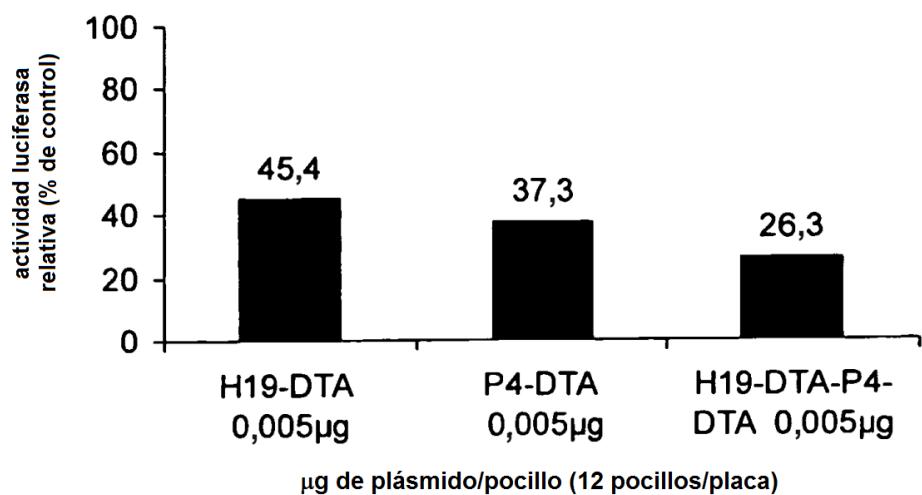
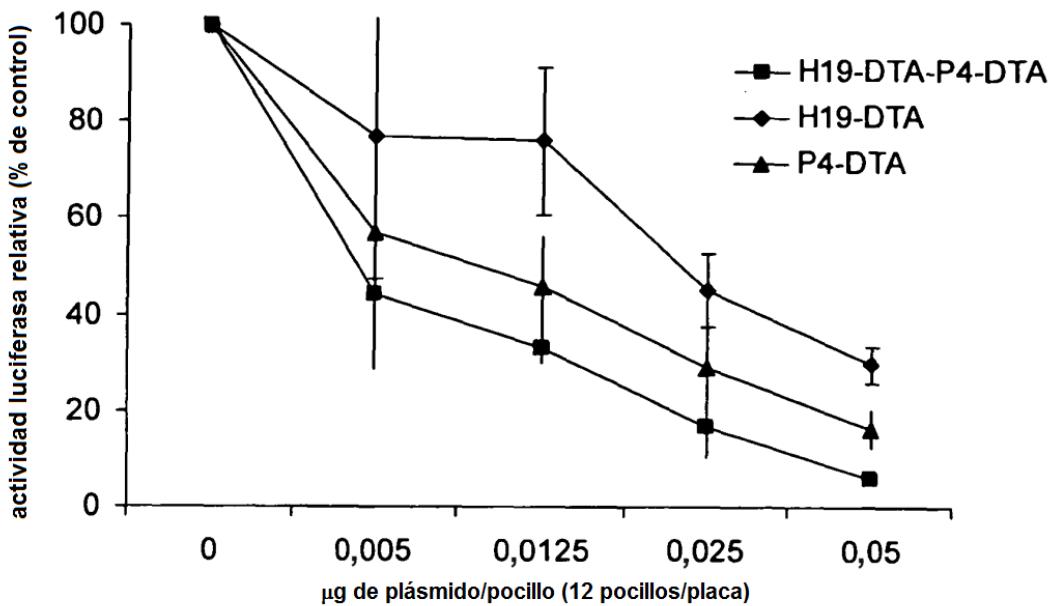
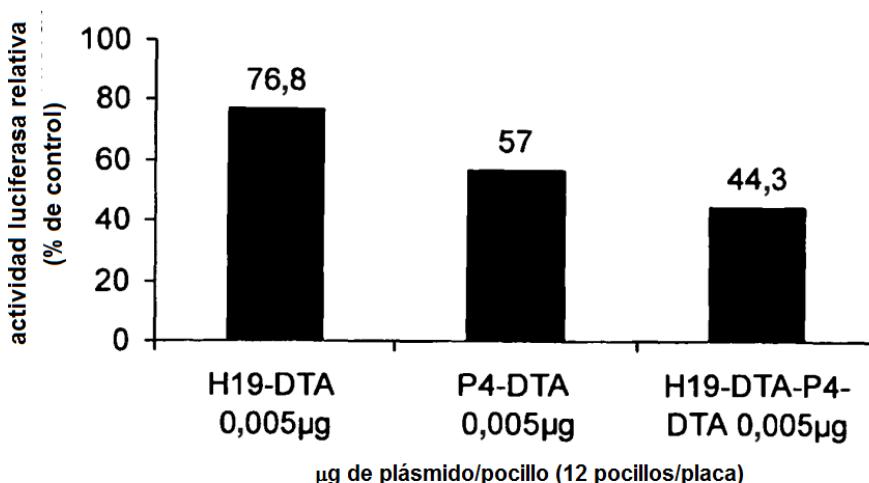


Figura 3B



**Figura 3C**

**Figura 4A****Figura 4B**

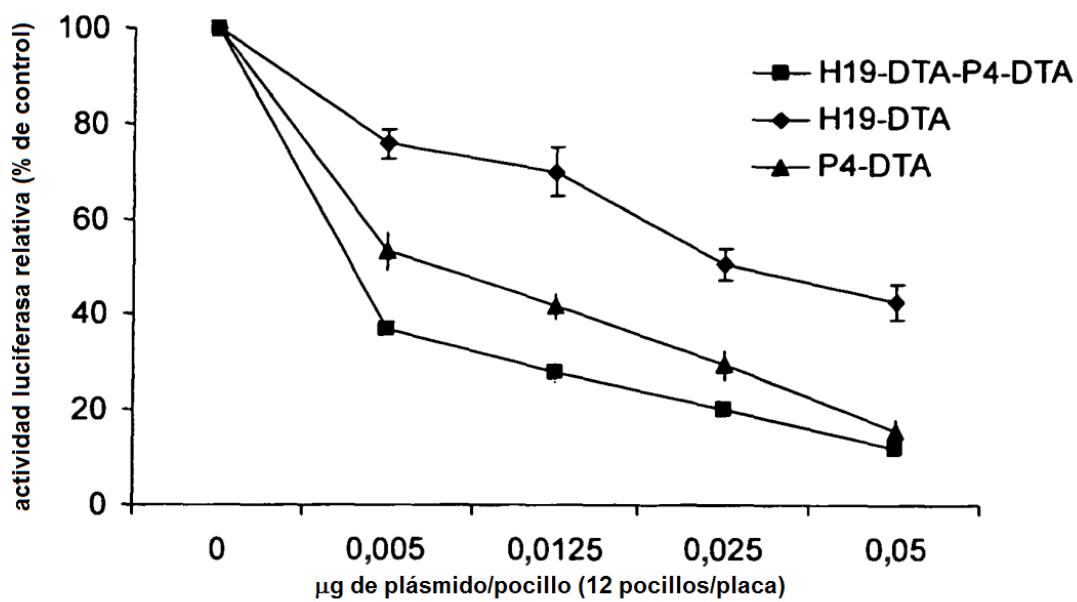


Figura 5A

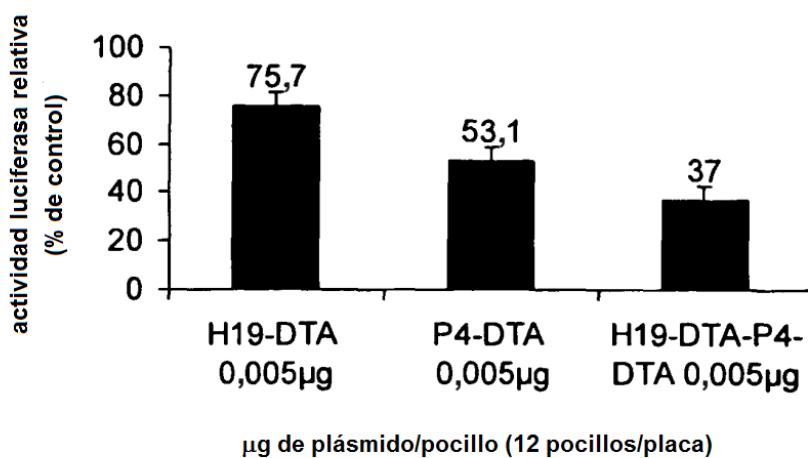


Figura 5B

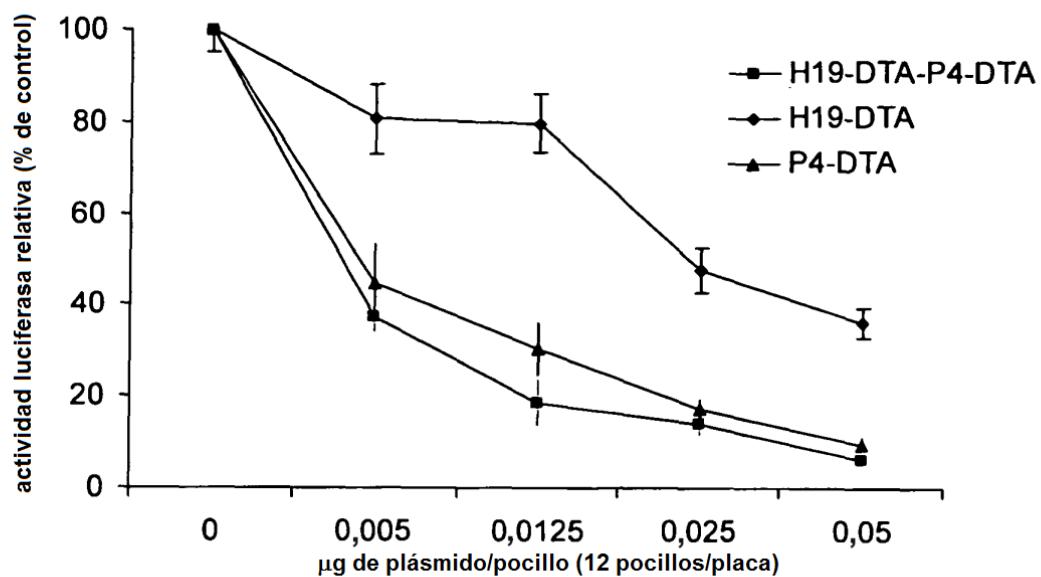


Figura 6A

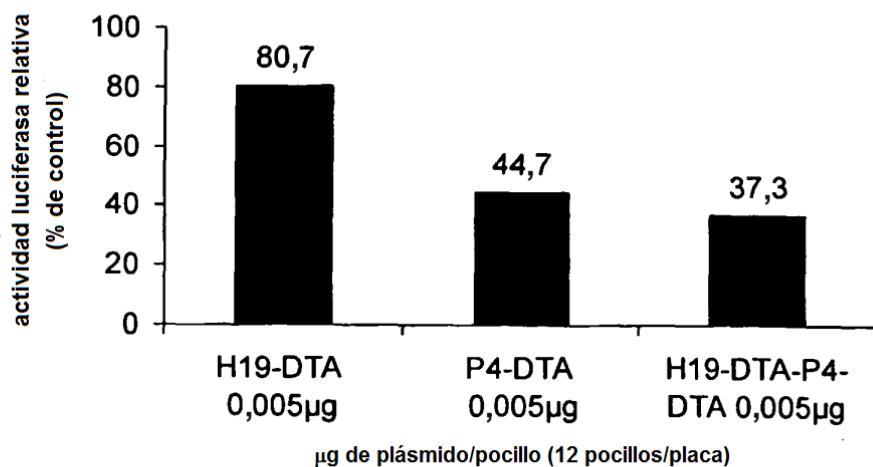


Figura 6B

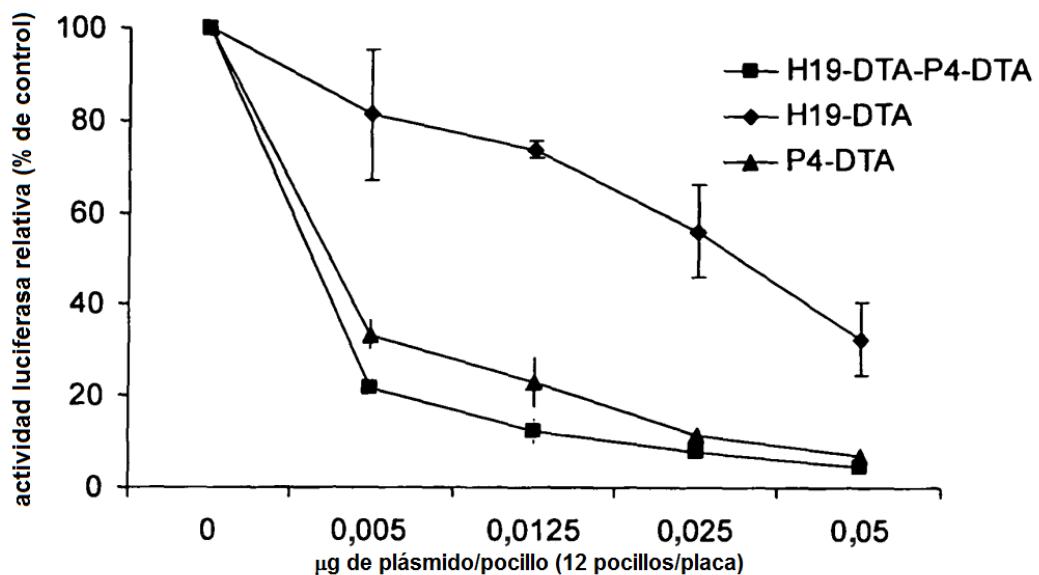


Figura 7A

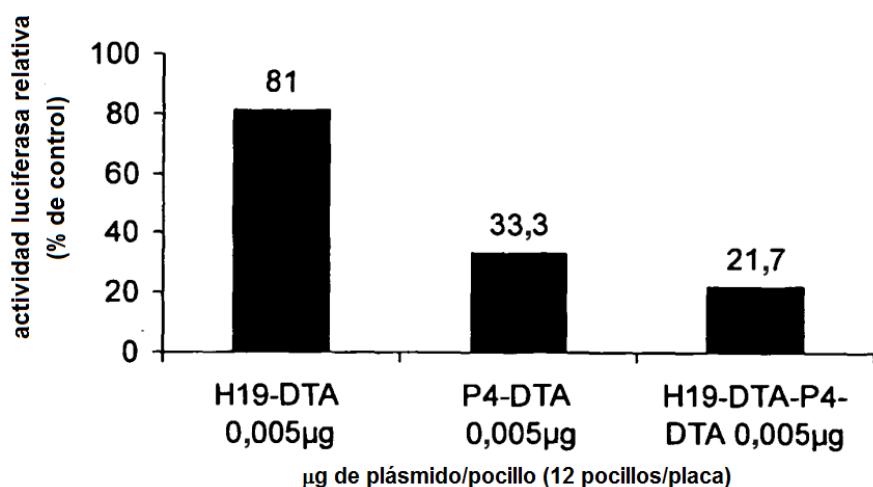
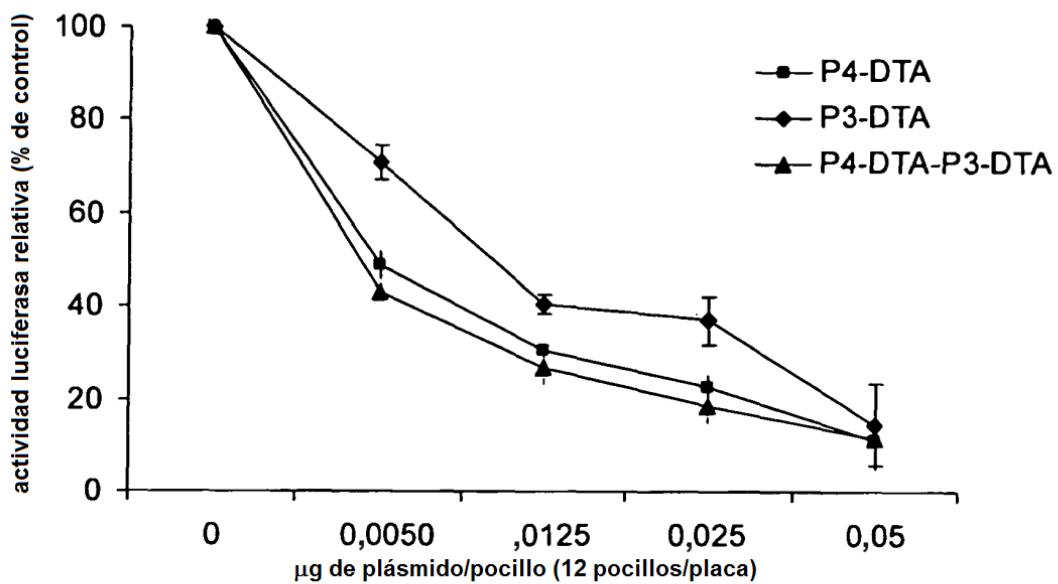
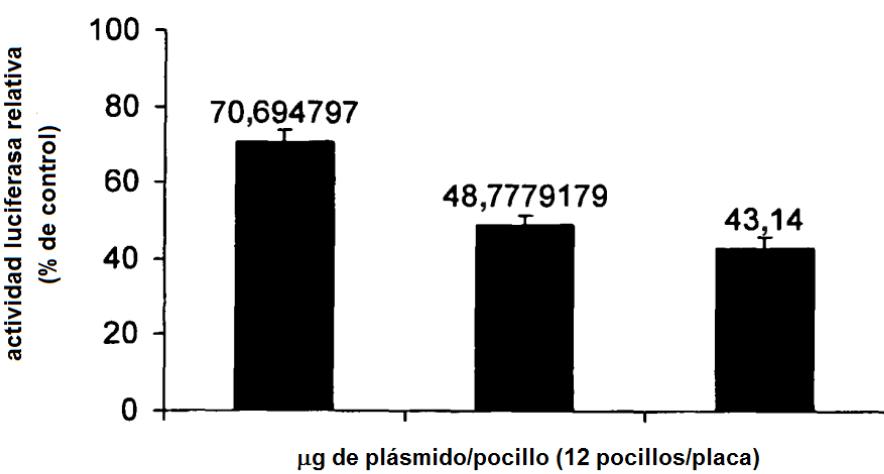
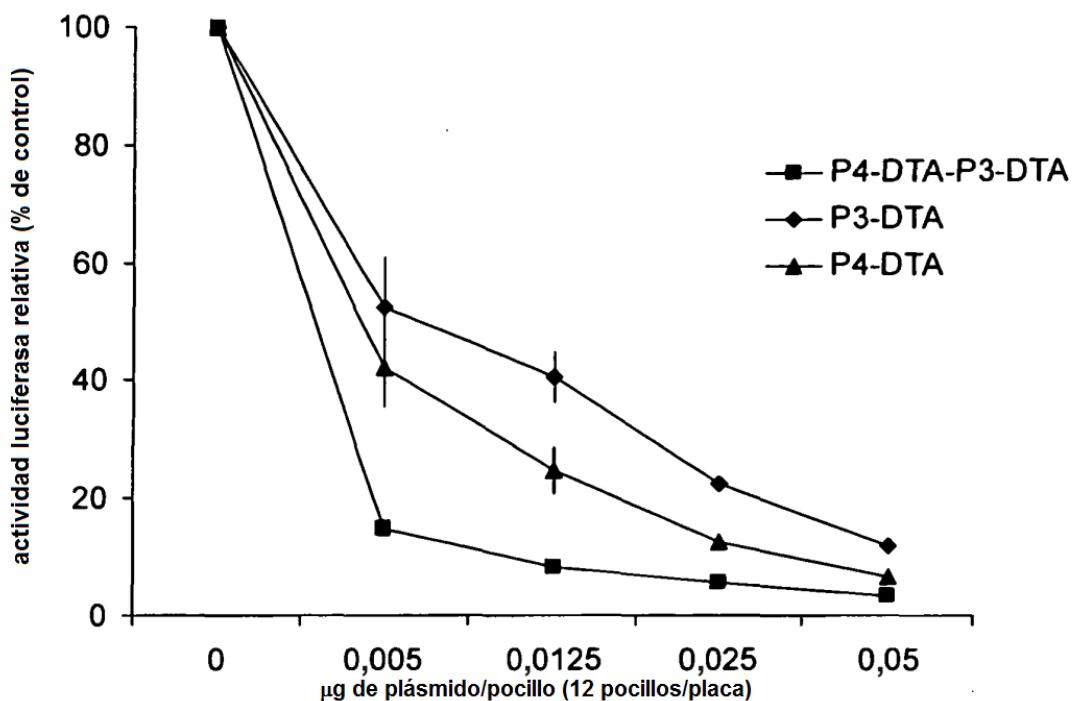
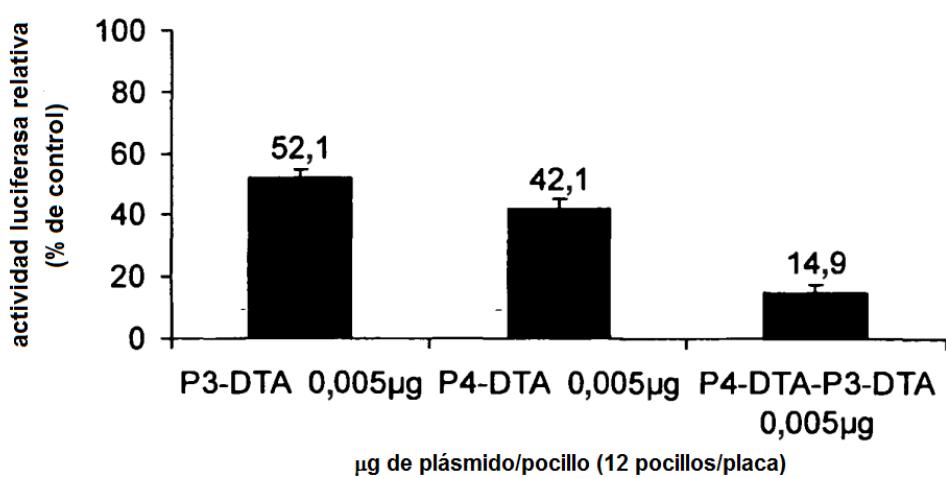


Figura 7B

**Figura 8A****Figura 8B**

**Figura 9A****Figura 9B**

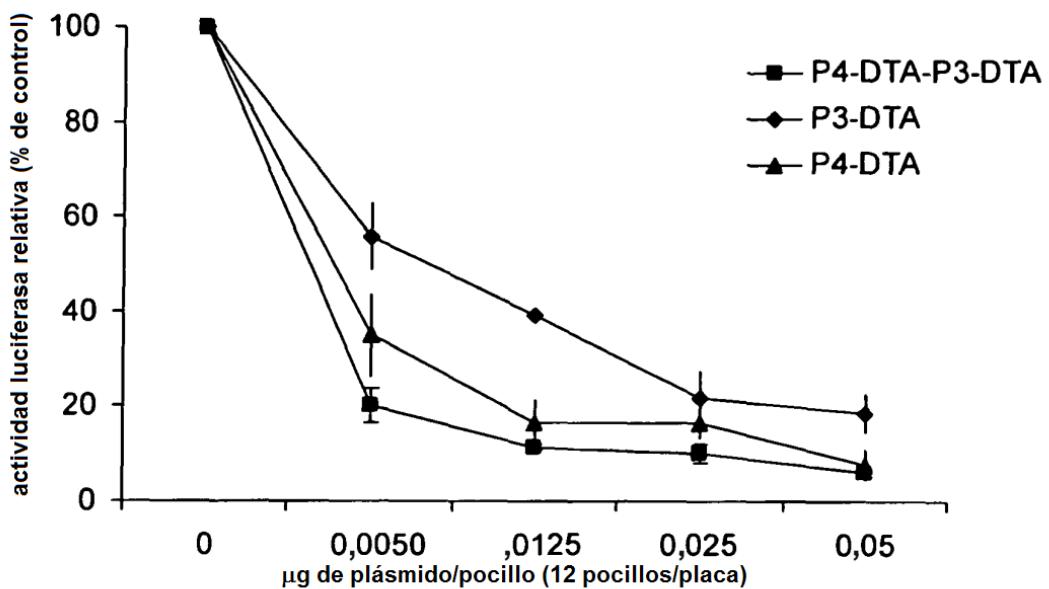


Figura 10A

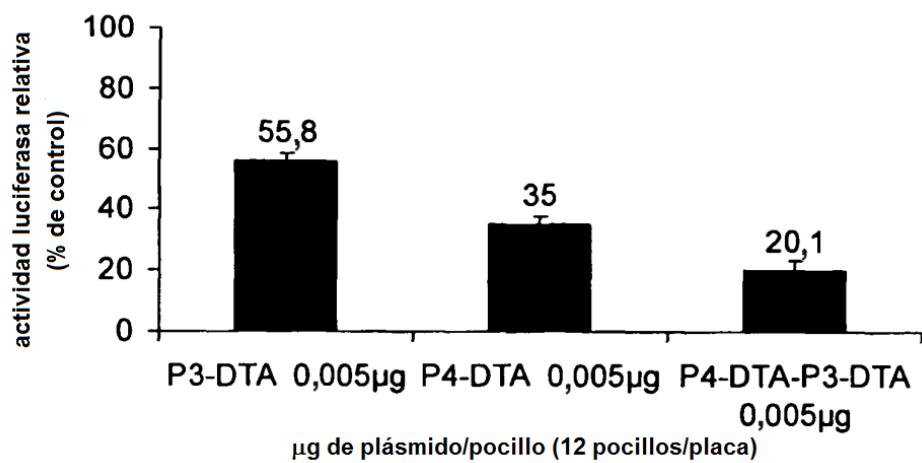
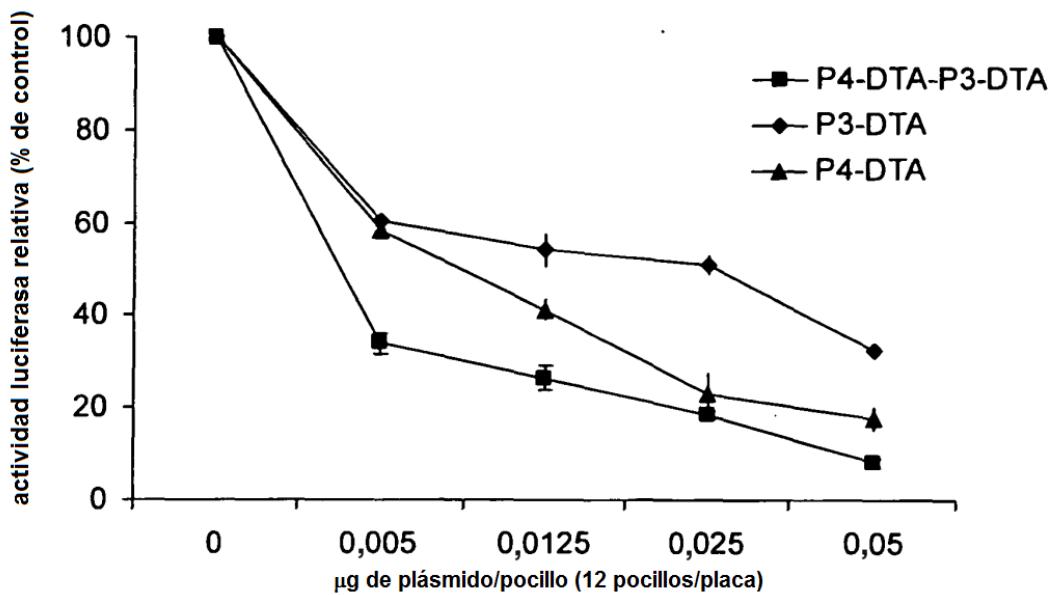
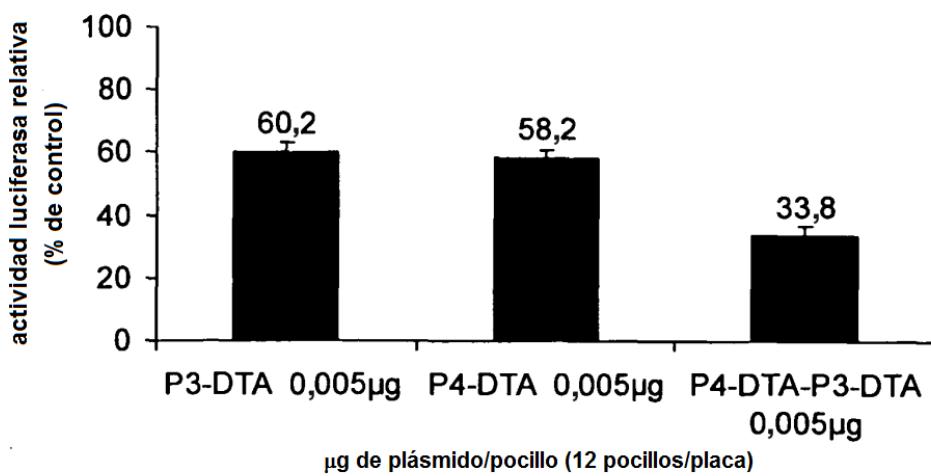
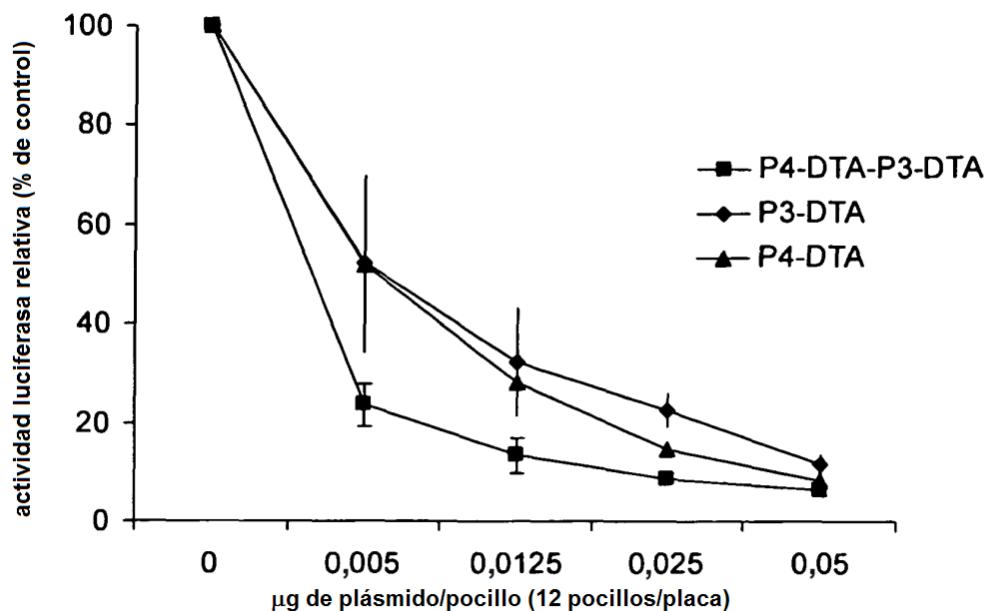
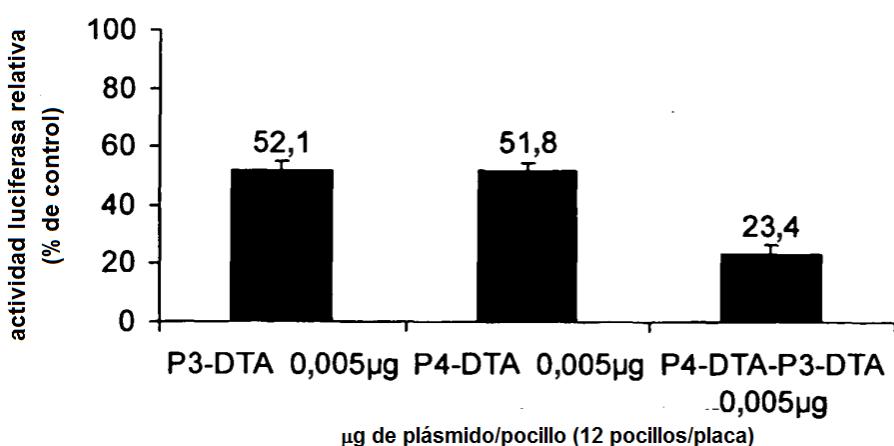
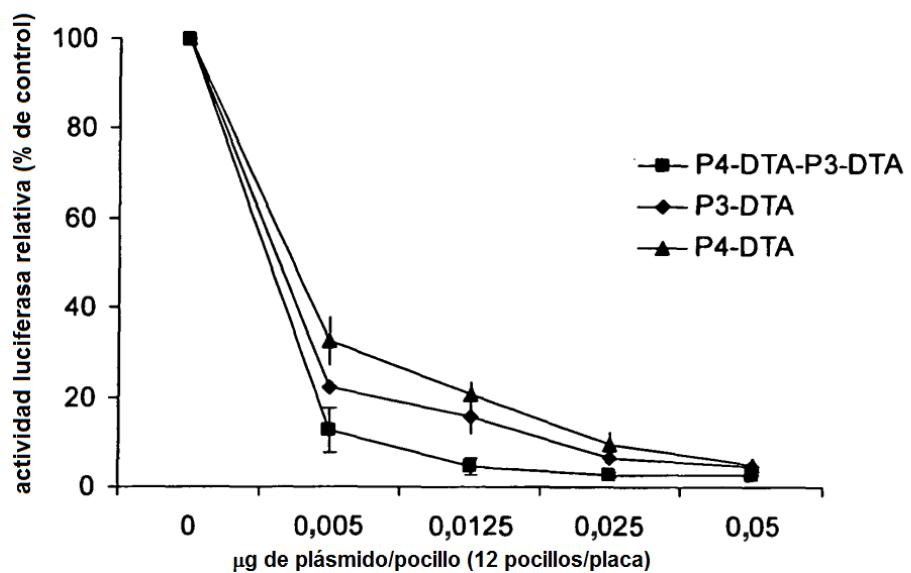
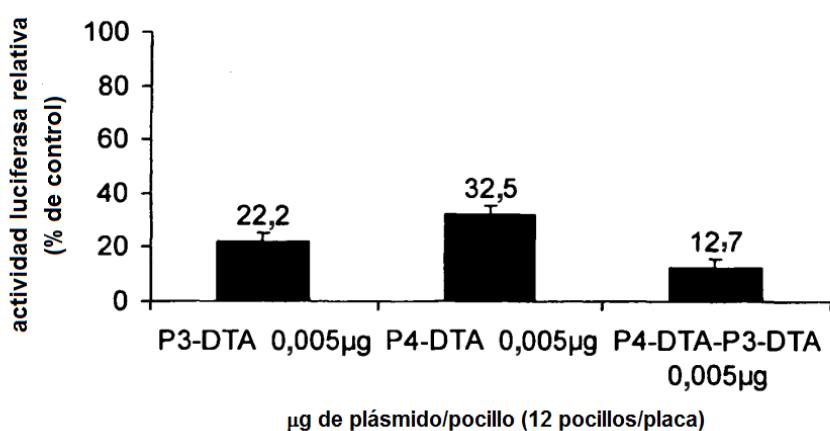
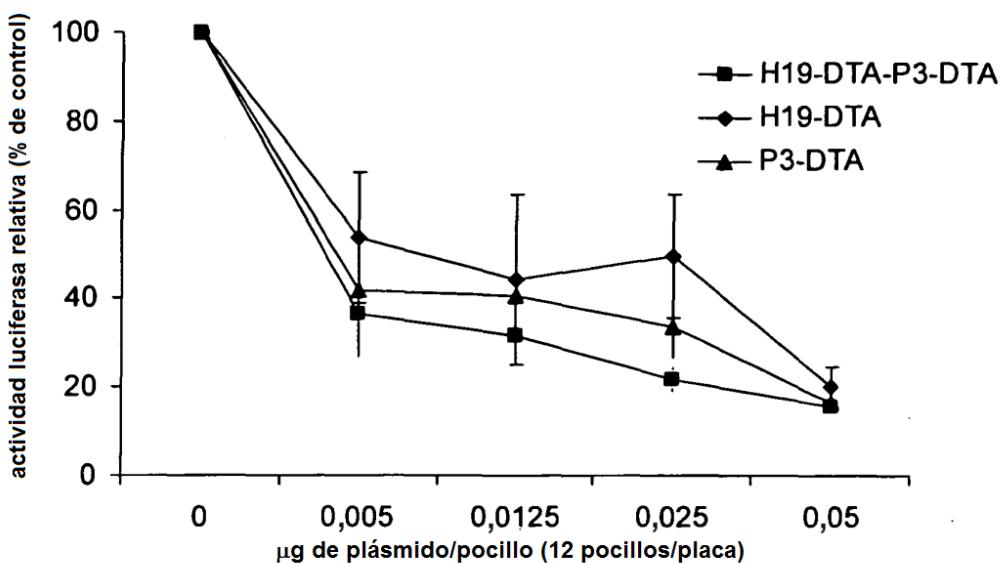
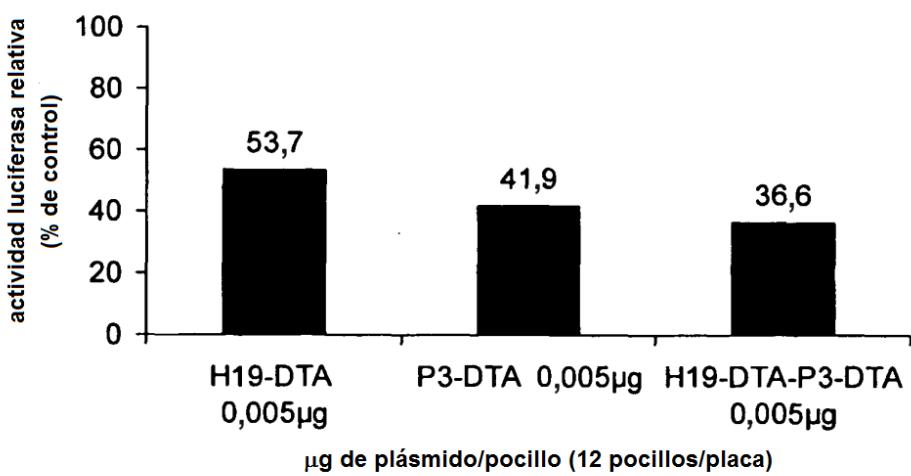


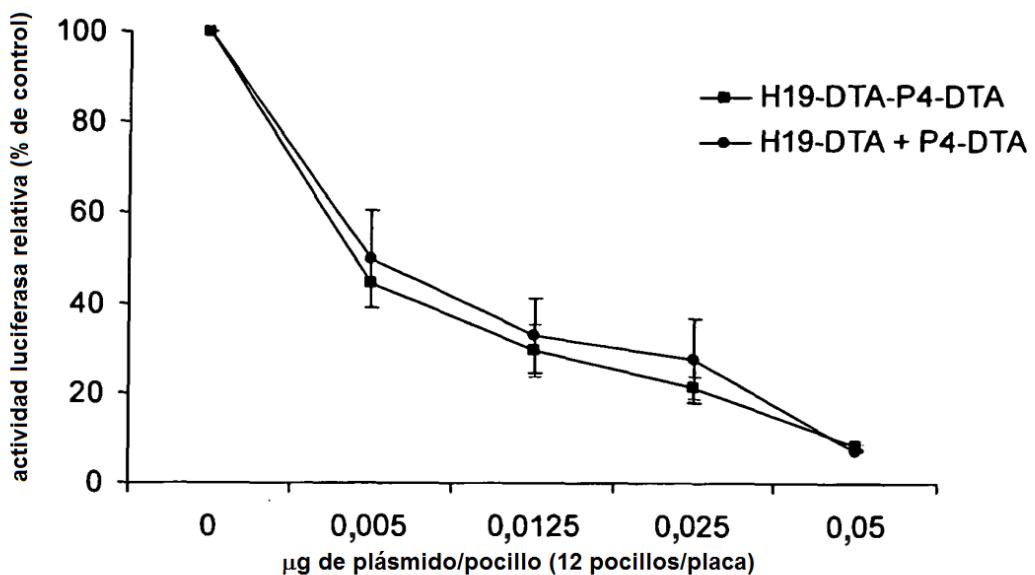
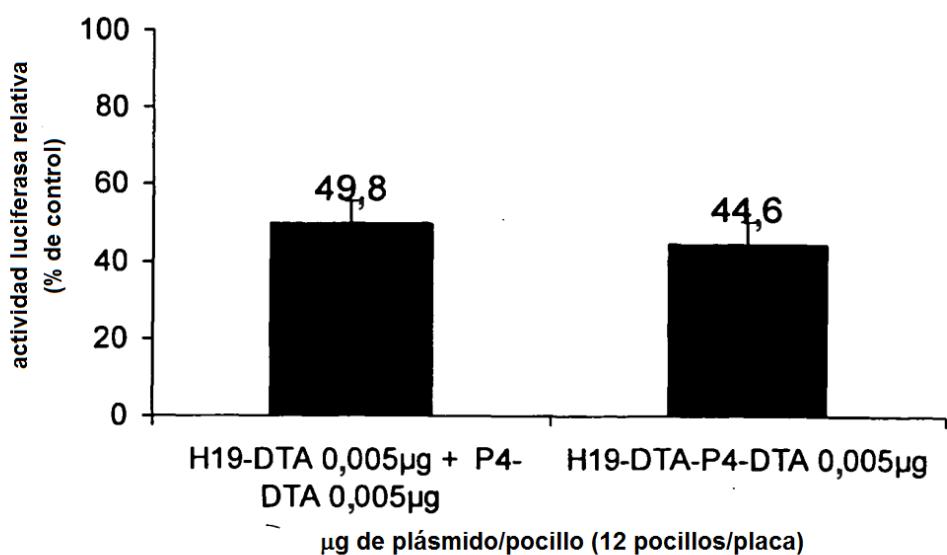
Figura 10B

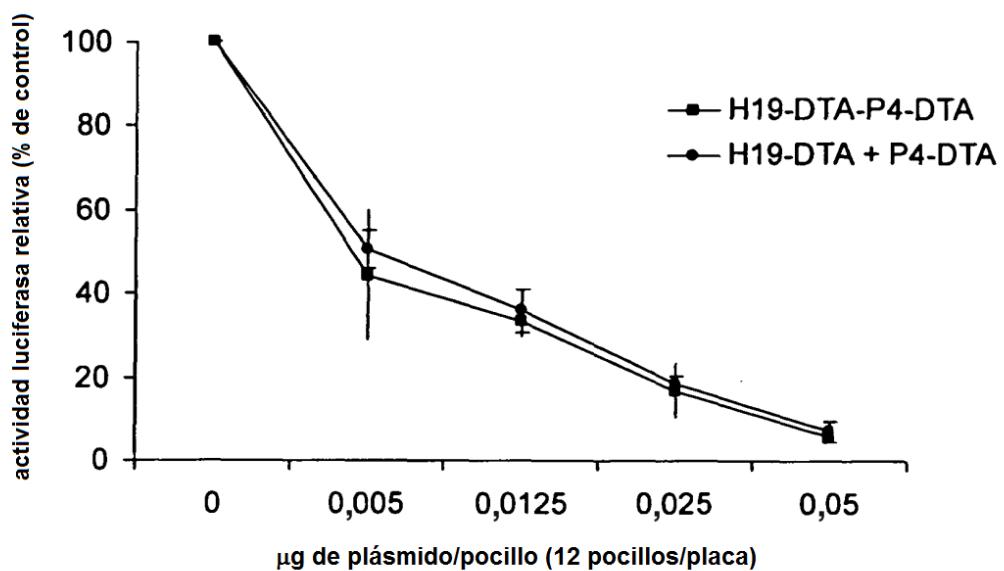
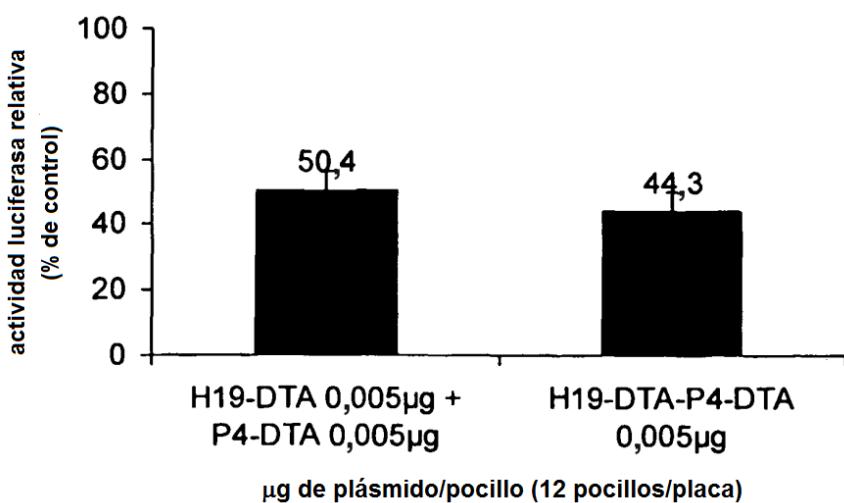
**Figura 11A****Figura 11B**

**Figura 12A****Figura 12B**

**Figura 13A****Figura 13B**

**Figura 14A****Figura 14B**

**Figura 15A****Figura 15B**

**Figura 16A****Figura 16B**

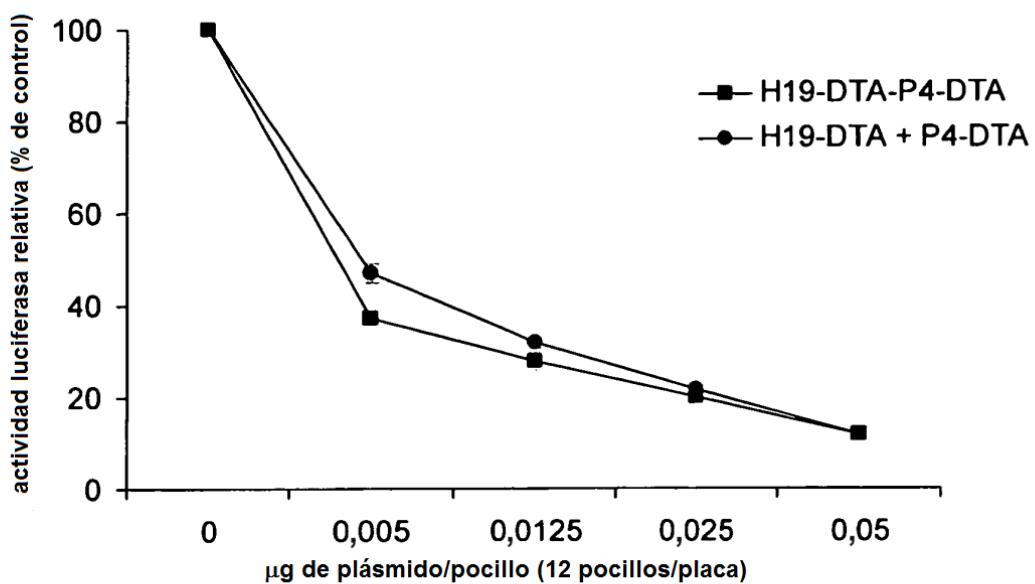


Figura 17A

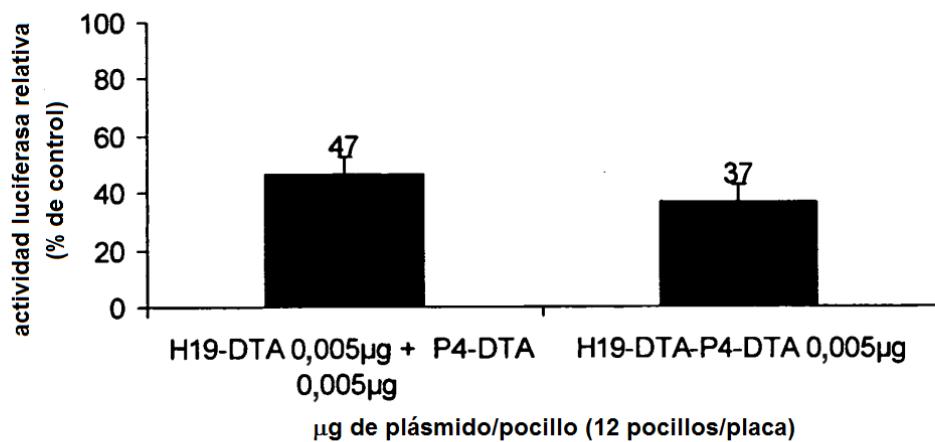
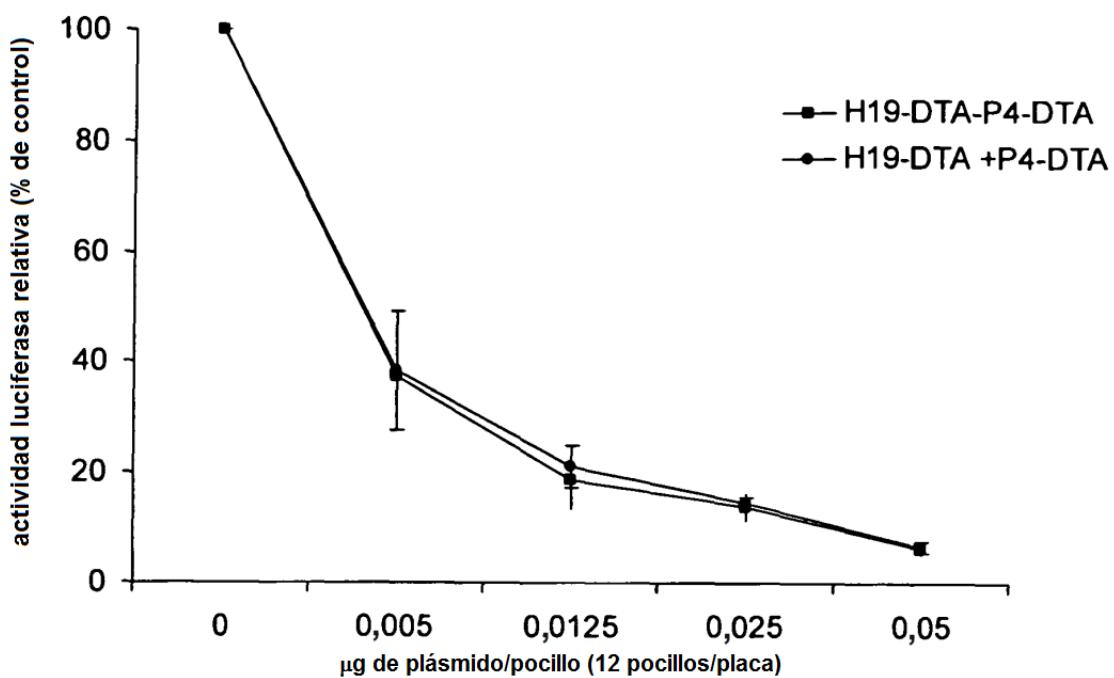
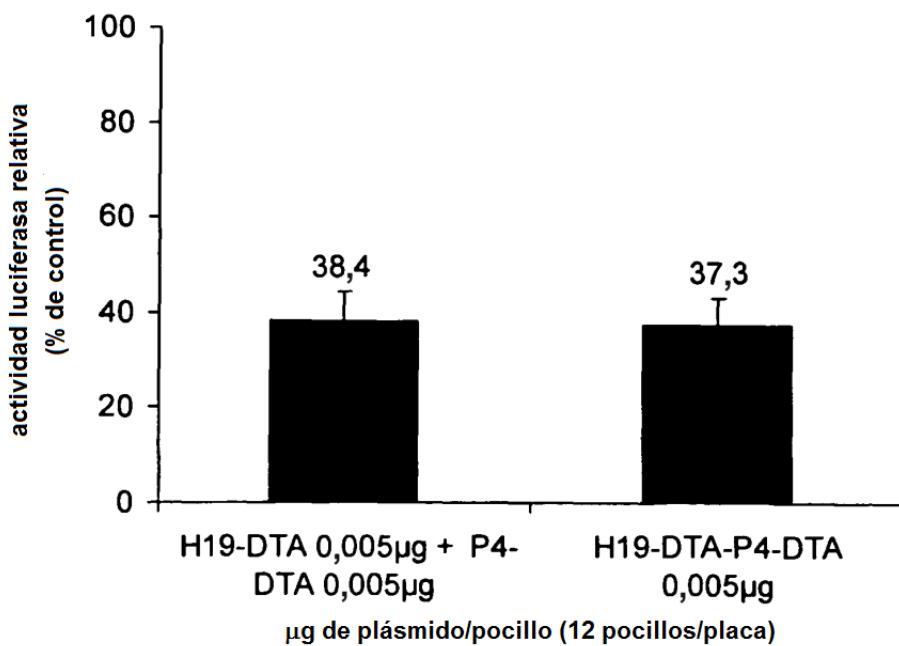


Figura 17B

**Figura 18A****Figura 18B**

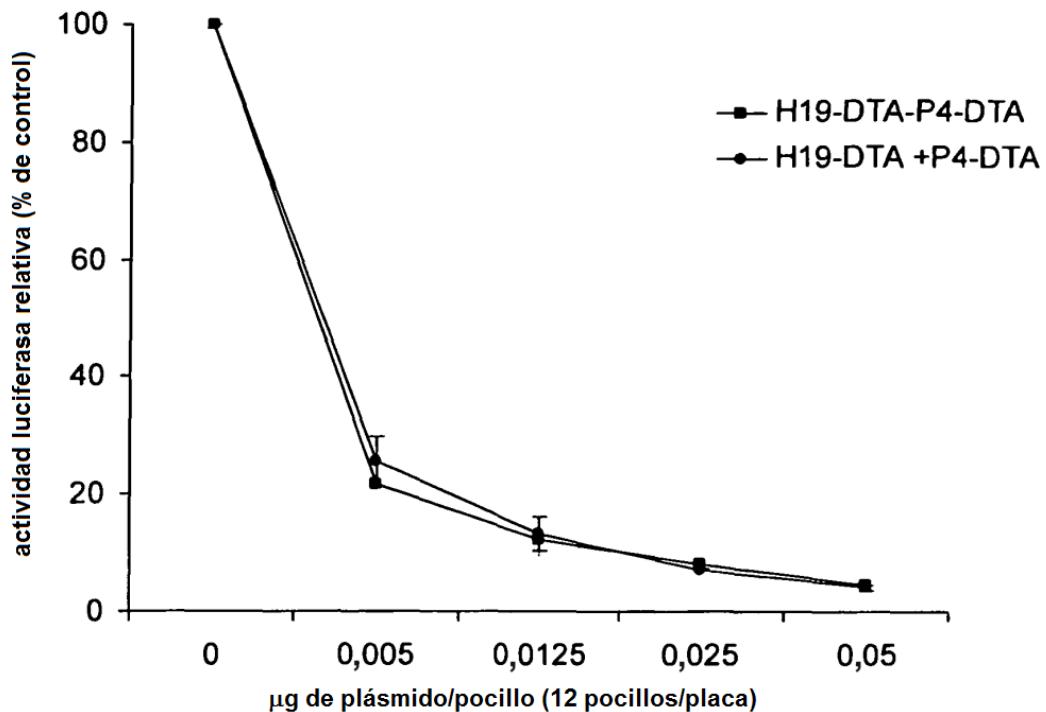


Figura 19A

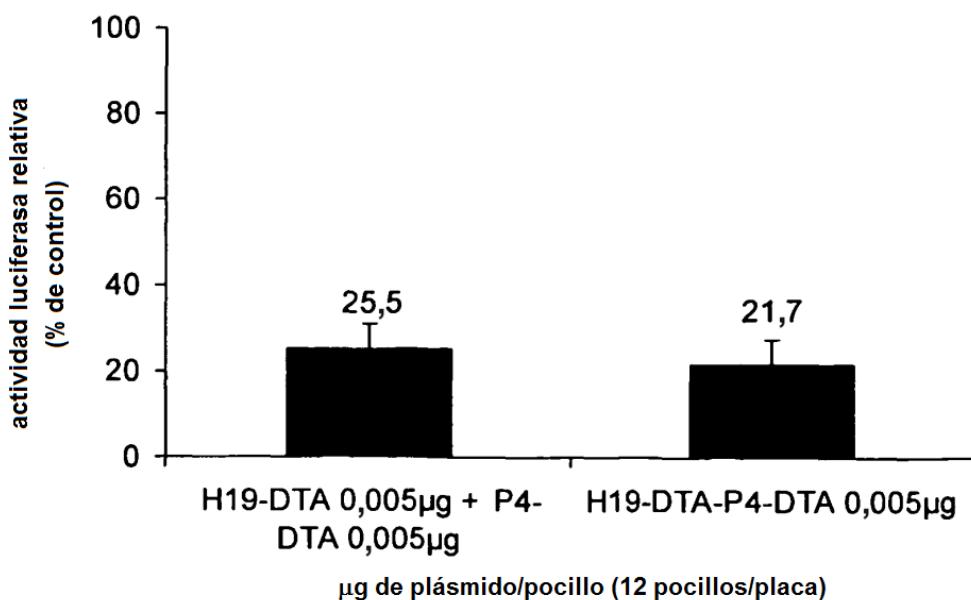
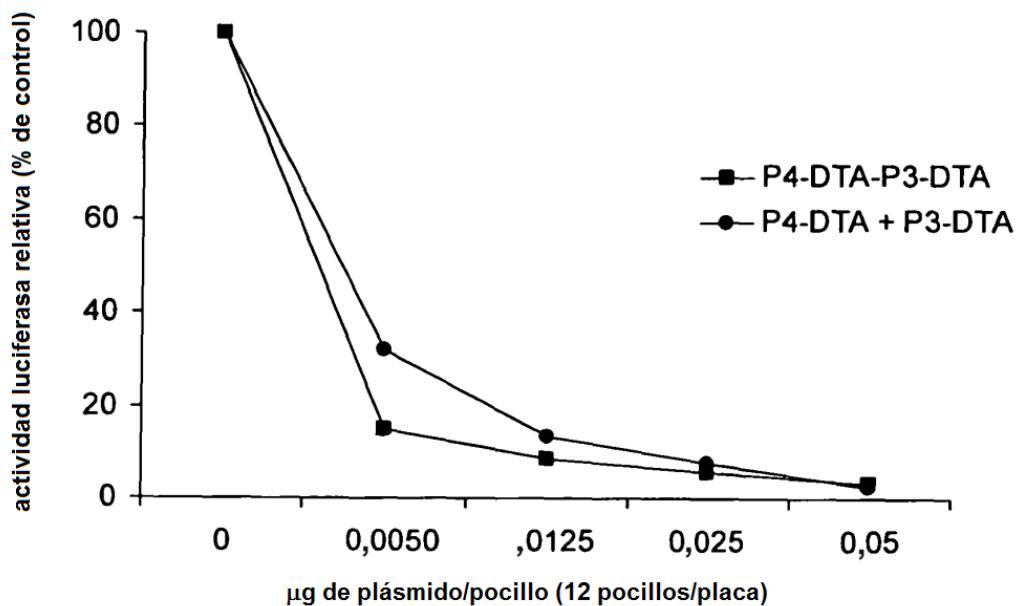
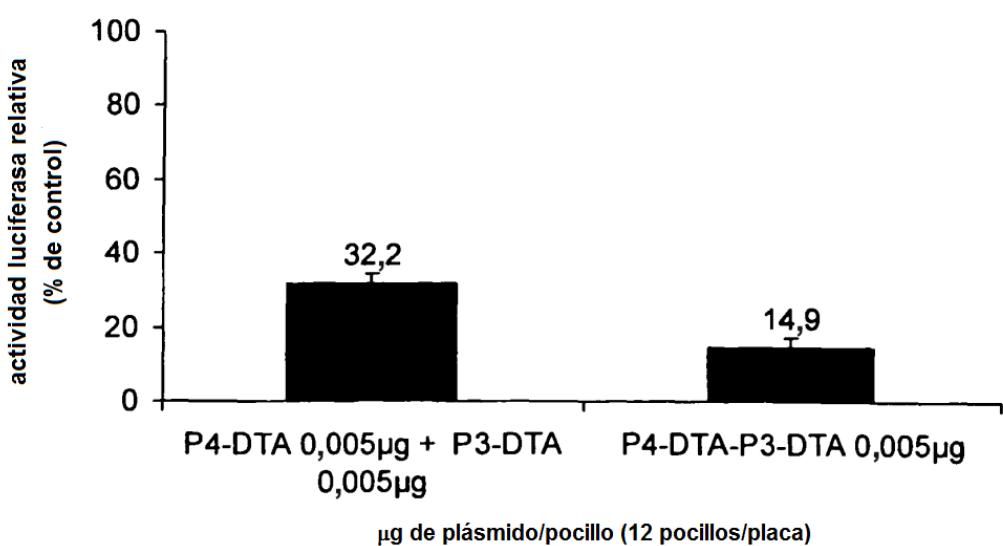
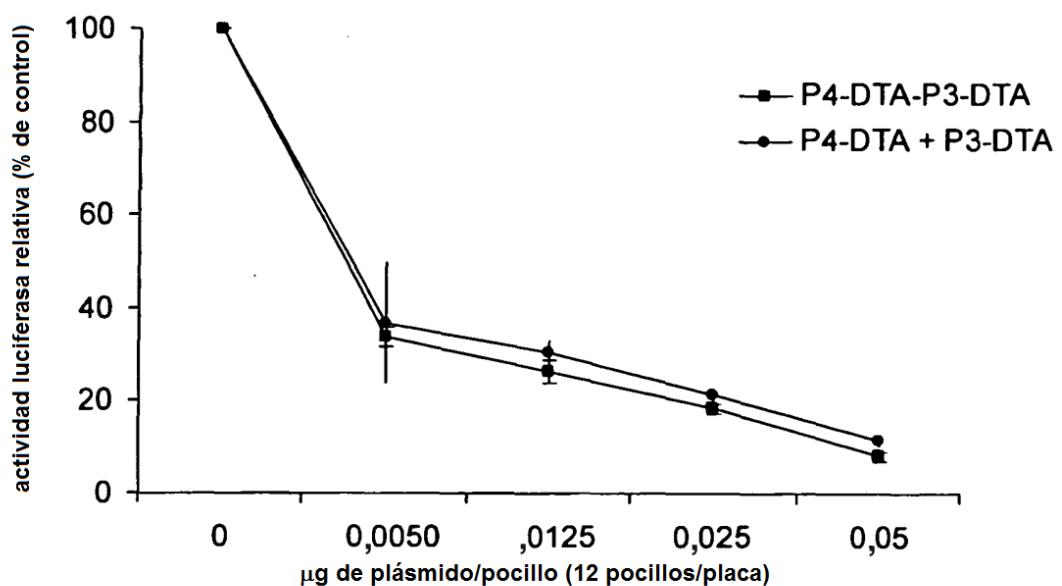
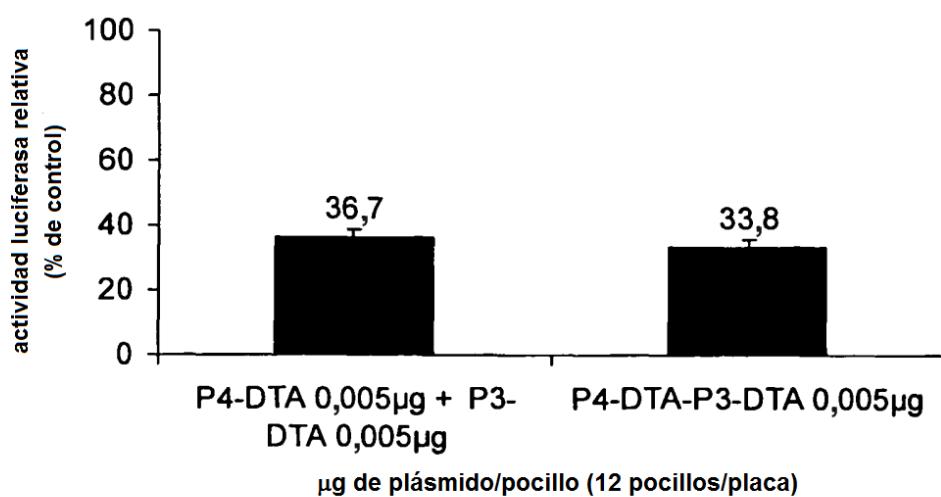
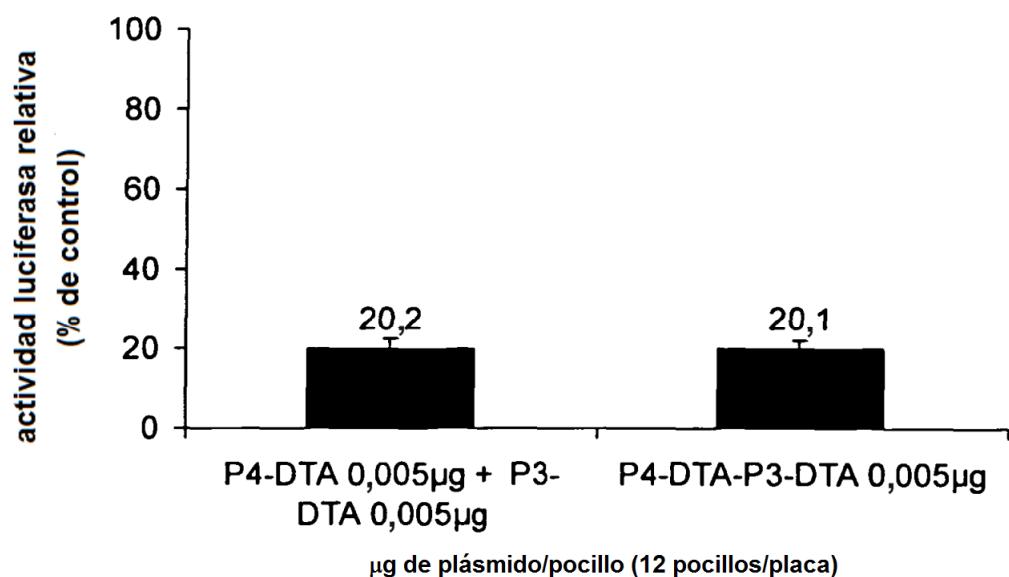


Figura 19B

**Figura 20A****Figura 20B**

**Figura 21A****Figura 21B**



**Figura 22**

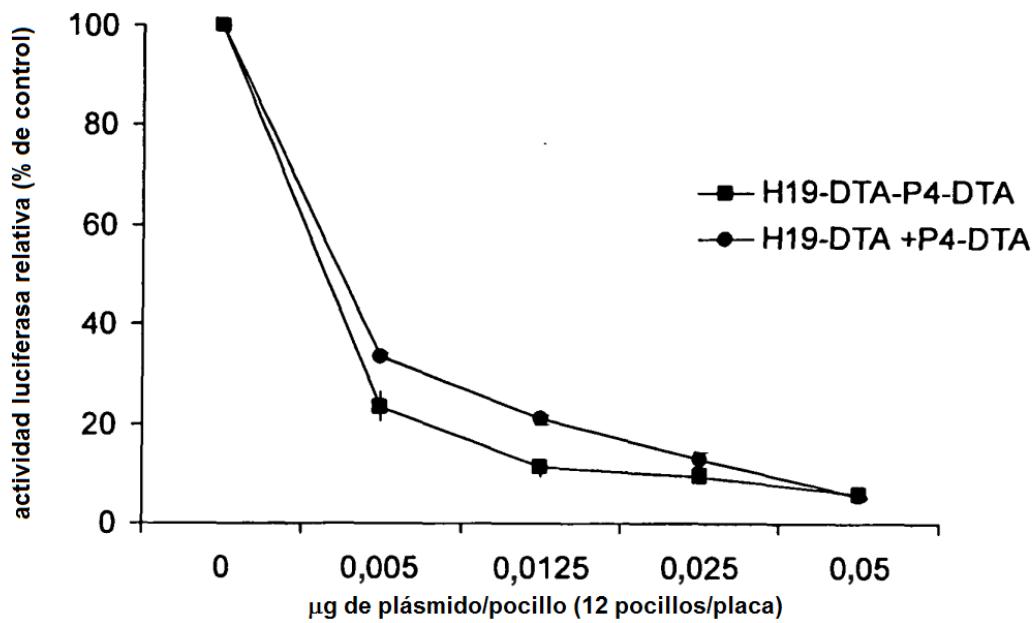


Figura 23A

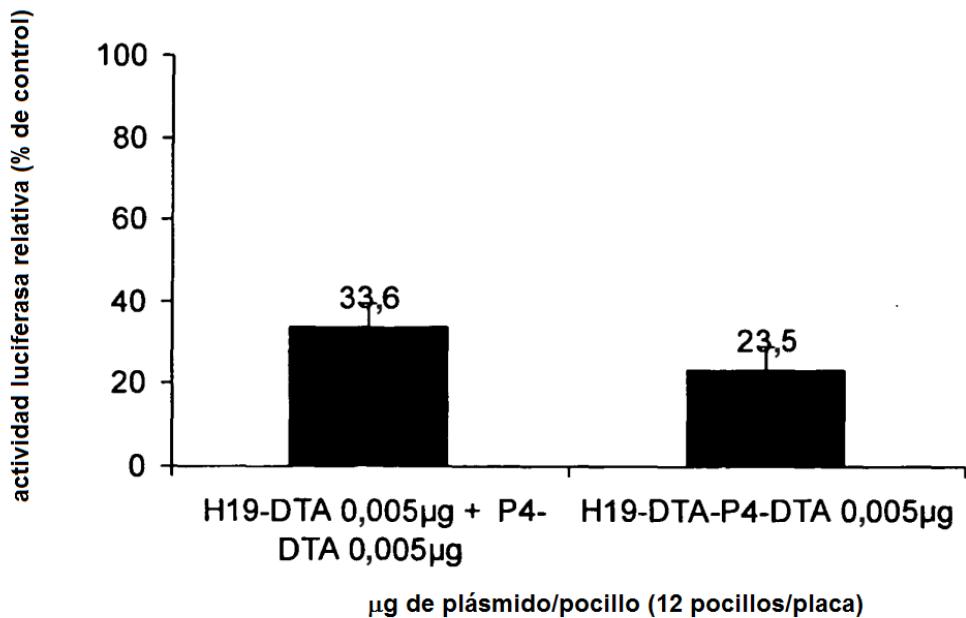


Figura 23B

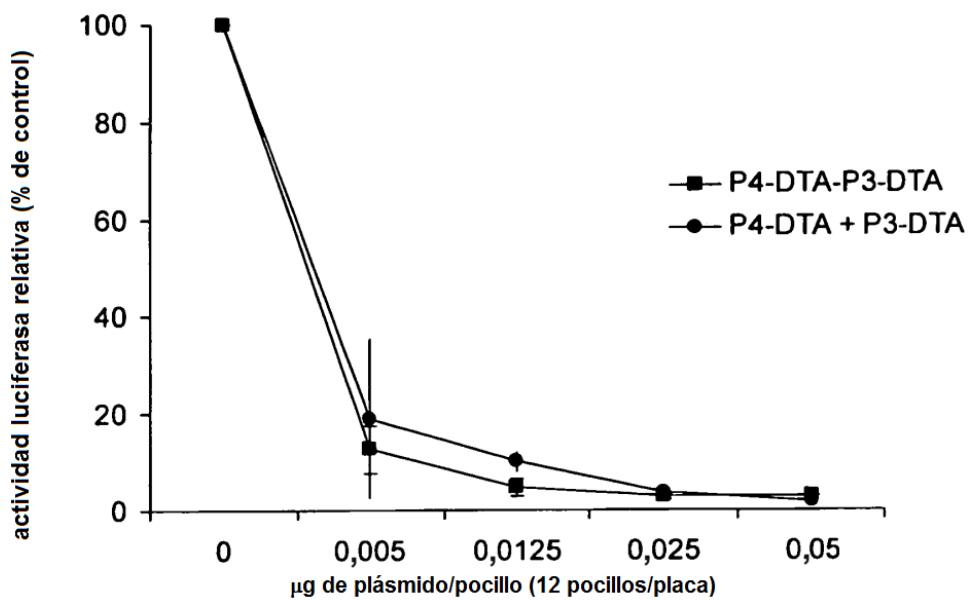


Figura 24A

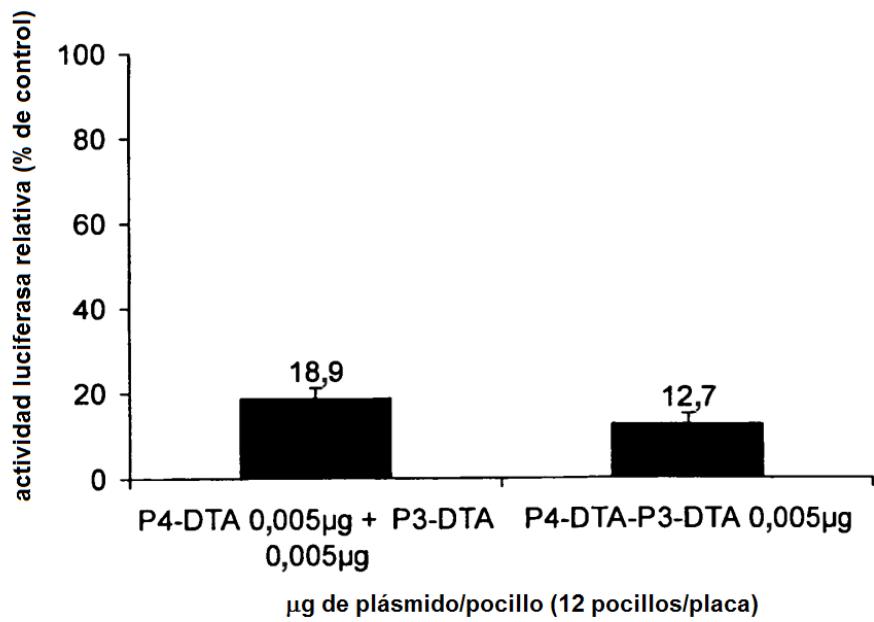


Figura 24B

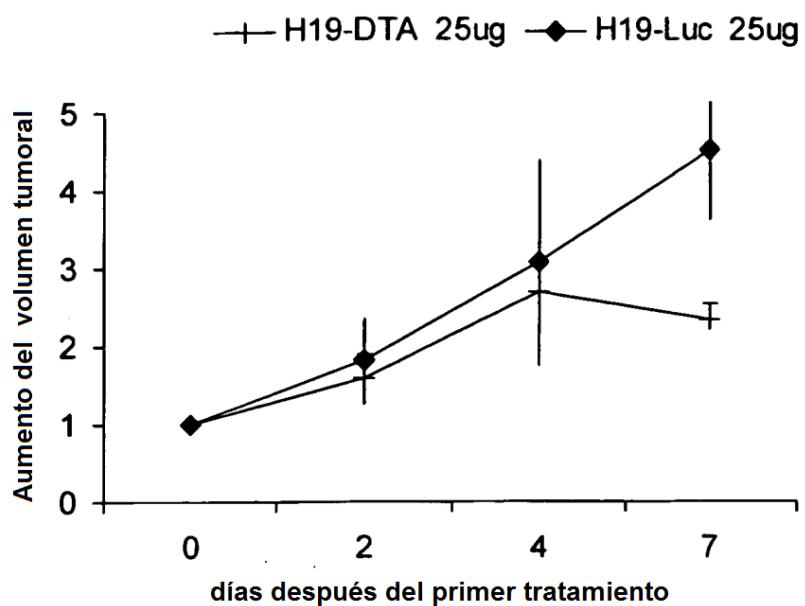


Figura 25

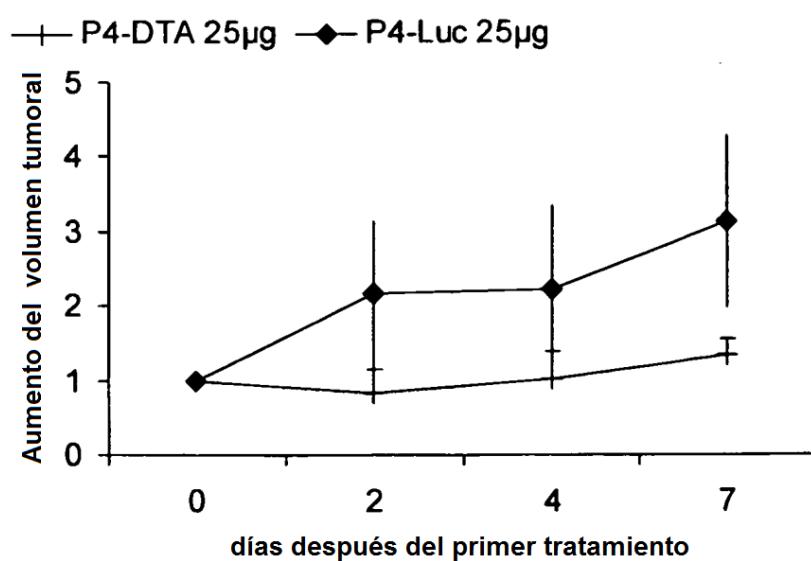
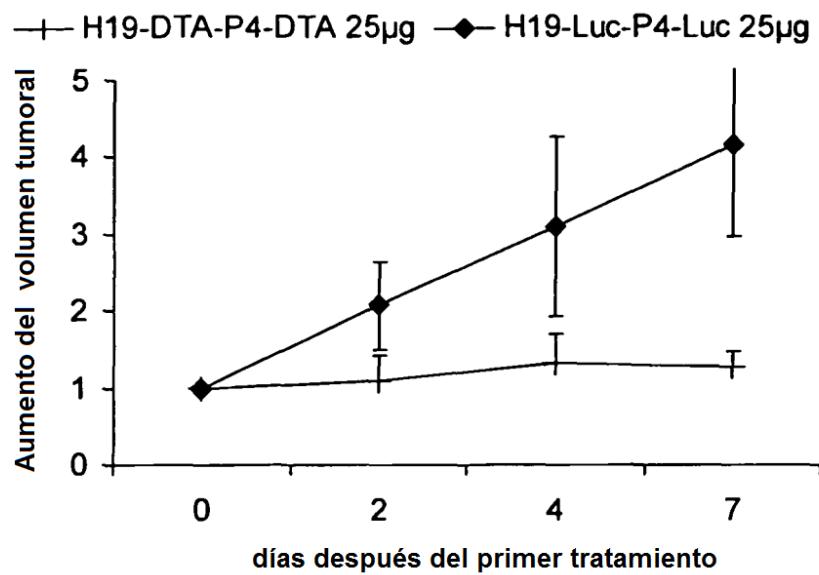
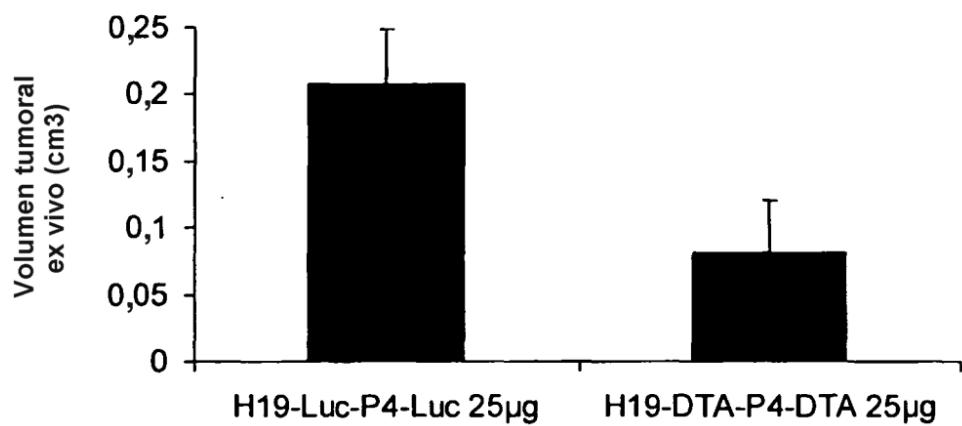


Figura 26



**Figura 27**



**Figura 28**

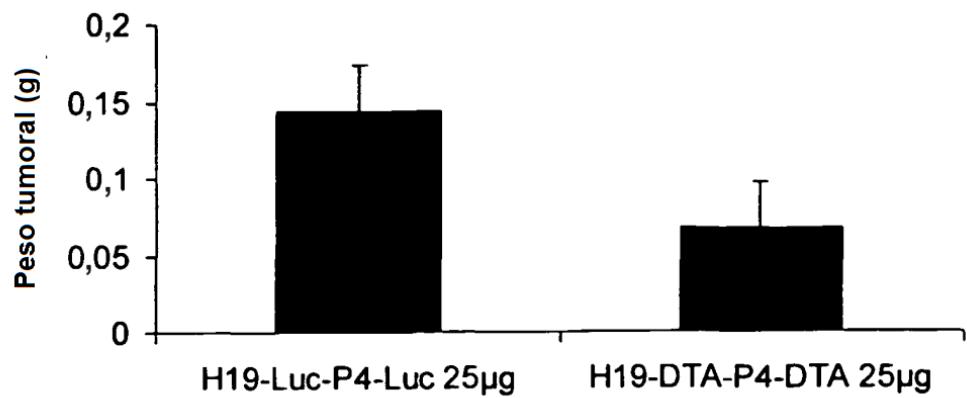


Figura 29

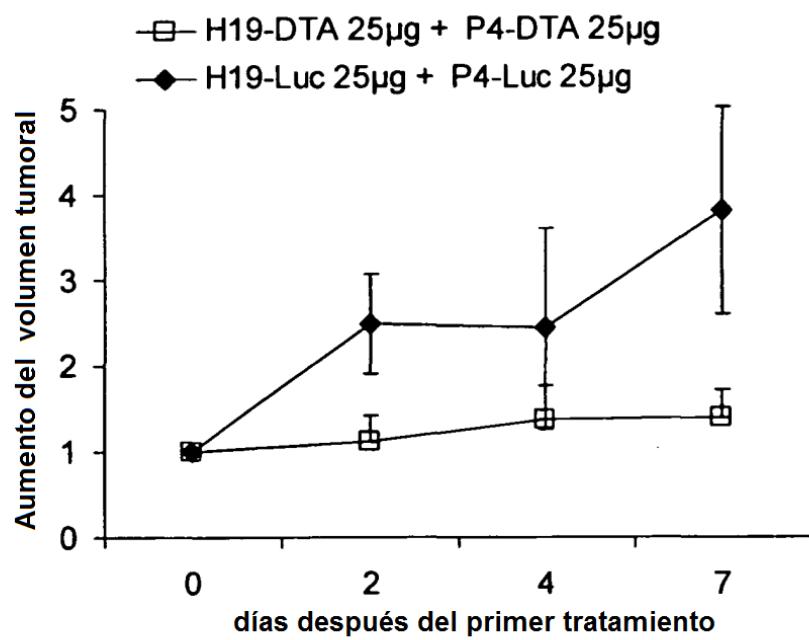


Figura 30

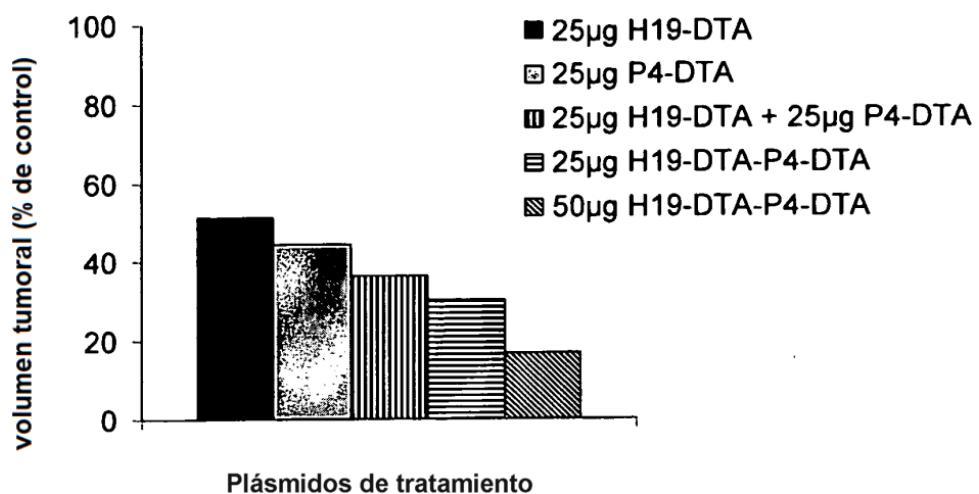


Figura 31

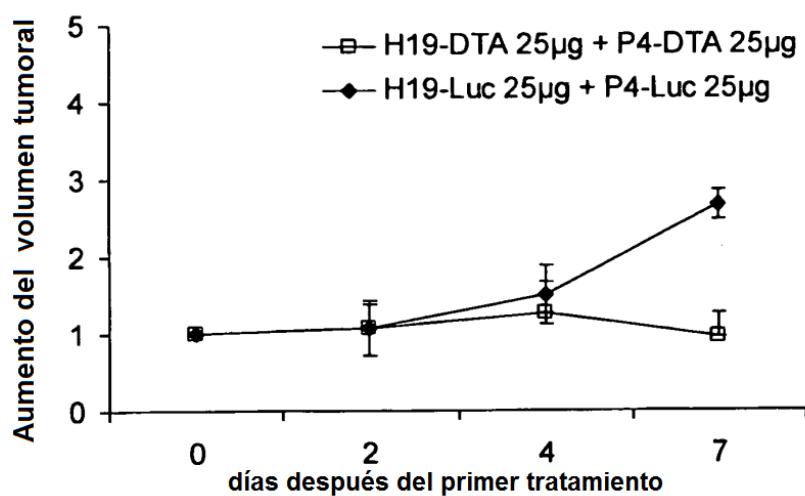


Figura 32

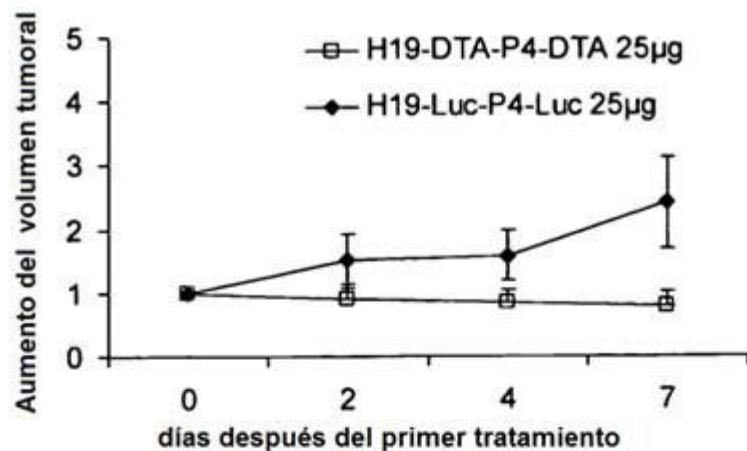


Figura 33

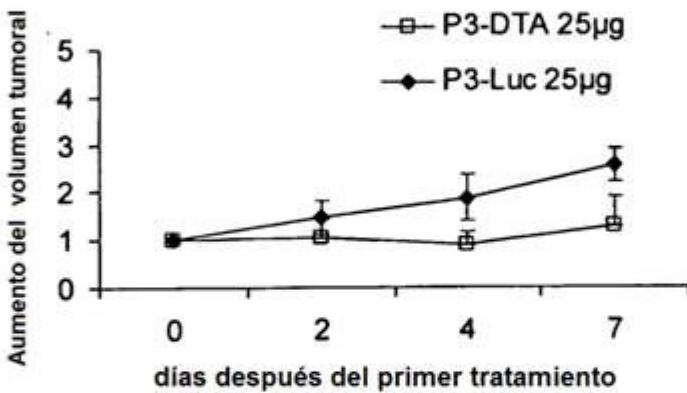


Figura 34

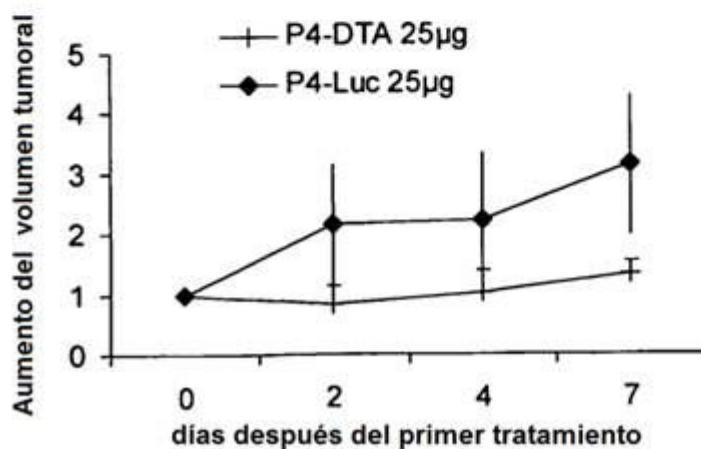


Figura 35

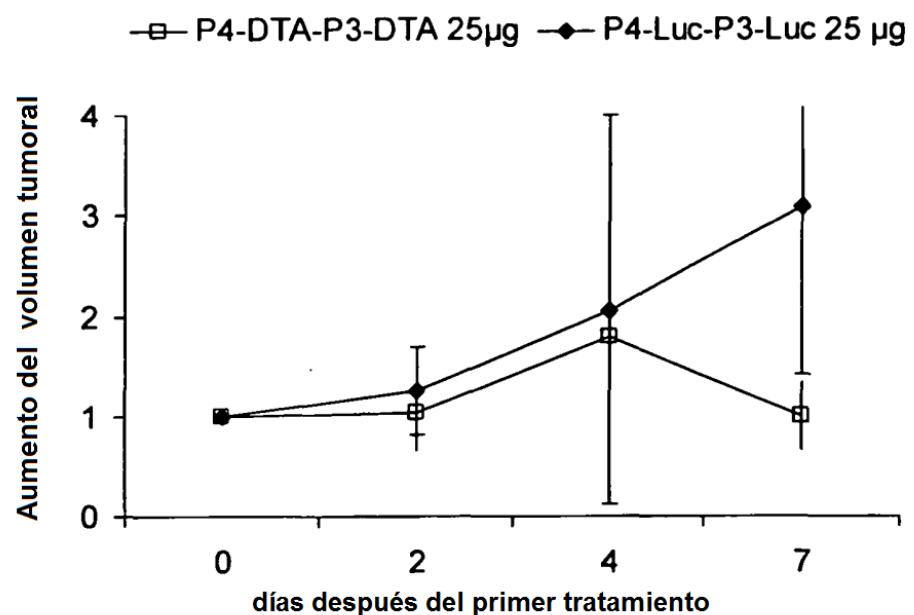


Figura 36

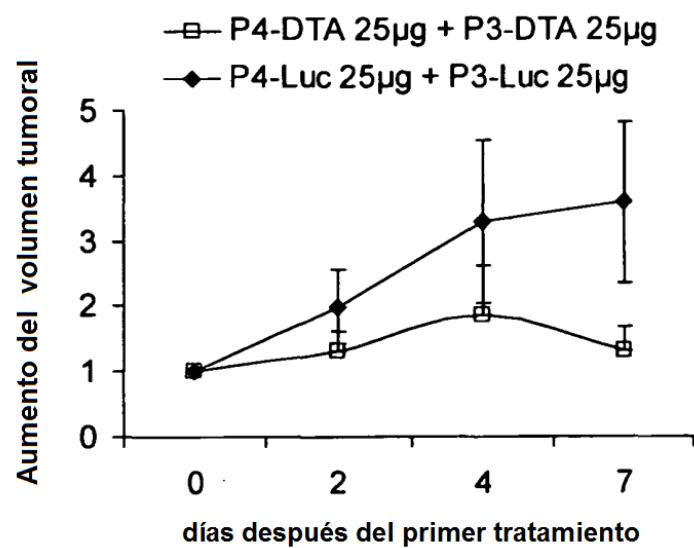
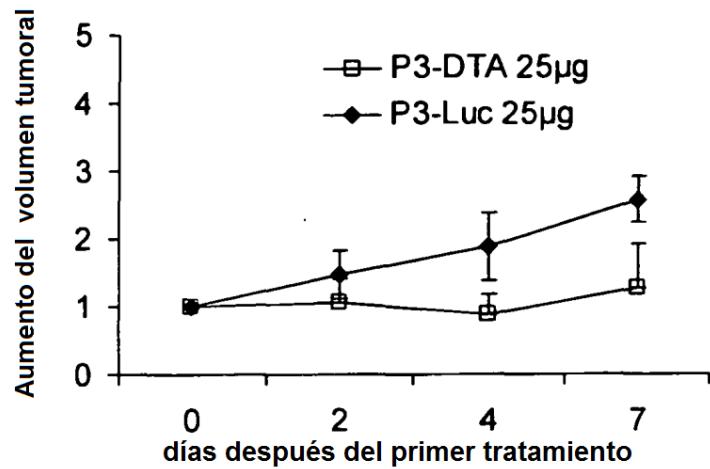
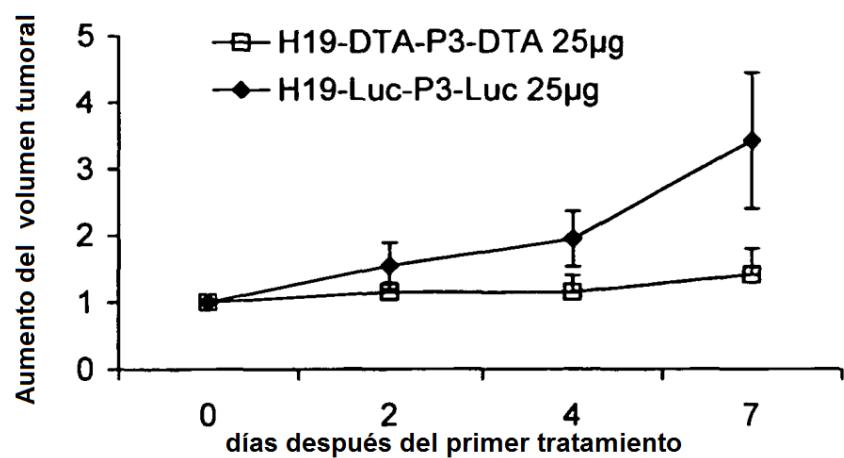


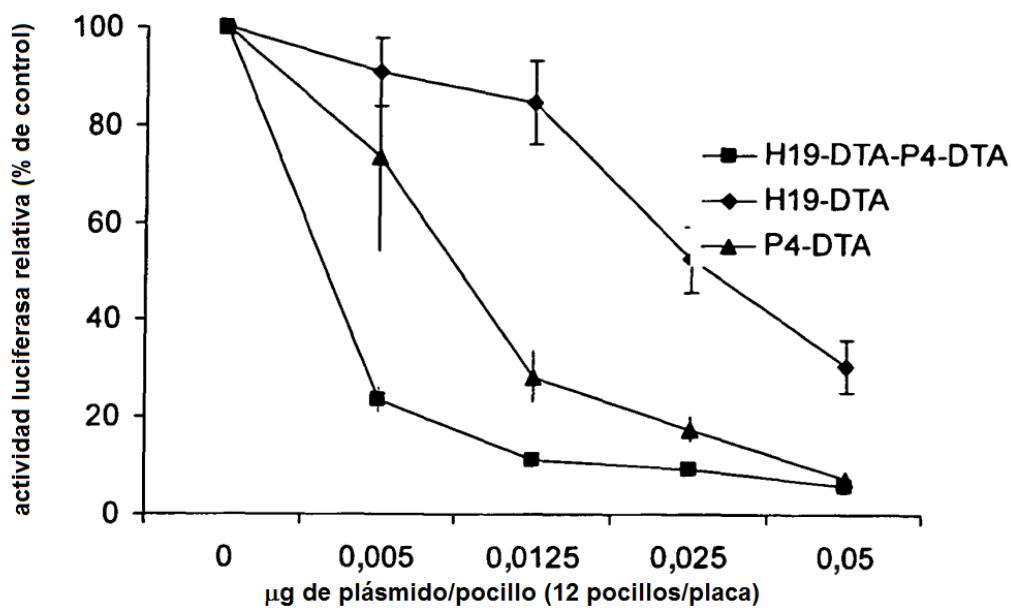
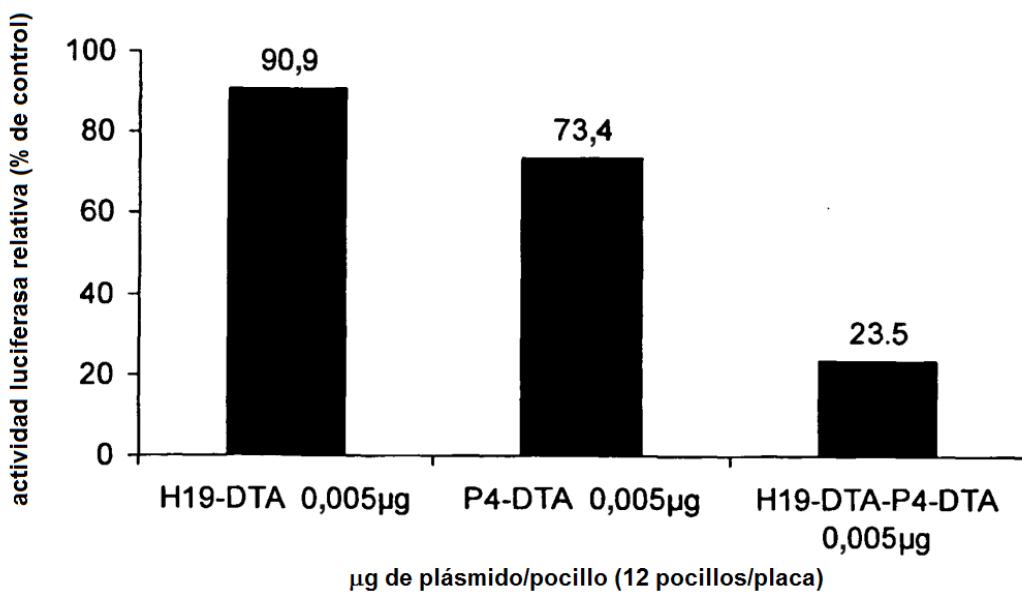
Figura 37



**Figura 38**



**Figura 39**

**Figura 40A****Figura 40B**