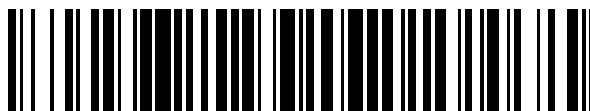


19



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**

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de cáncer, específicamente a nuevas construcciones de ácido nucleico que son particularmente útiles para tratar tumores que expresan H19 y/o IGF-II.

**Antecedentes de la invención**

10 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 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 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 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). 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 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 tumorigénico. La presencia de ARN de H19 puede potenciar la 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 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

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 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.

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 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).

El cuarto promotor de IGF-II (es decir, P1) no está impreso y se activa en el hígado y los plexos coroides 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).

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).

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).

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 Diftérica), 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.

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 unida operativamente con una  
35 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 tercer marco abierto de lectura puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II.

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.

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  
50 expone en SEC ID N°: 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 N°: 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 N°: 8, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 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 N°: 1-2, como se detalla posteriormente en el presente documento.

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.

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 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 transcrito dirigido por el promotor de H19, un transcrito dirigido por el promotor P4 de IGF-II y/o un transcrito dirigido por el promotor P3 de IGF-II.

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).

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, rhabdomyosarcoma, carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumores colorrectales, de útero y de células germinales testiculares, meduloblastoma, glioblastoma y tumores adenocorticales.

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.

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.

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

### Breve descripción de los dibujos

**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.

**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 cotransfectaron 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 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.

**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.** Repetición adicional del experimento descrito en **(A)**. **C.** Gráfico de barras de datos de 0,005 µg.

**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.

**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 barras de datos de 0,005 µg.

**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 barras de datos de 0,005 µg.

**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.

**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 cotransfectaron con 2 µg de LucSV40 y las 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.

**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.

**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.

**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.

**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 por 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;

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).

45 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:

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;

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;

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 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.

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.

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.

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 específica de H19.

Se representa en la Figura 1 una construcción ejemplar 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 ejemplares 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 N°: 11, 24 y 18, respectivamente, como se detalla posteriormente en el presente documento.

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).

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

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).

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).

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.

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.

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.

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

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 tumoristático, 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.

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

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

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.

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.

- Puede proporcionarse una construcción de ácido nucleico para su uso en la inhibición de metástasis 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.
- Puede usarse una construcción de ácido nucleico para reducir o aliviar un síntoma asociado con un trastorno neoplásico 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 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 trastorno neoplásico puede caracterizarse por la expresión de ARN de H19 y/o IGF-II a partir del promotor P3 y/o P4.
- Puede proporcionarse el uso de una construcción de ácido nucleico para la preparación de un medicamento para tratar un tumor en un sujeto humano. 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.
- Puede proporcionarse el uso de una construcción de ácido nucleico para la preparación de un medicamento para inhibir la progresión tumoral en un sujeto humano. 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 es 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.
- Puede proporcionarse el uso de una construcción de ácido nucleico para la preparación de un medicamento para inhibir metástasis tumoral en un sujeto humano. 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.
- Puede proporcionarse el uso de una construcción de ácido nucleico para la preparación de un medicamento para reducir o aliviar un síntoma asociado con un trastorno neoplásico en un sujeto humano. 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.
- Puede usarse una composición para tratar un tumor 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 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 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 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 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.

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 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 del promotor P3 y/o P4.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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-ribosa-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:

atggatcctgatgatgtgtgattcttctaatacttttggatggaaaacttttctgtaccacgggactaaacctggtatgtag  
attccattcaaaaagggtatacaaaagccaaaatctgtgacacaaaggaattatgacgatgattgaaaggggtttatagtagcagacaataa  
atcagacgtcgcgggatactctgtagataatgaaaacccgctctctggaaaagctggagcggtgcaagtgacgatccaggactg  
acgaaggttctgcactaaaagtgataatgccgaaactattaaagaagagtaggtttaagtcactgaaccgttgatggagcaagtc  
ggaacggaagagtttatcaaaaagggtcggtagtggtcctgcgctgtagtgcagcctccctcgtgaggggagttctagcgtggaat  
atattaataactggaacagcggaagcgtaagcgtagaactgagattaattttgaaacccgtggaaaacgtggccaagatgcgatg  
tatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgtcaggcgtatcttctga (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:

MDPDDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDDW  
KGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTPGLTKVLALKVDNAETIKKEL

GLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEI NFETRGRGQDAMY-  
EYMAQACAGNRVRRSL (SEC ID N°: 7). La DTA puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se  
expone en SEC ID N°: 7. La DTA puede consistir en una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID  
N°: 7. La DTA puede ser un homólogo de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser una variante de SEC ID N°: 7. La DTA  
puede ser un fragmento de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 7. La DTA  
puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 7.

La DTA puede ser al menos el 60 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 65 % homóloga de  
SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 72 %  
homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al  
menos el 76 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA  
puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID  
N°: 7. La DTA puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 86 %  
homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al  
menos el 90 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA  
puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID  
N°: 7. La DTA puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 97 %  
homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al menos el 98 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser al  
menos el 99 % homóloga de SEC ID N°: 7. La DTA puede ser más del 99 % homóloga de SEC ID N°: 7.

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 quimérica 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
- 10 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.

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 presente documento.

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 cualquiera de SEC ID Nº: 1-2.

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

ctgcaggcccccaacaacccctcacaaaggccaaggtggtgaccgacggacccacagcggggtggctgggggagtcg  
aaactcgccagtctccactccactcccaaccgtggtgccccacgcgggcctgggagagtctgtgaggccgccaccgctgtcagta  
25 gagtgcgccccgagccgtaagcacagccccggaacatgcggtcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccggggtgccc  
agcggctgtggggactctgtcctcggaaccgcggtgacgagcacaaagctcggtcaactggatgggaatcgccctgggggctg  
gcaccgcgccccaccagggggttggcgccactccctctgcccctcagcaccaccctactctccaggaacgtgaggtctgagccg  
tgatggtggcaggaaggggcccctctgtccatccgagtcgccagggacccgcagctggccccagccatgtgcaaagtatgtgcag  
ggcgctggcaggcaggagcagcagggcatggtgtccccctgaggggagacagtggtctggaggagaggtctggaccctgagg  
30 gagggtatggggcaatgtctcagccctgtctccggtgccaaggagggtgcggggagggcgtcttggagaattccaggatgggt  
gctgggtgagagagacgtgtgtgtaactgtccagggcgagggtggccctcgggggccctcgggaggggccctgctctgattgg  
ccggcagggcagggcggggaattctggcgggccacccagttagaaaaagccgggtaggaccgagga (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  
35 un fragmento de SEC ID Nº: 1. La secuencia de H19 puede ser una variante de un fragmento de SEC ID Nº: 1.

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 92 % 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 95 % 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.

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:

gacaaccctcacaaaggccaaggtggtgaccgacggacccacagcggggtggctgggggagtcgaaactcgccagt

ctccactccactcccaaccgtggtgccaccgcgggctctgggagagtctgtgaggcccccaccgctgtcagtagagtgccgcgc  
gagccgtaagcacagcccggcaacatcggtcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccggggtgccagcggtctgtggg  
gactctgtctctcggaaaaccgcgggtgacgagcacaagctcggtcaactgtagtgggaatcgccctggggggtggcaccgcgcca  
ccagggggtttgcgcacttccctctgcccctcagcaccaccacctactctccaggaacgtgagtctgagccgtgatgtgtggcagg  
aagggggccctctgtgccatccgagtccccagggacccgcagctggccccccagccatgtgcaaagtatgtgcagggcgctggcagg  
cagggagcagcagcaggtatggttccccgtgaggggagacagtggtctgggagggagagaagtctggccctgagggaggtgatgggc  
aatgtcagccctgtctccggtgcgcaaaaggagggtgtcggggagggcgtctttggagaattccaggtgctgtggtgagagaga  
gacgtgtgtggaactgtccaggggcggaggtgggcccctcgggggggccctcgggagggccctgctctgattggccggcagggcag  
gggcggaattctggcgggggccacccagttagaaaaagcccgggctaggaccgaggagcaggggtgagggag (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.

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.

La región potenciadora cadena abajo del gen H19 humano puede añadirse opcionalmente a una construcción de promotor de H119/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:

caaggacatggaattcgacacctgtgtcccccacctctgtgctgagcctaggaacctctgagcagcaggaaggccttgggt  
ctagagcctagaatggacccccagctccacctgtcccagcctagacccccagcattgaagggtggcagacttctgtgagaggaag  
ccactaagcgggatggacaccatcgcccactccaccggccctgtcccagccctgtcccagtcagcccagtcagcccagccctgcc  
cttccagccctgtcccagcccagctcatccctgtccctaccagcccagccctgtcctgtcccagcccagcccagcccagccct  
gccctgtccctgtccctgtcccttccagccctgaccttcccagccctgtcccagcccagctcatccctgtccctaccagctcagccctgcc  
ctgccctgtccctgtccctgtcccagccctaccagcccagccctgtccctgtcccagctcagccctgtcccaccccagcccagccc  
agcccagcatcggttctctggatgggtgagcagaggtctgaccttagaagaaggctggcaacgagggtgagggccaccagggccactg  
gggtctcacgggtcagacaagccagcagctgtccctgtccaggggtcggtgtcaccgccagcatgctgtggatgtgtcatgg  
cttcagggtgtgtggctccaggtgtccccgcctgtcccgaggccacccctcttatgcatgaacctgtgtccaccccacctct  
gagctgtcccgctctgtccgctgtcacccctgtgagcagccctgtgtgttcatggagtcttagcaaggaaggggagctcgaatt  
cctgcagccggg (SEC ID Nº: 3). La secuencia de H19 puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 3. La  
secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID Nº: 3. La secuencia de H19 puede ser un fragmento de  
SEC ID Nº: 3. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID Nº: 3. "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: 3.

La secuencia potenciadora de H19 comprende la secuencia:

ccgggtaccgagctccaggaagataaatgatttctctctctagagatgggggtgggatctgagcactcagagccaagg  
gcgcagtggtggtccggcgggggccctctcggccctccaacatggggccaggaggctagccctcaacctggaccccggtg  
ggctcagggaatggtcctccagtgcccagctgtgtgtttcagatgggtgtgcatgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt  
gtgtgtgtgtgtgtgtgtgctgacaaagcccgagagagccaaagacctgagtgagatctgtgacttctcaaagggggattggaag  
gttcgagaaagagctgtgtgacgctgtctccttaaggctgtgtgaaccacactagggcatagcataggcctgcgccccgtccctct  
tccctctccgcgctctctcttcttctccccccttaccgcgtccctggcctgtctgtgtgacaccgttgcccccttcaggggct  
gaggggaagccagcgggggcccttctgaaagcccacctgcaggccgggtgtgtgggaagggggtgtctctcgagaggctccgc  
ccgcccctgcagccgttctggaagcagctgctgtgggtattctgttctgtcagcactgtgcttgcaaagaaagcagacactgtgtctc  
tgtctttagggagcccccttcatcacccaacacctgtgtgacacaggcggggagccgggtgcggcgaggcgccgaggggtg  
ggggcgcgaccattaaacacacacggggcgaggcactgcagctctctctctctctctccgcgagccctgtcagcagggcagct  
gccaagcccccttaqcccaaggagccacagcadtgggtcagaacaagctcctgggaaggggggtgcagggcgagacccccggaga

5 tgaacggcctaccctgggtcgtgaggacagagggcacgttcatcaagagtggctcccaagggacacgtggctgtttgcagttcacag  
gaagcattcgagataaggagctgttttccagtgggcagcgagccagcaggggggtggtggtggcagccaggggtgaagggcag  
gctgtggggctgcagctgccttggggccactcccaggccttgcgggaggtgggagggcgggagggcggcagctgcacagtgggcc  
caggcgaggctctcagccccagtcgctctcgggtgggcagcccaagagggtctggctgagcctcccacatctgggactccatcacc  
caacaacttaataaggctgaattcacgtgtcctgtgacttgggtagacaaagccctgtccaaaggggcagccagcctaaggcagtg  
10 gggacggcgtgggtggcgggcagggcgagatgggacaacaggcagccgaggggtgtgcgggagatggggagatgggacaagcagg  
accgaggggtgtcggggcgatgggggagatggacaacaggaccgaggggtgtcgggacacgcgatgtcactcatgcacgccaatgg  
ggggcgtgggaggtggggagcagacagactgggctgggctgggcgggaaggacgggcagatg (SEC ID Nº: 4). La secuencia de H19  
puede ser un homólogo de SEC ID Nº: 4. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID Nº: 4. La  
secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID Nº: 4. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un  
15 fragmento de SEC ID Nº: 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 Nº: 4.

La secuencia potenciadora de H19 comprende la secuencia:

[illegible]

gggctgggcggaaggacgggcagatg (SEC ID N°: 5). La secuencia de H19 puede ser un homólogo de SEC ID N°: 5. La secuencia de H19 puede ser una variante de SEC ID N°: 5. La secuencia de H19 puede ser un fragmento de SEC ID N°: 5. La secuencia de H19 puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 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 N°: 5.

También pueden usarse fragmentos de este potenciador, por ejemplo fragmentos de las secuencias expuestas en una cualquiera de SEC ID N°: 3-5 para facilitar la expresión génica. El potenciador puede consistir en una secuencia como se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 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).

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

```

cccaaccccgcgacagcgggcactggttcgggctctgtctctacgaagtcgtagagcaactcggatttgggaaa
tttctctagcgttgccaaacacacttgggtcgccgcgccctcaggacgtggacagggagggttccccgtgtccagaaagc
gaccgggcatgtccccagcttccccaaatttgggcatgtccccgggttccaacggactggcgngtccccgacactgagg
actggccccgggtctcgctcaccttcagcagcgtccacggcctgccacagagcgttcgactcgctgctgactcgtgtgcgc
ccgcgagcgagcctccagcttcgcggtgagctccccggcgccgacgtccctcgcctctgcgccccgaccggtctcgccccg
catctgctgctgccccgggtgctggcgtcgctgcgccccgggagggcggtggggcgcgggacacggctcggaattg
cggctgctgctgctgctcgtctggtggcgccccgaaatccgcgccacttctgttctcattgcaaaagatctcatttggggaaagcg
gtcggaggggtccaaagtggggcgggcaggggggtggggcgagggacgcggaggagggcgctcccgccggcggttaaagt
cctctagcccgcggttaggactccgccccgggagggcgcgcgagngcgaagtgtgattgagcgggaagcgggggggcgaagg
gggcagggggggcgcggttccgccccggcgacccctcccccttggctaggcttagggcggggggggtggcggggtcggggattt
gtgctgtgttttactgtgtaaaatcacagtgttcttctacatcgttcaaaactcaccagagatgtttccccagacccccaaattatcgt
ggtggccccggagacgaactcgcgtctatgcaagtccaacgcactgaggacgggtaaccattatccagatatttgggtggggcgcg
aaaggcgagcctacttagaccgaccccggtgagctcggtcggtaggtaggatttgaactgtgtttcccgccctgactctctctctg
cgggcgagcctcgttaggtccaagcctggccagattcgcgcgagccggcctccgcgctccgcacctagcggggggtc
cggggctccggcgcgacccggggcgctcggtatgtggtgaggtccaaggccccggtggcggtcctcctgctggggca
ggtggcggtgctgcgccccggcgagccagggggccccctagccgcaacaaccagcaaggacccccgactacgccccaaagc
cactgcatctgactcagacggggcgaccccgagtcagcctcctgtggggcgctgggagccccgctgccccctgctgccccg
gagacccagctcacgagcacaggccggcgccccggcaccacgaaacccgggatggggccccgaattcttaggacgggcatcag
catggccttggcgctctgggtctccctgccccccacccagcctcgcccccgccacccccagccccctgagccgcccccccc
cccgggccccgaccccccggcgcccccgccccgcttggctcggttgcggggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcg
gtcccgggcgccccattggcgggcgcgagggccagcgcccccgcgggcctggggcggtggcggtggcgactataagagcc
ggcggtggggcgccccagttcgtcctcctcggcgaggtgctgtgagggcgccggccccggccccccccctccggcgccc
ccgctcctggtccacagcctgccccgctgtgcccaccagcgctccatcgggcaaggcgccccgctgacgccccgctgc
ctcgtgctgactccgctccggggcgcgctccgggggtcgcgctccggggcctgcggtatccccgcccctctctctatcacc
tcaactcccccatccccgcttgcggcgaggaggggttcccccgaggcagtcgggtcgcaggcccgccggtgtcaccccc
cccgctccccctccagcctcccccgggcgcgagcctcgggcgctcccttccggtgctgctccggagcgggccccggtgc
cgccacggcctgtccccctccgagggcggtcgcgagggcgaggggtcgtcggtcgcccaaacgagctggcgccccggt
ccgggtgcagcctccactccgccccagtcacggcctccccggccccctcgacgtggcgccctccctccgcttctgtgtcccc
gcgcccccttggcgcttggccccggccccgcttcttccgcaaccttccctcgtcctccctccgccccccagctcctagcctcc
gactccctccccctcacgccccctctcgcttccggaacaaagtggattaattacagcttctgttctcctgctgttctctc
ccgctgtgcgctgccccgctctcgtgtcctctctccccctcgccctctcttggcccccccccttcaagttcactgtctctccactat
cttgcctccctctatccttgatacaacagctgacctcamcccgataccmtccccccgaaaagtacaacatctggccccccccagc
cgaagacagcccgctcctcttgacaatcagacgaattctccccccccccccaaaaaaagccatcccccgcttgcctccgctcg
acattcgcccccgactcgccagagcggtggtgagaggttccggcaggagggccaacgccccgctgttcggmgcga
cacgcagcagggaggtggggcgagcgtcgccggttccaggtaagcggtgtggtggcgccggcgggcgggcgggcggtggg
cgggcggggttgcggcgacgccccggccttccgccccgctcccgccccggggcctgcggggtcgggcgggcggtgagc
cgggggggaggaggaggaggaggaggaggagcgagcggtcggggtcccgttccctgcgcgagcccgctaccnnnnnnnn
nnnnnnnnnnnnnnnnnnngacgtccccgctgaagggggtcggtctgtgggtgaggggggtccgcctcacatgtgtgattcgt
gccttgcggggccttggcctccgggtgtgtggtaacgaggagggcgcgagccgcagaagccacccctgggtgctgtgacgcg
gtgccagcgagaccgagaggaagacggggcgggcgggggccaggatggagagggggcgagttggcaggagtcattggcaga
cgccacactcgagcactctccccacaccccttggcctctgtccgaacatttcaaacaggagtccccggagagggggagaggg
ggctgctgtgtgagcctaagaaggcgagaccccttcgacccggagagagggcgcgccgctgccccagtggaacgtggaattt
tccatacaacggaggtcggaaggagaccccccccccttactgcccgtgaagagatgagcggggtgacggatgggagcc
catggcacttctgacgggatgtccagggctccggttgggggtgacggagagaagagactgggtgggaggaggagagggcggg
agcaaaaggcggggggtgtgtgtagagggagaggggtgggggttaggtggagccgggggtgggagagtcgggtcacacataa
aactgaggcactgaccagcgtgcaactggaattagcttctctgtgaaagagacttccagcttccctcctcctcctcctcctc
ctgccccagcgagccttctgtgagctgtaggttaaccaggggtgtggagtgaaggacccccgctgccatccactccagcctgagggc
agggcagcagggggcgacggccccacgctgggctcgggcctcgacggccagccccgctgctctcgacagcaccctcc

```

ctcttttctctgcccctgcccccactggcgctctctgctccctacactgctccttccctttctgttcttcccttcggccccctcttgcacag  
ctcaggacttttctggggccctacactgctccgcaccgctgcatgcttctgctctgttctgcccgttcccctgacccggacctccaagc  
gcagagtgggtgggctgttgcggaagcgccgaggggtagagtggccagctggcggagtgtgctcttagaatttgaagggggt  
5 ggcagagggggcggtgagaggactggccagggtccgccatgtcaaggagatgaccaaggaggctttcagatccctggcgagctg  
cccactagcttttagagagggatgcaaagttgttcttcttccactgcccgtcagctcgcacataattattgcatcaaaaactccccct  
gggtctgcccagcagagctggggctgcccgccttgagggtaccaccttctgcaggagcaggccaactgctgtggtggctccggg  
cttcccaccctccagtggtgatacccggttgcactgtgagccttgagggggtgtgccttaagctgctcaactccccctcagattgt  
agtctggggaacctggtgtcggaacttccagggtggcctgagctggtcttctcagctccacggggagagtttggtagcgaataataggga  
10 gatgttctggggccccctggcctactggttcgatttgaggcctggaaaggaggctcgggcgtgtgtgtgtgttgggggtaccaag  
cagactggagtggagaactgggtgactgggaaaaacaagtttctagagcatgggtggcgtggttgtgtaaccattggagtcgcttga  
cccaggcctggctcagctgcagactggaaaggtggaaaagccagggggaggggcggggctggccagcaggactggcctgctg  
ctttgagggcgatggttcccttggacccccctgctcagctgggggttgggggaggaaggggctggtcctcttggagcacatgctc  
tgtatgggtggggctgctgcatcttggcgctggaggcctgagaagtggcgatgtaacgttgggtggccctgcccccatggt  
15 gtcataggcaggaggtcgggtcgggttgcagcttggcgccctgagctgtggaatggcgtgagcttgcgaataatgccccctgcaga  
tggtaacccctctgtaaaaattactagtcttctgcaaatggaaggaaactgggccttltctgtgtcttggacgcttcaattgcacatg  
gcccctgcgccctacactcggcatatgacctgtgtgttacttttgaataaaaaataatgttataggaagccgtgttcaatttcaactga  
atttgtagggtggcaaatttgtttgggaagggcaccttggcctggggcttggcctggctgccccgctacgcccacttcttcccggcc  
20 ccagacaccaatgggaatcccaatggggaagtcgagtgtgtgttctcacttcttggccttgcctctgtctgcatgtgtcttaccgc  
cccagtgagacccctgtgcggcgaggagctggtggacccctcagttctgtgtggggaccgcgggtctacttcagtaagtagcag  
ggaggggcttctcagaccttggtagggccctagagtacgggtgaggaatcccatctcaagccaggggagcacactctaggtc  
agcagtcacggcgtgctgtgagacttgccttccggcgttctgagcacgtgcggttgcaggcgtccacacacacagctgcct  
25 ttcccatcacacgcctccttgaaggggtgggccagaggtgccccctagacgtcaggggcatctacaggggttccctgggcatcaga  
atttctgtggggggcgtgaggtcctgctcctgaggcaccgcacgctagtgcagggtctcaggctctggaggaagagctgccttct  
ttctgacacttttggacattttgacaaggagctgctgttgggtgaatgatcagaattaaaatcaataaagtgattatataataaaatcaat  
30 aagacaagtgcagtgtgtgggtggcaggggtgagcgtgtcatgcgcctccttgggccccaaagggtgcggtgggggtgcccacctg  
ctgacctcaaggacgtctcagcttctcctcatgttctcttctgttctccagcctgggggtggcagggtgggtgcatggccattgtcctt  
gagacccccaccctcagatagggggctgggtggtgagtcagagagcaggcatggtgcttggcagctctgtagggcgagggagg  
ggcgtccttacttgcgagcgccgcaacttattccactgacactcaccacgtgacatcttaccacactgcttactcagctgtgaaat  
35 ggggtcacaggatgcaaatgacacttcaaagcttctctgaaaagtcttctgctgtgactctggaagccccctgccgcctggcctctc  
ctgtgcccctctcttgcctgccccatttggggtaggaagtggcactgcagggcctggtgccagcagcttctgccaggggagaagc  
ttccctgcaccaggcttctctgagaggaggggagggccaagccccacttgggggcccccgtagcggggcctctgtcctcctctcc  
ggctgatggcacctgccccttggcaccccaagggtggagccccacgaccttccccttccagctgagcatgtctgtgggggagagg  
40 ggaagacgggaggaaagaaggaggtgttccatcacgctcctcagcctcctctcctccgcttctcctcctgctcctgtctcctgt  
ctcagcagctcaggggtggtgttggccctccagcctccagggtggtgcccagggcagagtcacagctcagcagcagctcagctcctc  
35 tgtggggccccgtgaactgggtcagactccacacattttccaaaccactccattgtgagccttggcttgggtgtgtcctctggtgtg  
ggaccaagagctgtgtccattttctatgaggaaggaggcagcagaagtcacgggctggttgggccccactcacctccccctctca  
cctctcttcttctgggacgctctgctgcccggctctcacttccctcccctgacccgcagggtggctgctgnccttccagggctggcct  
gagggcaggggtgtgttgcctgggggttcggcctccggggcctgggggtcgggtgcggtgctaacacggctctctgtgtgtgggac  
40 ttccaggcaggcccgcaagccgtgtgagccgtgcagccgtggcatcgttggagggtgtgttccgcagctgtgacctggccctct  
ggagacgtactgtgctacccccgcaagtcgagaggagcgtgtgacccctccgaccgtgttccggtgaggggtcctggccccctt  
tccactctctagactgagcaggaataggcttggcgccagcgttctctgttggccttggcacttggccacttggccagggaacaggacc  
45 gtgacttcttctgtgtgtgtggccccgggagcagctcagacgctggctccttctgtccctgtcccgtggacattagctcaagtactga  
tcagtcacaggggtggcctgtcaggtcaggcgggcggtcaggggaagagcgtggagagcaggcacctgtgaccagccccctc  
ccctcccaggacaacttcccagagataccctgggcaagttcttccaatatgacacctggaagcagtcacccagcgctgcgagg  
50 ggctgctgctcctcctgctgcccgcggggtcacgtgctgcgaaggagctcagggcggttcaggggaggccaaacgtacccgtcc  
cctgattgtctacccacccaagaccccgccacggggcgccccccagagatggccagcaatcggaagtgcgaaactgcgg  
caagctgcagccccggcgccaccttgcagctccttctgaccacggagcttccatcaggttccatcccgaaatctctcgttcca  
cgctcccctgggtcttctcctgaccaaagctcccggttccccctcccccgaacaggctacttctcctgccccctcagctcggctgagg  
55 aagcacagcagcatcttcaaatgtacaaaatcgattggctttaaaccaccttcacataccctccccccaaattatccccaaatccccca  
cacataaaaaaataaaaacattaaactaacccttccccccccccacaacaacctttaaactaattggcttttagaaacacccccc  
aaaagctcagaatttgctttaaataaaaacaccacaaaaaaatcaattggctaaaaaaagattaaaaaacgaattggctgag  
aaacaattggcaaaataaaggaaatttggcactcccccccccttcttcttcccttggactttagtcaaattggcctggacttgagtc  
cctgaaccagcaagagaaaaagaagggccccagaatcacagggtgggcacgtgcggttaccgccatctcccttctacagggaattt  
cagggtaaact

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:

gagctcgcccatgcaggtaggatttgagctgtgttccgccctgatcctctctccttgccggccggagcctccgtaggct



ccaagcctggccagattcggcgcgcagccggccttcgcgcgtccgcacctagcgggggtctcgggggtctcggcgcggcac  
cggggggcgctcgggatctggctgaggtccaaagcccgctggccggctctctctgtgggacaggtggcggtgcgcgcccc  
gcccagccagggggccccctagccgcaacaaccagcaaggacccccgactagcccaagccacctgcattgcactcaga  
cggggcgcacccgcagtgacgtctctgttggggcgctgggagccgcctgccccctgctgccccgagacccagctcacgagc  
acaggccgcccgggcacccagaaaaccgggatggggccctgaattctctaggacgggcattcagcatggccttggcgctctgc  
ggctccttgccccccacccagctcgccccgcgcacccccagccccctgcgaccgcgcgcccccccccccggggccccagggc  
cccagcccgacccccgccccgctcttggctcgggttgcgggggcggggcgggggcggggcgagggtctccggggcgccca  
ttggcgcgggcgcgagccagcgccccgcgcggccctgggcgcggctggcgcgactataagagccgggcgtgggcgccc  
cagttcgctgtctccggcggagctgcgtgagcccgccggccccggcccccccccttcgggcgcgccccgcctcttgcccac  
gcctgcgcgcgtctgcccacagcgcctccatcgggcaaggcggccccgcgtcgac (SEC ID Nº: 8; los primeros 6 pares de bases  
[pb] son un sitio de restricción añadido que puede usarse opcionalmente en subclonación).

El promotor P3 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 8. La secuencia de ácido nucleico del promotor P3 de IGF-II puede consistir en SEC ID N°: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID N°: 8. el promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID N°: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID N°: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 8. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 8.

La secuencia del promotor P3 es:

[illegible]

El promotor P3 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 12. La secuencia de ácido nucleico del promotor P3 de IGF-II puede consistir en SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 12.

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 N°: 12. El sitio de unión a Sp1 puede ser los restos 388-399 de SEC ID N°: 12. El sitio de unión a Sp1 puede ser otros sitio de unión a Sp1 hallado en SEC ID N°: 8 o SEC ID N°: 12. El promotor P3 de IGF-II puede comprender una caja TATA. La caja TATA puede ser los restos 476-482 de SEC ID N°: 12. La caja TATA puede ser otra caja TATA hallada en SEC ID N°: 8 o SEC ID N°: 12.

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.

El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en  $-291$  -  $+130$ , en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en  $-1232$  -  $-812$ , en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados en  $-238$  -  $+140$ , en relación con el sitio de inicio de P3. El promotor P3 de IGF-II puede contener los elementos promotores hallados 5' del resto  $-515$ , 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 (también denominado en el presente documento "P4"). La secuencia del promotor P4 puede ser la expuesta en SEC ID N°: 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 N°: 9. La secuencia de ácido nucleico del promotor P4 de IGF-II puede consistir en SEC ID N°: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID N°: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID N°: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID N°: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 9. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 9.

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

```
ggatcccaaaatgtgttctgtcttcatctgccaattttacgtaatatggctctacggcaaaattcccaattcatatggagaa
ttttcttaactacccctctcacaaattgggtccccaagctagctggccctatttgagacctcttctctatgttcccaattgcattggagca
acttctctcatccccaacacgtgtaatttttctggagctcagatttagcattaatcacgggtccacattaacggaggtcccggtt
ccctctctcaggacacccattcgtaagcccgcaaggcagaagaactgccttgcgttcccaaaatttgggcatgttccgggtc
gccggccacccactgcagcttcccaaccccgcgacagcggtggttccggcctctgtctctacgaagtcccagagca
actcggatttgggaaatttctctagcgttgcacaaacacacttgggtcgccgcgcgcctcaggacgtggacagggagggttcc
ccgtgtccaggaaagcgacccgggcatgtcccccagcttcccccatttgggcatgttcccggttctccaacggactggcggtgc
tccggacactgaggactggcccggttctgcctcaccctcagcagcgtccaccgcctgccacagagcgttcgactcgtcgtgc
tgagctctgtgtgcggcgacgcagcttcggtgagctcccgcgcgccgatccctcgcctctgcgcccctg
accggctctggcccgcatctgctgtctgcccggtgctggcgtcgtctccggctgcccgggaggc (SEC ID N°: 13).
```

El promotor P4 de IGF-II puede comprender una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 13. La secuencia de ácido nucleico del promotor P4 de IGF-II puede consistir en SEC ID N°: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser homólogo de SEC ID N°: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de SEC ID N°: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser un fragmento de SEC ID N°: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser un homólogo de un fragmento de SEC ID N°: 13. El promotor P4 de IGF-II puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 13.

La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 60 % homóloga de una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 65 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 70 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 72 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 74 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 76 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 78 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 80 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 82 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 84 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 86 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 88 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos 90 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 92 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 94 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 95 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 96 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 97 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos 98 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser al menos el 99 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 13. La secuencia P4 de IGF-II puede ser más de el 99 % homóloga de SEC ID N°: 9 o SEC ID N°: 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.

Estas secuencias reguladoras de genes impresos y no impresos genómicamente que se expresan en células cancerosas pueden delinear 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 deleciones 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 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:

```
tcatgagcaccgagagcatgatcaggatgtggagctggccgaggaggccctgccaagaaaacaggcgccctcagg
```

gcagcagaagatgcctgttcctgagcctgttcagcttctgatcgtggccgagccaccacctgttctgctgctgaacttcggcgtga  
tcggcccccagagagaggaggtccccagagacgtgagcctgatctccccctggccaggctgtgagaagcagcagcagaacccc  
cagcgacaagcccggtggccacgtggtggccaacccccaggccgagggccagctgcagtggtgaacagaagagccaacgcct  
5 gctggccaacggcgtggagctgagagacaaccagctggtgggtgccagcgagggcctgtacctgatctacagccaggtgctgttca  
agggccagggtgccccagcaccacgtgctgctgaccacaccatcagcagaatcggcgtgctctaccagaccaaggtgaacctg  
ctgtccgcatcaagagcccttgccagagagagacccccgagggcgccgagggccaagccctggtacgagcctatctacctgggcg  
gcgtgtccagctggagaagggcgacagactgagcgccgagatcaacagaccgactacctggatttcgcccagagcggccaggt gtacttcggcat-  
catcgccctgtgataatctagaacctgg (SEC ID N°: 14). La secuencia de ácido nucleico que codifica el TNF-alfa puede  
10 consistir en SEC ID N°: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser homóloga de SEC ID N°: 14. La  
secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser una variante de SEC ID N°: 14. La secuencia que codifica el TNF-  
alfa puede ser un fragmento de SEC ID N°: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser un homólogo  
de un fragmento de SEC ID N°: 14. La secuencia que codifica el TNF-alfa puede ser una variante de un  
fragmento de SEC ID N°: 14.

La secuencia de aminoácidos del TNF-alfa es

15 MSTESMIRDVELAEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSLIVAGATTLFCLLNFG  
VIGPQREEFPRDLISLISPLAQAVRSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGQLQWLNRRANAL  
LANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFGQGCPSHTVLLTHTISRIAVSYQTKVNLL  
SAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYF GIAL (SEC ID N°: 15)  
20 La secuencia del TNF-alfa puede consistir en SEC ID N°: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser homóloga de  
SEC ID N°: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser una variante de SEC ID N°: 15. La secuencia del TNF-alfa  
puede ser un fragmento de SEC ID N°: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser un homólogo de un fragmento  
de SEC ID N°: 15. La secuencia del TNF-alfa puede ser una variante de un fragmento de SEC ID N°: 15.

25 Pueden generarse alteraciones en una secuencia reguladora (por ejemplo una secuencia que codifica un producto  
génico 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  
30 progresivamente mayores en las secuencias reguladoras incubando el ADN con nucleasas durante mayores  
periodos de tiempo.

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.

35 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,  
40 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.

45 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  
50 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  
55 el ácido nucleico con respecto a progresión tumoral, por ejemplo por los procedimientos descritos en el presente  
documento.

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  
60 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.

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 polio, 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.

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.

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 ejemplares que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40.

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.

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.

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, 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.

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.

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.

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 N° 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 crítica 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 N° 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  $\text{CaPO}_4$  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. Phar. 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.

### 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 marcarse como objetivo en terapia génica usando el promotor de IGF-1 para dirigir la expresión de un polinucleótido heterólogo.

Para la mayoría de las aplicaciones de análisis de ARN, puede prepararse una sonda marcada que hibride específicamente con el transcrito 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 transcrito 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.

Puede generarse una sonda de ARN antisentido marcada *in vitro* usando un plásmido de expresión T7 o T3. Las sondas de H19 también pueden marcarse 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.

Los marcadores apropiados para sondas polinucleotídicas incluyen nucleótidos que incorporan isótopos radiactivos (tales como  $^{35}\text{S}$  y  $^{32}\text{P}$ ), marcadores fluorescentes, luminiscentes y de color, y restos enzimáticos.

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 determinar el nivel de expresión de ARNm del gen de interés.

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).

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 capaz de activar la expresión de las secuencias reguladoras de la transcripción.

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.

### Composiciones y kits farmacéuticos

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

La toxina diftérica puede ser toxina diftérica A (DTA). Dicha toxina diftérica puede comprender una secuencia como se expone en SEC ID N°: 7.

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 N°: 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 N°: 8, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 17.

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

Puede proporcionarse un envase farmacéutico que contiene un ciclo de tratamiento antineoplásico para un mamífero individual que comprende un recipiente que tiene una unidad de construcción de ácido nucleico en forma farmacéutica unitaria.

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.

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 par aproximar las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, potenciando la estabilidad química e isotonicidad.

- 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.

- 45 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 policationica 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 transcrito dirigido por el promotor de H19 y/o un transcrito dirigido por el promotor P4 de IGF-II. Dicha construcción de ácido nucleico puede comprender además un
- 45 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.

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

5 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.

La toxina diftérica puede ser toxina diftérica A (DTA). Dicha toxina diftérica puede comprender una secuencia como se expone en SEC ID N°: 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 N°: 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 N°: 8, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 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 síntomas de cáncer, reducción del alcance de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la

20 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.

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

25 uso puede expresar de forma endógena un transcrito dirigido por el promotor de H19 (por ejemplo un transcrito de H19) y un transcrito dirigido por el promotor P3 de IGF-II (por ejemplo un transcrito de IGF-II). Una célula del tumor diana puede expresar de forma endógena un transcrito dirigido por el promotor de H19 y un transcrito dirigido por el promotor P4 de IGF-II (por ejemplo un transcrito de IGF-II). Una célula del tumor diana puede expresar de forma endógena un transcrito dirigido por el promotor P3 de IGF-II y un transcrito dirigido por el promotor P4 de IGF-II. El

30 tumor diana puede ser un tumor que pueda expresar de forma endógena el transcrito de IGF-II dirigido por P3, transcrito de IGF-II dirigido por P4 y transcrito 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, rabdomiosarcoma 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, cánceres orales, tumores trofoblásticos gestacionales, meningioma y hepatoma. El tumor puede seleccionarse de

45 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.

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

50 (por ejemplo carcinoma de células claras), cáncer pancreático (por ejemplo carcinoma ductal pancreático, carcinoma epitelioide.

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

55 un cáncer de vejiga superficial. El tumor diana puede ser un carcinoma cervical. El tumor diana puede ser un

carcinoma 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 rhabdomioma. 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 transcrito 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 transcrito 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 transcrito 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, polietilenglicoles, 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; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbacina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazucona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; 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; ilmofofina; 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; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; pelliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; 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; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; clorhidrato de topotecán; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; 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

### 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:

- 5
- 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

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 espectroscopia UV. Las construcciones finales se verificaron por secuenciación y se nombraron 0704870 (SEC ID N°: 21) y 0704867 (SEC ID N°: 23), respectivamente. La congruencia de secuencia fue del 100 %.

El promotor P4 que se utilizó tuvo la siguiente secuencia:

acitcccggtcggctcgtgggtgcaggggggtgccgcctcacatgtgtgattcgigccttgccgggccctggcctccgggggtg

[illegible]

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 espectroscopia 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:

ggtaccgacaaccctcaccaagggccaaggtggtgaccgacggaccacagcggggtggctgggggagtcgaaactc  
 gccagtcctcactccactccaaccgtggtgccccacgcgggcctgggagagtctgtgaggcccccaccgcttgcagtagagtgc  
 gcccgcgagccgtaagcacagcccggcaacatgcggtcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccgggggtgccagcggc  
 tgtggggactctgtcctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagctcggtaactggatgggaatcggcctggggggctggcaccgc  
 gccaccaggggggttgcggcacttccctctgccccagcaccaccctactctccaggaacgtgagttctgagccgtgatggtg  
 gcaggaagggggccctctgtgccatccgagtcgccagggacccgcagctggccccagccatgtgcaaagtatgtgcagggcgctg  
 gcaggcaggagcagcaggcatggtgtcccctgaggggagacagtggctctgggaggaggagaagtcctggaccctgaggaggtga  
 tggggcaatgctcagccctgtctccgatgcaaaggaggggtgcggggaggccgtctttggagaattccaggatgggtgctgggtg  
 agagagacgtgtgctggaactgtccagggcggaggtgggccctgcgggggccctcgggagggccctgctctgattggccggcagg  
 gcaggggcggggaatcctgggcggggccacccagttagaaaaagcccgggctaggaccgaggagcagggtgagggagaagcctt  
 ggcatcgggtactgttggtaaagccaccatggatcctgatgatgtgttgattcttctaaatctttgtgatggaaaactttctctgtaccac  
 gggactaaacctgggtatgtagattccattcaaaaaggatatacaaaaagccaaaatctggtacacaaggaaattatgacgatgattggaaa  
 gggttttatagtaccgacaataaatacgacgctgcgggatactctgtagataatgaaaaccgctctctggaaaagctggaggcgtggt  
 caaagtgacgtatccaggactgacgaaggttctgcactaaaagtggataatgccgaaactattaagaagagttagggttaagtcac

tgaaccggtgatggagcaagtcggaacggaagagttatcaaaagggtcggatggtgcttcgctgtagtgctcagccttcccttcgc  
 tgaggggagttctagcgttgaatatattaataactgggaacaggcgaaagcgtaagcgtagaacttgagattaatttgaacccgtgg  
 aaaacgtggccaagatgcgatgtatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgcaggcgatctttgtgaaggaaacctacttc  
 tgtggtgtgacataattggacaaactacctacagagatttggggatcctctagagtcggggcgccggccgcttcgagcagacatgata  
 agatacatigatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgtatgctattgctttatttgaac  
 cattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcagggtcagggggagggtgtgggagggtttttaagcaa  
 gtaaaacctctacaaatgttgtaaaatcgataaggatccgtcgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctccttcgggtgg  
 gcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaactcglaggacagggtgccggcagcgcctcttcgcttc  
 tcgctcactgactcgtcgctcggtcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggtataacgggtatccacagaatc  
 aggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcttgcgtggcggttttcc  
 ataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataccag  
 gcgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttcgaccctgcgcttaccggatacctgtccgccttctcccttcgggaagcg  
 tggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcgaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttca  
 gcccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtcgaacccggttaagacacgacttatgccactggcagcagccactggta  
 acaggattagcagagcgagggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatt  
 ggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgctggtagcggtgg  
 tttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtgga  
 acgaaaactcacgttaagggttttggatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaatacaat  
 ctaaaagtatatatgagtaaaacttggctgacagttagaaaaaactcatcgagcaicaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaat  
 accatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcgagttccataggatggcaagatcctggatcggctgc  
 gattccgactcgtccaacatcaatacaacctattattccctcgtcaaaaaataagggttatcaagtgagaaatcacctagatgacgact  
 gaatccggtgagaatggcaaaagtattgcatttcttccagactgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcac  
 aaccaaaccgttattcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaalacgcgacgctgtttaaaggacaattacaacaggaatcgaat  
 gcaaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatatttccctgaatcaggatattcttataacctggaatgctgtttccggg  
 gatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtagcgataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtcagccagttta  
 gtctgacctatcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgttcagaaacaactctggcgcatcgggcttccatacaatcga  
 tagattgtgcacctgattgcccgaattatcgcgagccatttataccatataaatcagcatccatgttggaatttaacgcggcctaga  
 gcaagacgtttccggttgaatatggctcatacttctcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatt  
 gaatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgcgcctgtagcggcgcaatag  
 cgcggcggggtgtggtgttgacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccctagcgcgcctccttctcgttttcttcccttctc  
 gccacgttcgcccgtttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccaaaa  
 aacttgattaggggatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggttttcgcccttgacgttgagtcacggttcttaatagtg  
 gactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctttgatattataagggaatttgcgatttcggcctattgggtaaaa

aatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaatttgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgg  
gaagggcgatcgggtgcgggctcttcgctattacgccagcccaagctaccatgataagtaagtaatttaaggtacgggaggtacttgg  
agcggccgcaataaaatatctttattttcattacatctgtgtgttgggtttttgtgtgaatcgatagtaacatacgctctccatcaaaacaa  
aacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcgaagtgcaggtgccagaacatttctctatcgata (SEC ID N°: 16)

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

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

ccctaccaagggccaaggtggtgaccgacggacccacagcgggggtggtggtgggagtcgaaactcgccagtctccac  
tccactcccaaccgtggtgccccacgcgggcctgggagagtctgtgaggcccccaccgcttgcagtagagtgcgcccgcgagcc  
gtaagcacagccccggcaacatgcggtcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccggggtgccagcgggtgtggggactct  
gtcctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagctcggtcaactggatgggaatcgccctgggggggtggcaccgcgcccaccagg  
gggtttgcggcacttccctctgccccacagcaccacccctactctccaggaacgtgagtctgagccgtgatggtggcaggaaggg  
gccccctgtgcatccgagtcgccagggacccgcagctggccccagccatgtgcaaagtatgtgcagggcgctggcaggcaggg  
agcagcaggcatggtgtcccctgaggggagacagtggctctgggagggagaagtcttgaccctgagggaggtgatggggcaatgc  
tcagccctgtctccgatgccaaaggaggggtgcggggagggcgctttggagaattccaggatgggtgctgggtgagagagacgt  
gtgctggaactgtccagggcgaggtgggcccctgcgggggcccctgggagggcccctgctctgattggccggcagggcaggggcg  
ggaatctggcgggggccaccccaggttagaaaaagcccggttaggaccgaggagcaggggtgagggagaagcttggcattccgg  
tactgttgtaaagccaccatggatcctgatgatgtgtgattcttctaaatctttgtgatggaaaacttttcttctgaccacgggactaac  
ctggttatgtagattccattcaaaaaggtatacaaaaagccaaaatctggtacacaaggaaattatgacgatgattgaaagggtttatagt  
accgacaataaatacagacgctgcgggalactctgtagataatgaaaacccgctctctggaaaagctggagggcgtggtcaaaagtacgt  
atccaggactgacgaaggttctgcactaaaagtggataatgccgaaactattaagaaagagttaggttaagtctcactgaaccgttgat  
ggagcaagtcggaacggaagagttatcaaaaaggtcgggtgatggtgcttcgcgtgtagtgtcagccctcccttcgctgaggggagtt  
ctagcgttgatataattaactgggaacaggcgaaaagcggttaagcgtagaacttgagattatgttgaacccgtggaaaacgtggcc  
aagatgcgatgtatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgcaggcgatctttgtgaaggaaaccttacttctgtgtgtgaca  
taattggacaaactacctacagagatttggggatcctctagagtcggggcgccggccgcttcgagcagacatgataagatacattgat  
gagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttattgtgaaatttgtatgctattgctttatttgaaccattataagctg  
caataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaacctcta  
caaatgtggttaaatacgataaggatccgtcgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctcctccgggtgggcgcggggcat  
gactatcgtcgccgcacttatgactgtcttctttatcatgcaacitcgtaggacaggtgccggcagcgctcttccgcttccctcgtcactgac  
tcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacgggtatccacagaatcaggggataacg



caggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggttttccataggctccgc  
 cccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccct  
 ggaagcctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgtccgcttttcccttcgggaagcgtggcgcttctc  
 atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgt  
 gcgccttatccggtaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc  
 agagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgt  
 ctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaccacccgctggtagcgggtggtttttgtttgca  
 agcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactca  
 cgttaagggttttggatcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaatcaaatatata  
 gagtaaaacttggtctgacagttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcataatcaggattatcaataccatattttgaa  
 aaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgagggcagttccataggatggcaagatcctgggtatcggtctgcgattccgactcgt  
 ccaacatcaatacaaccttaatttccctcgtcaaaaaataagggtatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgaga  
 atggcaaaagttaatgcaatttcttcagacttggtcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaaactcgcacatcaacaaaccgttat  
 tcatcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgaaccggcgag  
 gaacactgccagcgcatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttctaataacctggaatgctgttttccggggatcgagtggtga  
 gtaacctgcatcatcaggagtaggataaaatgcttgatggcgggaagaggcataaattccgtcagccagtttagctgaccatctcatc  
 tgaacatcattggcaacgctaccttgccatgttcagaacaactctggcgcatcgggcttccatataatcgatagattgtgcacctg  
 attgcccagactatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctagagcaagacgttcccg  
 tgaatatggctcactcttcttttcaatatttgaagcattatcagggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaa  
 ataaacaaataggggttccgcgcacatttcccgaaaagtgccacctgacgcgcctgtagcggcgcatgaagcgcggcggtgtgg  
 tggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcggcgcttcttcttcccttcttctcgcacgttcgcccgg  
 ctttcccgctcaagctctaaatcgggggtcctttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtg  
 atgggtcacgtagtgggccatcgccctgatagacggtttttgccccttgacgttgagtcacggttctttaaagtggactctgttccaaa  
 ctggaacaacactcaacctatctcggctattctttgattataagggtatttgccgatttcggcctatttggttaaaaaatgagctgattaa  
 caaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaatttgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgg  
 gcgggcctcttcgctattacgccagcccaagctaccatgataagtaagtaataatgaagtagggaggtacttgagcggccgcaataa  
 aatatctttattttaccatctgtgtgtgtgtttgtgtgaatcgatagtaacatacgcctcctcaatacaaaaacgaaacaaaaca  
 aactagcaaaaataggctgtccccagtgcaagtgagggtgccagaacatttctatcgataacttccggctcgtgtgtgggtgcaggg  
 ggtgccgcctcacatgtgtgattcgtgccttgcgggcccgtggcctccgggtgctgggtaacgaggagggggcgaggagccgcagaa  
 gccaccctggatgttgacgcgggtgccagcgagaccgagaggaagacgggggtggggcggggcccaggtggagagggggccg  
 agttggcaggagtcagggcagcgcacattcgcgacatctccccacacccccctgtgctctgtccgaacatttccaaacaggagtc  
 ccgggagaggggggagaggggctgctggtctgaggctaagaagggcagagccttcgacccggagagaggccggcccttgcct  
 agtgggcagcgtggaagttccatacaaggaggtgggaaggagaccccccccccttactgccctgtgcagagatgagccgggg

gtgcaggatgggagcccatggcacttcgctacgggatgggtccaggggctcccgggtggggggtgcaggagagaagagactggctggg  
aggaggggagaggggcgggagcaaaaggcgcgggggagtggtcagcaggggagaggggtggggggtaggggtggagcccgggctgg  
gaggagtcggctcacataaaaagctgaggcactgaccagcctgcaaactggacattagcttctcctgtgaaagagacttccagcttc  
tctcctcctcttctcctcctcctcctgccccagcgagccttctgctgagctgtagggggatcttctagagtcggctagcggcattccggt  
actgttggtaaaagccacatggatccigatgatgtgttgattcttctaatacttttgatggaaaacttttctcgtaccacgggactaaacc  
tggttatgtagattccattcaaaaagggtatacaaaagccaaaatctggtacacaaggaaattatgacgatgattggaaagggttttatagta  
ccgacaataaatacagcgtcgggatactctgtagataatgaaaaccgctctctggaaaagctggaggcgtggtcaaaagtacgta  
tccaggactgacgaaggttctgcactaaaagtggataatgccgaaactattaagaaagagttagggttaagtcactgaaccgttgat  
ggagcaagtcggaacggaagagtttatcaaaagggttcggtgatggtgcttcggtgtagtgctcagccttcccttcgctgaggggagtt  
ctagcgttgaatatattaataactgggaacaggcgaaagcgttaagcgtagaacttgagattaattttgaaaccctggaaaacgtggcc  
aagatgcgatgtatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgtcaggcgatctttgtgaaggaaaccttacttctgtggtgtgaca  
taattggacaaaactacctacagagatttggggatccctcgagacgtagggtaccgacaa (SEC ID N°: 11).

### 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:

ggccatgcaggtaggatttgagctgtgtttcccgccctgacacctctctcctctggcggccggagcctccgtaggctccaagc  
ctggcccagattcggcgcgccagccggccttccgcgcgtccgcacctagcgggggctccggggctccggcgcgccaccggggg  
gcgctcgggatctggctgaggctccaaggcccgcgtggccggctcctcctgctggggcaggtggcggctgcgcgccccgcccag  
cccagggggcccccagccgcaacaaccagcaaggacccccgactagccccaagccacctgcactcagacggggcg  
caccgcagtgagcctcctgggtggggcgctgggagcccgctgccccctgcccggagacccagctcacgagcacaggcc  
gcccgggcaccccagaaacccgggatggggccctgaattctctaggacgggcattcagcatggccttggcgctctcggtcctctg  
ccccccaccagcctcgcggcgcccccagccctgcgaccgccgccccccccccggggggccagggccccagcccg  
cacccccgcggcgctcttggctcgggttcggggggcgggccggggggcggggagggctccgcggggcgccattggcgcggg  
cgcgaggccagcggccccgcgcggccctggggccgcggctggcgcgactataagagccggggcgtggggcgcccgagttcgctg  
ctctccggcgagctgcgtgaggccggccggccccggcccccccttccggcgccccgcctcctggcccacgcctgcccgcg  
ctctgcccaccagcgctccatcgggcaaggcgggccccgcgtcgac (SEC ID N°: 17).

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

gcggccgcaataaaatatctttatcttcattacatctgtgtgtgtgtgtgtgaatcgatagtactaacatacgctctccatcaa  
aacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaaataggctgtccccagtgcaagtgccagggtgccagaacatttctctatcgataacttcccgg  
tcggtctgtgggtgcagggggtgccgcctcacatgtgtgattcgtgccctgcggggccctggcctccgggggtgtctgggtaacgaggag

[illegible]

[illegible]

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

tctatcgaataggtaccgacaacccctaccaagggtggtagccggccatgcaggtaggatttgagctgtgtttccc  
 cccatgacccctctctctctggcgccggagccctccgtaggctccaagcctggcccagattcgccggcgagccggccttccgcgcgt  
 ccgcacctagcgggggctccggggctccggcgcgccaccggggggcgctcgggatctggctgaggctccaaggcccgcgtggc  
 cggtcctcctgctggggcagggtggcggtgcgcgccccgcccagcccagggggccccctcagccgcaacaaccagcaaggacc  
 ccccgactcagccccagccacctgcactcagacggggcgcccccagctgcagccctcctgggtggggcgctgggagccc  
 gcctgccccctgcctgcccggagaccccagctcacgagcacaggccgcccgggcaccccagaaacccgggatggggccccctgaat  
 tctctaggacgggcattcagcatggccttggcgctctgcggctccttgcctcccccaccagcctcgcctcccgcaacccccagcccc  
 tgcgaccgcccgcctcccccggggggccccagggccccagcccgacccccgcctccttggctcgggttgcggggcgggg  
 ccggggggcgggcgagggctccgcggcgcccattggcgcgggcgcgaggccagcgccccgcgcggccctggggcgcggc  
 tggcgcgactataagagccggcggtggggcgcccgcagttcgctcctcggcgagctgcgtgaggccccggcgccccggc  
 ccccccttccggcgccccgcctcctggcccacgcctgcgcgctctgccaccagcgccctccatcgggcaaggcgggccccg  
 caagcttggcattccggtaactgttgtaaagccaccatggatcctgatgatgttggattcttctaaatctttgtgatggaaaactttctt  
 gtaccacgggactaaacctgggtatgtagattccattcaaaaagggtatacaaaaagccaaaatctggtacacaaggaaattatgacgatga  
 ttggaaagggttttataglacgacaataaacacgacgctgcgggatactctgtagataatgaaaacccgctccttggaaaagctggag  
 gcgttggtcaaagtgcgtatccaggactgacgaagggttctgcactaaaagtggataatgccgaaactattaagaaagagttaggttta  
 agtctcactgaaccgttgatggagcaagtcggaacggaagagttatcaaaaagggttcgggtgatggtgcttcgctgtagtgcagcctt  
 ccttcgctgaggggagttctagcgttgaatatattaactgggaacaggcgaaagcgtaagcgtagaacttgagattaattttgaaa  
 cccgtggaaaacgtggccaagatgcgatgtatgagtataatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgtcaggcgatcttgtgaaggaa  
 cttaactctgtggtgtgacataattggacaaactacctaagagatttggggatcctctagagtcggggcgggcgccgcttcgagcag  
 acatgataagatacattgatgagtttgacaaaaccacactagaatgcagtgaaaaaatgccttatttgtgaaatttgtgatgtattgctt  
 atttgaaccattataagctgcaataaacaaggttaacaacaacaatgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttt  
 taagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaaatcgataaggatccgctgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctcctt  
 ccggtggggcgggggcatgactatcgctcgccgacttatgactgtctctttatcatgcaactcgtaggacagggtgccggcagcgcctt  
 ccgcttctcgtcactgactcgtcgctcggtcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggttaaacggttatcc  
 acagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtg  
 gcgtttttcataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatgcagctcaagtcagagtgggcgaaacccgacaggactataaa  
 galaccaggcggttccccctggaagctccctcgtcgctcctgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcg  
 ggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacc  
 cccgttcagcccagccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc  
 cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcggtctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaga  
 acagtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggt  
 agcgggtggtttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcccttgatctttctacggggtctgacgc

tcagtggaacgaaaactcacgftaagggtatgttgatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatcccttttaaaftaaaaatgaagttt  
 aaatcaatctaaagtatatatgagtaacttggctgacagttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcagga  
 ttatcaataccataatgttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcaggtccataggaatggcaagatcctgggtatc  
 ggtctgcatcgcactcgtccaacatcaatacaacctattatccctcgtcaaaaaataagggttatcaagtgaagaaatcaccatgagtg  
 acgactgaatccgggtgagaatggcaaaagtattatgcatttcttccagacttgttaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcact  
 cgcataaccaaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaattacaacaggaa  
 tcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgttttc  
 ccggggatcgagtggtgagtaacatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatgggtggaagaggcataaattccgtcagcc  
 agtttagtctgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaacaactctggcgcatcgggcttccataca  
 atcgatagattgtgcacctgattgcccacattatcgcgagccatttataccatataaatcagcatccatgttggaaattaatcgcggc  
 cttagagcaagacgtttccgttgaatatggctcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggata  
 catatttgaatgtatttagaaaaataaacaatatgggggtccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgcgccctglagcggcg  
 attagcgcggcggtgtgtgtgttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgcttcttcccttc  
 ctttctcgccacgttcgccggcttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgccttacggcacctcgacc  
 ccaaaaaacttgattaggggtgatgttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttccgcccttgacgttgagtcacgttctt  
 aatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcgggtctattcttttgattataagggttttgcgatttcggcctattg  
 gttaaaaaatgagctgatttaaaaaaattaacgcgaatttaacaaaatattaacgcttacaatttgccattcgccattcaggctgcgcaa  
 ctgttgggaagggcgatcgggtgcgggcctcttcgctattacgccagcccaagctaccatgataagtaagtaataattaaggtacgggagg  
 tacttgagcggccgcaataaaatatctttatttattacatctgtgtgtgtgtttgtgtgaatcgatagtactaacatagctctccatca  
 aaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtgaggtgccagaacatttctctatcgataggtaccg  
 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 N°: 9).

5 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:

gggtcggggcctcttcgctattacgccagcccaagctaccatgataagtaagtaataattaagggtacgggaggtacttgagcggccgca  
 ataaaaatctttattttcattacatctgtgtgtgtgtttttgtgtgaatcgatagtactaacatacgtctccatcaaaaacaaaacgaaacaa  
 acaaaactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtgacgggtgccagaacatttctctatcgataacttccgggtcgggtctgtgggtgcag  
 ggggtgccgcctcacatgtgtgattcgtgccttgcggggcctggcctccgggggtgctgggtaacgaggagggggcgaggagccgca  
 gaagcccaccctgggtatgttgacgcgggtgccagcgagaccgcgagaggaagacgggggtggggcggggccaggatggagagggg  
 ccgagttggcaggagtcattggcagacgccacattcgcgacatctccccacacccctctggctctgtccgcaacatttccaaacagg  
 agtccccgggagaggggggagaggggctgctgggtctgaggctaagaagggcagagccttcgacccggagagagggccgcccct





cccccttcggcgccccgcctcctggcccacgcctgcccgcgtctgccaccagcgctccatcgggcaaggcgccccgcgt  
cgacaagcttggcattccggtactgttgtaaagccaccatggaagacgcaaaaacataaagaaaggcccgcgccattctatccgc  
tggaagatggaaccgctggagagcaactgcataaggctatgaagagatacgccctggttcctggaacaattgctttacagatgcacat  
atcgaggtggacatcacttacgctgagtlactcgaatgtccgttcggttggcagaagctatgaaacgatatgggctgaalacaaatcac  
agaatcgtcgtatgcagtgaaaactctcttcaattctttatgccggtgttgggcgcgttattatcgaggtgcagttgcgccgcgaacga  
catttataatgaacgtgaattgctcaacagtatgggcatttcgcagcctaccgtggtgttcgtttccaaaagggggtgcaaaaaatttga  
acgtgcaaaaaagctcccaatcatcaaaaaattattatcatggattctaaaacggattaccagggatttcagtcgatgtacacgttcgtc  
acatctcatctacctcccggttttaataacgattttgtccagagtccttcgatagggacaagacaattgcactgatcatgaactcctct  
ggatclactggctcgcctaaagggtcgtctgcctcatagaactgcctgcgtgagattctcgatgccagagatcctatttttgcaatca  
aatcattccggatactgcgatttaagtgttgtccattccatcacggtttggaatgttactacactcggatattgatattgtggatttcgagt  
cgtcttaattgatagatttgaagaagagctgtttctgaggagccttcaggattacaagattcaaaagtgcgtcgtggtgccaaccctattct  
ccttcttcgcaaaaagcactctgattgacaaatcagttatcttaatttacacgaaattgcttcgtggtggcgctccccctcttaaggaagtcg  
gggaagcgggtgccaagaggttccatctgccaggatcaggcaaggatattgggtcactgagactacatcagclattctgattacccc  
gaggggggatgataaacggcgcggtcggtaaagtgttccatttttgaagcgaaggtgtggatctggataccgggaaaacgctgg  
gcgttaatacaagaggcggaactgtgtgtgagaggtcctatgattatgtccggttatgtaacaatccggaagcgaccaacgccttgattg  
acaaggatggatggctacattctggagacatagcttactgggacgaagacgaacacttctcatcggtgaccgcctgaagtctctgatta  
agtacaaaaggctatcaggtggctcccgtgaattggaatccatcttgcctcaacaccccaacatcttcgacgcaggtgtcgcaggtcttc  
ccgacgatgacgccggtgaactccccgcgcggtgtgttttggagcacggaaagacgatgacggaaaagagatcggtggattacgt  
cgccagtcagtaacaaccgcgaaaaagtgcgcggaggagttgttttggacgaagtaccgaaaggcttaccggaaaaactcga  
cgcaagaaaaatcagagagatcctcataaaggccaagaaggcggaagatcgccgtgtaattctagagtcggggcgccggccg  
cttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgaatttga  
tgcattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgt  
gggaggtttttaaagcaagtaaacctctacaaaagtggtaaaatcgataaggatccgtcgaccgatcccttgagagccttcaaccca  
gtcagctccttcgggtgggcgcggggcatgactatcgtcgcgcacttatgactgtcttcttatcatgcaactcgtaggacaggtgccg  
gcagcgtctctccgttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggttaa  
tacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggc  
cgcggtgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgaca  
ggactataaagataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttcggaccttccgcttaccggatacctgtccgc  
tttctcccttcgggaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcaagctgggctgtgt  
gcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgactatcgcac  
tggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgtacagagttctgaagtgggtgcctaactacggcta  
cactagaagaacagtatgttggatctgcgtctcgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaac  
caccgctggttagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgg



ggctcgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggctcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccitttaattaa  
aatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaattta  
ttcatatcaggattatcaataccataattttgaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaag  
atcctggatcgggtctgcatctcgactcgtccaacatcaatacaacctatttaatttccccctcgtcaaaaaataagggtatcaagtgagaaatc  
accatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagttaatgcatttcttccagacttgttaacaggccagccattacgctcgtca  
tcaaaatcactcgcacatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatcgcgatcgtgttaaaaggacaatta  
caaacaggaatcgaatgaaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttctaataacctgg  
aatgctgttttccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtagcgataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaa  
ttccgtcagccagtttagtctgacatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttgccatgttcagaacaactctggcgcatcgg  
gcttccatacaatc gatagattgtgcacctgattgcccacattatcgcgagccattatacccatataaatcagcatccatgttggaa  
ttaatcgggcctagagcaagacgtttccggtgaatatggctcatacttcttctttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctc  
atgagcgggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaatagggggtccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgcgccc  
ttagcggcgcatgaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgtcctttcg  
ctttcttcccttcttctcgcacgttcgcgggttcccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtctttacg  
gcacctcgacccccaaaaacttgattaggggtgatggttacgtagtggccatcgccctgatagacgggttttcgccccttgacgttggg  
gtccacgttctttaatagtggactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctttgattataagggttttgcgat  
ttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaatttaacaaaaatattaacgcttacaatttgccattcgccattca  
ggctgcgcaactgttgggaaggcgatc (SEC ID N°: 22).

#### Creación de H19-DTA-P3-DTA

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:

ccctcaccaaggccaagggtggtgaccgacggaccacagcggggtggctgggggagtcgaaactcgccagtctccac  
tccactcccaaccgtggtgccccacgcgggcctgggagagtctgtgaggccgccaccgcttgctagtagagtgcggcgagacc  
gtaagcacagcccggcaacatgcgggtcttcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccggggtgccagcgggtgtggggactct  
gtcctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagctcgggtcaactggatgggaatcggcctgggggggctggcaccgcgccaccagg  
gggtttgcggcacttccctctgcccctcagcaccacccctactctccaggaacgtgagttctgagccgtgatgggtggcaggaagg  
gccctctgtgcatccgagtcgccagggacccgcagctggccccagccatgtgcaaagtatgtgcagggcgctggcaggcaggg  
agcagcaggcatggtgtccctgaggggagacagtggtctgggagggagaagtcttgaccctgaggaggtgatggggcaatgc  
tcagccctgtctccgatgccaaaggagggggtgcggggaggccgtctttggagaattccaggatgggtgctgggtgagagagacgt  
gtgtggaactgtccaggcgagggtgggcccctgcgggggcccctgggagggccctgctctgattggcggcgagggcagggcg

ggaatcctggcgggggccaccccagttagaaaaagccgggctaggaccgaggagcagggtgagggagaagcttggcattccgg  
 tactgttgtaagccaccatggatcctgatgatgttgttattcttctaaatcttttggatggaaaacttttcttctgaccacgggactaaac  
 ctgggtatgtagattccattcaaaaaggtatacaaaaagccaaaatctggtacacaaggaaattatgacgatgattggaaaggggtttatagt  
 accgacaataaatacgcgctgcgggatactctgtagataatgaaaaccgctctctggaaaagctggaggcgtggtcaaagtgcgt  
 atccaggactgacgaagggttctgcactaaaagtggataatgccgaaactattaagaaagagttagggttaagctcactgaaccgttgat  
 ggagcaagtcggaacggaagagtttatcaaaaaggttcgggtgatgggtcttcgcgtgtagtgcacgcttcccttcgctgaggggaggt  
 ctacggttgaatatattaataactgggaacaggcgaaagcgtaagcgtagaacttgagaltaattttgaaaccggtggaaaacgtggcc  
 aagatgcgatgtatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaaatcgtgcaggcgatcttgtgaaggaaccttacttctgtggtgtgaca  
 taattggacaaactacctacagagatttggggatcccttagagtcggggcgccggccgcttcgagcagacatgataagatacattgat  
 gagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttggaaatttggatgctattgctttatttgaaccattataagctg  
 caataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgttccagggttcagggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctcta  
 caaatgtggtaaaatcgataaggatccgctgcaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctccttcgggtgggcgcggggcat  
 gactatcgtcgcgcacttatgactgtcttcttcatgcaactcgtaggacaggtgcggcgagcgcttctcgttccctcgtcactgac  
 tcgctgcgctcggctgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggggataacg  
 caggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcggttttccataggctccgc  
 ccccttgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactataaagataaccaggcggttccccct  
 ggaagctccctcgtgcgctcctctgttccgacctgccgctaccggataacctgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgcttctc  
 atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggtcagccgaccgct  
 gcgccttatccggttaactatcgtcttgagccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagc  
 agagcgaggtatgtaggcggtgclacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagttatttggatctgcgct  
 ctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagcttgcgtccggcaaaacaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgca  
 agcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttgcattttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactca  
 cgtaagggttttggatcatgagattatcaaaaaggatcttcacttagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatat  
 gagtaaaacttggctgacagtttagaaaaactcagcagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaa  
 aaagccgttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcaggtccataggatggcaagatcctggatcggcttcgattccgactcgt  
 ccaacatcaatacaacctattaatttccccctcgtcaaaaataagggttatcaagtggaaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgaga  
 atggcaaaagtttatgatttcttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcacatcaaccaaacggttat  
 tcatcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatcgcgatcgtgtttaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgag  
 gaacacigccagcgcatcaacaatatttccactgaatcaggatattcttataacctggaatgctgttttccggggatcgagtggtga  
 gtaacctgcatcatcaggagtagcgataaaatgcttgatggctgggaagaggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatc  
 tgaacatcattggcaacgctacctttgccatgttccagaaacaactctggcgcatcgggcttccatacaatcgatagattgtcgacctg  
 attgcccgcattatcgcgagcccatttataccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcgccctagagcaagacgttccggt  
 tgaatatggctcactcttcttcttcaatatattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaa

ataaacaataggggtccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgcgcctgtagcggcgccattaagcgcggcggtgtgg  
 tggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcggcgctccttctcgtttcttcccttcttctcgcacgttcgcccgg  
 cttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgacccccaaaaacttgattagggtg  
 atggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggttttccgctttgacgttggagtcacgttcttaalagtggactctgttccaaa  
 ctggaacaacactcaacctatctcgggtctattctttgattataagggtatttgcgatttcggcctaltggttaaaaaatgagctgattaa  
 caaaaatttaacgcgaattttaacaaaalattaacgcttacaatttgccttcgcccattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcggt  
 gcggggcctctcgtattacgcccagcccaagctaccatgataagtaagtaataattaagggtacgggaggtacttggagcggccgcaataa  
 aatctcttattttcattacatctgtgtgttgggtttttgtgtgaatcgtatgactaacaacgctctccatcaaaaacaaacgaaacaaaaca  
 aactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtgagggtgccagaacatttctctatcgatactcaggggccatgcaggtaggtattgag  
 ctgtgtttcccgcccgtatctctctctctggcgggcgaggcctccgtaggctccaagcctggcccagattcggcgggcgagccggc  
 ctccgcgcgtccgcacctagcgggggctccggggctccggcgccgaccggggggcgctcgggatctggctgaggctccaagg  
 cccgcgtggccgggtcctctgtgtgggcagggtggcggtctgcgcgccccgcccagcccaggggccccctcagccgcaacaacc  
 agcaaggacccccgactcagcccaagccacctgcactcgcactcagacggggcgccccgcagtcagcctcctggtggggcg  
 ctgggagcccgctgcccctgcttgcggggagacccagctcacgagcacaggccgcccgggcacccccagaaacccgggatgg  
 ggccccgaattctctaggacgggcattcagcatggccttggcgctctgcggctccctgccccccaccagcctcgtcccccgcgac  
 cccccagcccctgcgaccgcccggccccccccccggggccccaggggccccagcccgcacccccgccccgctcttggctcgggtt  
 gcggggggcgggccggggcgggggcgagggtccgcggggcgccattggcgcgggcgcgaggccagcgccccgcgcggcc  
 ctggggcgcggtggcgcgactataagagccgggctggcgccccgagttcgctctccggcgaggctgcgtgaggcccg  
 ccggccccggcccccccccttcggcgcccccgctccttggcccacgctgcccgcgtcttcccaccagcgctccatcgggca  
 agggcgcccccgctcgacaagcttagctacgctagcggcattccggtactgttggtaaagccaccatggatcctgatgatgttggatt  
 ctctaaatctttgtgatggaaaactttctctgctaccacgggactaaacctggttatgtagattccattcaaaaagggtatacaaaagccaaa  
 atctggtacacaaggaaattatgacgatattggaaagggttttatagtaccgacaataaatacagcgtgcgggatactctgtagataat  
 gaaaaccgctctctggaaaagctggaggcggtggtaaaagtacgtatccaggactgacgaagggtctcgcactaaaagtggataatg  
 ccgaaactattaagaaagagttagggttaagtctcactgaaccgttgcaggagcaagtcggaaacggaagagttatcaaaagggtcgggtg  
 atggtgcttcgcgtgtagtgtcagccttcccttgcgtgaggggagttctagcgttgaatatattaataactgggaacaggcgaaagcgtt  
 aagcgtagaacttgagattaattttgaaacccgtggaaaacgtggccaagatgcgatgtatgagtatatggctcaagcctgtgcaggaa  
 atcgtgtcaggcgatctttgtgaaggaaaccttacttctgtgtgtgacataattggacaaaactacctacagagatttggggatccctcgag  
 acgtagggtaccgacaa (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:

gacaaccctcaccaagggtggtagccgacggaccacagcgggggtggctgggggagtcgaaactcgccagtctccactc  
 cactcccaaccgtggtgccccacgcgggcctgggagagctctgtgaggccgcccaccgcttgcagtagagtgccccgcgagccgt  
 aagcacagcccggcaacatgcggctctcagacaggaaagtggccgcgaatgggaccgggggtgccagcggctgtggggactctgt

cctgcggaaaccgcggtgacgagcacaagctcggtaactggatgggaatcgccctggggggctggcaccgcgccaccagggg  
 gtttgcggcacttccctctgccccctcagcaccaccctactctccaggaacgtgagttctgagccgtgatggtgaggaaggggc  
 cctctgtgccatccgagtcgccagggaccgcagctggccccagccatgtgcaaatgtgagggcgctggcagggcagggag  
 cagcaggcatgggtgccccctgagggggagacagtggctgggagggagaaagtcctggccctgagggagggtgatggggcaatgctca  
 gccctgtctccggatgccaaaggaggggtgcggggaggccgtctttggagaattccaggatgggtgctgggtgagagagacgtgtg  
 ctggaactgtccagggcgagggtggccctgcggggggccctcgggagggccctgctctgattggccggcagggcagggcgggga  
 attctgggcggggccacccaggttagaaaaagccgggctaggaccgaggagcaggggtgagggaaagcttggcattccggtactgtt  
 ggtaaagccaccatggaagacgcaaaaaacataaagaaaggcccgccattctatccgtggaagatggaaccgctggagagc  
 aactgcataaggctatgaagagatacgccttgggtcctggaacaattgctttacagatgcacatacagaggtggacatcacttacgctga  
 gtacttcgaaatgtccgttgggtggcagaagctatgaaacgatatgggctgaatacaaatcacagaatcgctgtatgcagtgaaaactc  
 tcttcaattcttatgccggtgttgggcgcgttattatcgaggtgcagttgcgcccgcaacgacatttataatgaacgtgaattgctcaa  
 cagtatgggcatttcgcagcctaccgtgggtgttcttccaaaaagggttgcaaaaaatttgaacgtgcaaaaaagctcccaatc  
 caaaaaattattatcatggattctaaaacggattaccagggatttcagtcgatgtacacgttcgtcacatctcatctacctcccggtttaatg  
 aatacgaatttgtgccagagtccttcgatagggacaagacaattgcactgatcatgaactcctctggatctactggtctgcctaaagggtgc  
 gctctgcctcatagaactgcctgcgtgagattctcgatgccagagatcctattttggcaatcaaatcaticcggatactgcgattttaagt  
 gttgttccattccatcacgggttttggaaatgttactacactcggatatttgatatgtggatttcgagtcgtcttaattgtatagattgaagaagag  
 ctgtttctgaggagccttcaggattacaagattcaaatgcgctgctgggtgccaaccctattctccttcttcccaaaagcactctgattga  
 caaatacgaattatctaatttacacgaaattgcttctgggtggcgtccccctcttaaggaaagtcggggaagcgggtgccaagagggtccat  
 ctgccagggtatcaggcaaggatagggtcactgagactacatcagctattctgattacaccggaggggggatgataaacggggcgcg  
 tcggtaaagtgttccatttttgaagcgaagggtgtggtatcggataccgggaaaacgctggcggttaatacaagaggcgaactgtgtg  
 gagaggctctatgattatgtccggttatgtaacaatccggaagcgaccaacgccttgattgacaaggatggatggctacattctggaga  
 catagcttactgggacgaagacgaacacttctcagcttgaccgcctgaagctctgattaaagtaaaagctatcaggtggctcccgt  
 gaattggaatccatcttgcctcaacaccccaacatcttcgacgcagggtgtcgcaggtcttcccgacgatgacgcccgtgaaactccgc  
 cgccgttgtgtttggagcacggaaagacgatgacggaaaaagagatcgtggattacgtcgcagtcagtaacaaccgcgaaaaa  
 gttgcgaggagggtgtgttggacgaagtaccgaaagggtcttaccggaaaactcgacgcaagaaaaatcagagagatcctcata  
 aaggccaagaaggcggaagatcgccgtgtaattctagagtcggggcgccggccgcttcgagcagacatgataagatacattgat  
 gagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttatttggaaattgtgatgctattgcttatttgaaccattataagctg  
 caataaacaaggttaacaacaacaattgcattcattttatgttcagggtcagggggagggtgtggagggtttttaaagcaagtaaacctcta  
 caaatgtggttaaatcgataaggatccgtcgaccgatgcccttgagagccttcaaccagtcagctcctccggtgggcgcggggcat  
 gactatcgtcgcgcactttagactgtcttcttcatcgaactcgtaggacagggtgcggcgagcgtcttccgcttccctcgtcactgac  
 tcgctgcgctcggtgttgcggtgcggcgagcgggtatcagctcactcaaggcggttaatacgggttatccacagaatcaggggataacg  
 caggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcggttttccatagggtccgc  
 cccctgacgagcatcacaataatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaaccggacaggactataaagataaccaggcggtttccct

ggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacccctgccgttaccggatacctgtccgccttctcccttcgggaagcgttggcgctttc  
atagctcacgctgtaggtatcagttcgggtgtaggtcgttccaaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagccgaccgct  
gcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc  
agagcgaggatgttagggcggtgtacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgt  
ctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtgggtttttgttgc  
agcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcicaagaagatccttgalcttttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactca  
cgttaagggattttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaatgaagtttaaatcaatcaaaagtatat  
gagtaaaccttggctgacagttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaattattcatatcaggattatcaataccatattttgaa  
aaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcaggttccataggatggcaagatcctgggtatcggtctgcgattccgactcgt  
ccaacatcaatacaacctatfaatttccccctcgtcaaaaaataagggtatcaagtgaagaaatcaccatgagtgcgactgaatccgggtgaga  
atggcaaaagtttatgcatttcttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaccggtat  
tcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgtgtttaaaggacaattacaacaggaaatcgaatgcaaccggcgag  
gaacactgccagcgcatcaacaatatttcacctgaatcaggatattcttcaataacctggaatgctgtttccgggggatcgagtggtga  
glaaccatgcacatcaggagtagcgataaaatgcttgatggtcgggaagggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatc  
tgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaacaactctggcgcatcgggcttccatacaatcgaatgattgtcgacctg  
attgcccgacattatcgcgagccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaaattaatcgcgccctagagcaagacgtttccgt  
tgaalatggctacacttctccttttcaataatttgaagcatttacaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaa  
ataaacaataaggggtccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgcgcctttagcggcgcaatgaagcgcggcggtgtgg  
tgggtacgcgcagcgtgaccgctacacttccagcgcccttagcgccgctccttctcgttcttcccttcttctcgtccacgttcgccgg  
cttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttttaggggtccgatttagtgccttacggcacctcgcaccccaaaaaacttgattagggtg  
atgggtcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggttttcgcccttgacgttgagtcacgttctttaatagtggaactctgttccaaa  
ctggaacaacactcaaccctatctcgggtctattcttttgattataagggaattttgcgatttcggcctatttggttaaaaaatgagctgatttaa  
caaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaatttgccattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcgg  
gcgggcctcttgcctattacgccagcccaagctaccatgataagtaagtaataaaggtagcgggaggtacttgagcggcgccgcaataa  
aatactcttatttcaattacatctgtgtgttgggtttttgtgtgaatcgaatgactaatacagctcttccatcaaaaacaaacgaaacaaaaca  
aactagcaaaaataggctgtccccagtgcaagtgcaggtgccagaacatttctctatcgatactcgagggccatgcaggtaggatttgag  
ctgtgttcccgccctgatccctctctcttggcgggcgagcctccgtaggctccaagcctggcccagattcggcggcgcagccggc  
ctccgcgcgtccgcacctagcgggggctccggggctccggcgcgggcacccggggggcgctcgggatctggctgaggtccaaagg  
cccgctggccggctcctcctgtgtggggcaggtggcggtgcgcgccccgcccagcccagggggccccctcagccgcaacaacc  
agcaaggacccccgactcagcccaagccacctgcactgcactcagacggggcgaccccgagtgacgcctcctggtggggcg  
ctgggagcccgcctgcccctgcctgcccggagacccagctcacgagcacaggccgcccgggcaccccagaaaccgggatgg  
ggccccgaattctctaggacgggcattcagcatggccttggcgctctgcggctccttgcacccacccagcctcgcaccccgccac  
ccccagcccctgcgacggccgccccccccccggggggccagggccccagcccgacccccgccccgctcttggctcgggtt

gcggggcgggccggggcgggggcgagggctccgcgggcgccattggcgcgggcgcgaggccagcgggccccgcgcgggcc  
ctggggcgcgggctggcgcgactataagagccggggcggtggggcgcccgagttcgctgctctccggcgaggctgctgaggccccgg  
ccggccccggccccccctccggcgccccgcctcctggcccacgcctgcccgcgctctgccaccagcgctccatcgggca  
aggcgggccccgcgicgacaagcttagctacgctagcggcattccgggtactgttgtaaagccaccatggaagacgcaaaaacataa  
agaaaggccccggcgccattctatccgctggaagatggaaccgctggagagcaactgcataaggctatgaagagatacgccctggttc  
ctggaacaattgctttacagatgcacatacgaggtggacatcacttacgctgagtacttcgaaatgtccgttcggttggcagaagctat  
gaaacgatatgggctgaatacaaatcacagaatcgtcgtatgcagtgaaaactctcttcaattctttatgccggtgttggcgcggttttat  
cggagttgcagttgcgcccgcgaacgacatttataatgaacgtgaattgtcaacagtatgggcatttcgcagcctaccgtggtgttcgtt  
tccaaaagggggtgcaaaaaatttgaacgtgcaaaaaagctcccaatcatcaaaaaattattatcatggattctaaaacggattacc  
agggtttcagtcgattgacacgttcgtcacatctcatctacctccgggttttaataacgattttgtccagagtccttcgatagggaca  
agacaattgcactgaiccatgaactcctctggatctactggctcgtcctaaagggtgcgctcgcctcatagaactgcctgcgtgagattctcg  
catgccagagatcctatttttgcaatcaaatcattccggatactgcgatttaagtgttgcctccatcacgggttttggaattgttactaca  
ctcggatatttgatatgtggatttcgagtcgtcttaattgtatagattgaagaagagctgtttctgaggagccttcaggattacaagattcaaa  
gtgcgctgctgggtgccaacctattctccttcttcgcaaaaagcactctgattgacaaatagatttatctaaattacgaaattgcttctgg  
tggcgctccctctctaagggaagtcgggggaagcggttgccaagagggttccatctgccaggtatcaggcaaggatatgggctcactgag  
actacatcagctattctgattacaccgaggggggatgataaacggggcgcggtcggtaaagttgtccatttttgaaagcgaagggtgtgg  
atctggataccgggaaaacgctggggcgtaatacaagaggcggaactgtgtgtgagaggtcctatgattatgtccgggttatgtaacaatc  
cggaaagcgaccaacgccttgattgacaaggatggatgggtacattctggagacatagcttactgggacgaagacgaacacttctcatc  
gttgaccgcctgaagtctctgattaagtacaaaggctatcagggtggctcccgcgtgaattggaatccatcttgcctcaacaccccaacatct  
tcgacgcagggtgcgagggtctcccgacgatgacgcccgtgaacttcccgcggcgttgtgttttgagacacggaaagacgatgac  
ggaaaaagagatcggtgattacgtcgccagtcagtaacaaccgcaaaaagttgcgcgaggaggtgtgtttgtggacgaagtacc  
gaaagggtcttaccggaaaactcgacgcaagaaaaatcagagagatcctcataaaggccaagaaggcggaagatcgccgtgtaatt  
ctcgagacgtagggtacc (SEC ID N°: 20).

**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**

- 5 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 40A-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 epitelioides). 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-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.

#### **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. 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.

#### **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).

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.

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

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

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 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*****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 atímicos 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.

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).

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.

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 cotransfectado 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*.

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.

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 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).

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 cotransfectado 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*.

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

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.

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).

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.

#### Listado de secuencias

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

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

<130> BCL 008 PCT

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 830

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctgcagggcc ccaacaaccc tcaccaaagg ccaaggtggt gaccgacgga cccacagcgg	60
ggttggtggg ggagtcgaaa ctgccagtc tccactccac tcccaaccgt ggtgccccac	120
gcgggcctgg gagagtctgt gagggccccc accgcttgtc agtagagtgc gcccgcgagc	180
cgtaagcaca gcccggcaac atgcggtcct cagacaggaa agtggccgcg aatgggaccg	240
gggtgcccag cggctgtggg gactctgtcc tgcggaaacc gcggtgacga gcacaagctc	300
ggtcaactgg atgggaatcg gcctgggggg ctggcaccgc gccaccagg gggtttgagg	360
cacttccttc tgcccctcag cccccaccc ctactctcca ggaacgtgag gtctgagccg	420
tgatggtggc aggaaggggc cctctgtgcc atccgagtc ccagggaccc gcagctggcc	480
cccagccatg tgcaaagtat gtgcagggcg ctggcaggca gggagcagca ggcattggtg	540
cccctgaggg gagacagtgg tctgggaggg agaggctctg gaccctgagg gaggtgatgg	600
ggcaatgctc agccctgtct ccgcatgcca aaggaggggt gcggggaggc cgtctttgga	660
gaattccagg atgggtgctg ggtgagagag acgtgtgctg gaactgtcca gggcggaggt	720
gggccctgcg ggggccctcg ggagggccct gctctgattg gccggcaggg caggggcggg	780
aattctggcg ggccacccca gttagaaaaa gcccgggcta ggaccgagga	830

<210> 2  
 <211> 833  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

gacaaccctc accaagggcc aaggtggtga ccgacggacc cacagcgggg tggctggggg	60
agtcgaaact cgccagtctc cactccactc ccaaccgtgg tgccccacgc gggcctggga	120
gagtcctgtga ggccgcccac cgcttgctag tagagtgcgc ccgcgagccg taagcacagc	180
ccggcaacat gcggtcttca gacaggaaag tggccgcgaa tgggaccggg gtgccagcgc	240
gctgtgggga ctctgtctcg cggaaccgc ggtgacgagc acaagctcgg tcaactggat	300
gggaatcggc ctgggggggt ggcaccgcgc ccaccagggg gtttgaggca ctccctctg	360
cccctcagca cccacccct actctccagg aacgtgagtt ctgagccgtg atggtggcag	420
gaaggggccc tctgtgccat ccgagtcccc agggacccgc agctggcccc cagccatgtg	480
caaagtatgt gcagggcgct ggcaggcagg gagcagcagg catggtgtcc cctgagggga	540
gacagtggtc tgggagggag aagtcctggc cctgagggag gtgatggggc aatgctcagc	600
cctgtctccg gatgccaaag gaggggtgcg gggaggccgt ctttgagaa ttccaggatg	660
ggtgctgggt gagagagacg tgtgctggaa ctgtccaggg cggaggtggg ccctgcgggg	720
gccctcggga gggccctgct ctgattggcc ggcagggcag gggcgggaat tctgggcggg	780
gccacccag ttagaaaaa gccgggctag gaccgaggag cagggtgagg gag	833

<210> 3  
 <211> 877

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 3

5

<b>caaggacatg gaatttcgga ccttctgtcc ccaccctctc tgctgagcct aggaacctct</b>	<b>60</b>
<b>gagcagcagg aaggccttgg gtctagagcc tagaaatgga ccccccacgtc cacctgcccc</b>	<b>120</b>
<b>gcctagacccc ccagcattga aggggtggtca gacttctgtg gagaggaagc cactaagcgg</b>	<b>180</b>
<b>gatggacacc atcgcccact ccacccggcc ctgcccagcc ctgcccagtc cagcccagtc</b>	<b>240</b>
<b>cagcccagcc ctgcccctcc cagccctgcc cagcccagct catccctgcc ctacccagcc</b>	<b>300</b>
<b>cagccctgtc ctgcccctgcc cagcccagcc cagcccagcc ctgcccctgcc ctgcccctgcc</b>	<b>360</b>
<b>cttcccagcc ctgaccttcc cagccctgcc cagcccagct catccctgcc ctacccagct</b>	<b>420</b>
<b>cagccctgcc ctgcccctgcc ctgcccctgcc cagccctacc cagcccagcc ctgcccctgcc</b>	<b>480</b>
<b>ctgcccagct cagccctgcc caccccagcc cagcccagcc cagcatgcgt tctctggatg</b>	<b>540</b>
<b>gtgagcacag gcttgacctt agaaagaggc tggcaacgag ggctgaggcc accaggccac</b>	<b>600</b>
<b>tgggtgctca cgggtcagac aagcccagag cctgctcccc tgccacgggt cggggctgtc</b>	<b>660</b>
<b>accgccagca tgctgtggat gtgcatggcc tcagggtctg tggtccagg ctgccccgc</b>	<b>720</b>
<b>cctggctccc gagggcacc ctcttatgcc atgaaccctg tgccacacc acctctgagc</b>	<b>780</b>
<b>tgtccccgct cctgcccct gcaccccctg agcagcccc tgtgtgtttc atgggagtct</b>	<b>840</b>
<b>tagcaaggaa ggaggagctcg aattcctgca gcccggg</b>	<b>877</b>

<210> 4  
<211> 1960  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

10

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

15

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

20

<400> 4

ccgggtaccg agctcccagg aagataaatg atttctctct ctctagagat gggggtggga	60
tctgagcact cagagccaag ggcgcagtgg gtccgggcgg gggccctcct cggccctccc	120
aacatggggg ccaggaggtc agccccctcaa cctggacccc ggctgggtct cagggaatgg	180
tctccccag tggcccagct tgcttggtt ttcagatggg tgtgcatggg tgtgtgtgtg	240
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgatgcct gacaagcccc agagagccaa	300
agacctgagt ggagatcttg tgactttctca aaagggggat tggaagggtc gagaaagagc	360
tgtggtcagc cttgctctcc cttaaggctg tggtaaccac actaggcata gcataggcct	420
gcgccccgtc cctccttccc tctccgcgc ctctcctttc tctttctccc ccctctaccc	480
cgctccctgg cctgctcctg gtgacaccgt tggccccctt ccagggtga gggagccag	540
cgggggcccc ttcctgaaag cccacctgca ggccggcttg ctgggaaggg gctgctctcg	600
cagaggctcc cgcccgccct gcagccgttt cctggaagca gtcgctgtgg gtattctgtt	660
ccttgctcagc actgtgcttg caaagaaagc agacactgtg ctcttgctcc ttagggagcc	720
ccgctccatc acccaacacc tggtggaca caggcgggag gccgggtccg cggggagcgg	780
cgcggggctg gggccggacc attaaacaca cacgggcgc aggcactgca ggctcctcct	840
cctcctcctg cccagcgcct ctgctcacag gcacgtgcc agcccctagg ccaggaggcc	900
agcagtgggt gcagaacaag ctctgggaa gggggtgcag ggcggacccc cggggagaag	960
ggctggcagg gctgtggggg acgtgaccg tgggccccac gttgcagaaa actgngtgc	1020
tggctggaag atgggggaga tgccaagcct ctgaggcagc acgagcaggg tgcatggagg	1080
ccggggcgcg gggaggctgc actgcagcat gcaccccaaa gcccanaggg agtgagagcc	1140
aggccctgga atcgagaagt agaaaggcgg cttggaggcc tcggaaccgg ctgacctcca	1200
acagagtggg tctccagcct ggctctgccc tgccgcaggt cccctcccct cattaccagg	1260
cctagagcct ccagtcccgg tggccccag cccgagggtg aacggcctca ccctgggtcg	1320
tgggacagag ggcacgttca tcaagagtgg ctccaaggg acacgtggct gtttgcagtt	1380
cacaggaagc attcgagata aggagcttgt tttcccagtg ggcacggagc cagcagggg	1440
gctgtggggc agcccagggt gcaaggccag gctgtggggc tgcagctgcc ttgggcccc	1500
ctcccaggcc tttgaggag gtgggaggcg ggaggcggca gctgcacagt ggccccaggc	1560
gaggctctca gccccagtcg ctctccgggt gggcagccca agagggtctg gctgagcctc	1620
ccacatcttg gactccatca cccaacaact taattaaggc tgaatttcac gtgtcctgtg	1680
acttgggtag acaaagcccc tgtccaaagg ggcagccagc ctaaggcagt ggggacggcg	1740
tgggtggcgg gcgacggggg agatggacaa caggaccgag ggtgtgcggg cgatggggga	1800
gatggacaac aggaccgagg gtgtgcgggc gatgggggag atggacaaca ggaccgaggg	1860
tgtgcgggac acgcatgtca ctcatgcacg ccaatggggg gcgtgggagg ctggggagca	1920
gacagactgg gctgggctgg gcgggaagga cgggcagatg	1960

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 4085

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

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

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

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

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

<400> 5

```

ccgggtaccg agctcccagg aagataaatg atttcctcct ctctagagat ggggggtggga      60
tctgagcact cagagccaag ggcgcagtgg gtccgggcggg gggccctcct cggccctccc      120
aacatggggg ccaggagggtc agccccctcaa cctggacccc ggctgggtct cagggaatgg      180
tctccccagc tggcccagct tgcttgtgtt ttcagatggg tgtgcatggg tgtgtgtgtg      240
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgatgcct gacaagcccc agagagccaa      300
agacctgagt ggagatcttg tgacttctca aaaggggggat tgggaagggtc gagaaagagc      360
tgtggtcagc cttgctctcc cttaaggctg tggtaaccac actaggcata gcataggcct      420
gcgccccgtc cctccttccc tcctccgcgc ctctccttct tctttctccc ccctctaccc      480
cgctccctgg cctgctcctg gtgacaccgt tggccccctt ccagggtga ggggaagccag      540
cgggggcccc ttcctgaaag cccacctgca ggccggcttg ctgggaaggg gctgctctcg      600
cagaggctcc cgcccgccct gcagccgttt cctggaagca gtcgctgtgg gtattctggt      660
ccttgtcagc actgtgcttg caaagaaagc agacactgtg ctccttgtcc ttagggagcc      720
ccgctccatc acccaacacc tggctggaca caggcgggag gccgggtccg cggggagcgg      780
cgcggggctg gggccggacc attaaacaca cacgggcgcc aggcactgca ggctcctcct      840
cctcctcctg ccagcgcct ctgctcacag gcacgtgcca agccccagg ccaggaggcc      900
agcagtgggt gcagaacaag ctcttgggaa ggggggtgcag ggcggacccc cggggagaag      960
ggctggcagg gctgtggggg acgtgaccg tgggccccac gttgcagaaa actgngtgcc     1020
tggctggaag atgggggaga tgccaagcct ctgaggcagc acgagcaggg tgcatggagg     1080
ccggggcgcg gggaggctgc actgcagcat gcaccccaaa gcccanaggg agtggagacc     1140

```

agggccctgga atcgagaagt agaaaggcgg cttggaggcc tcggaaccgg ctgacctcca	1200
acagagtggg gccggccctg gaggcaaaga ggtgcccggg gtccggccct gcctggggga	1260
gctatgtgtc atgggcaagc cacaggatat gtagcccgtc ctgagcctat ggacccaggg	1320
cagggtgca aggcaggga ggggagacag cacgggggag caaggagcag agagggggcc	1380
tcaggctctc ccaggaggaa cattctccc acaggaggaa gagacggccc aggggtgact	1440
gtggggagcc atggtggcag ctggggtcgt ggcagatggg agagaggctg gcgaggtgaa	1500
ggtgcagggg tcagggtctt ggggccaca tgcctgtggg agcaggcagg cccagggtc	1560
tccgccactc cccactccc cttggctcat aggttgggccc caagggtggg gtgggatgag	1620
caggagatgg ggcccagggg gcaagcaggg ccccaaagac atttagaaaa accggtttat	1680
gcaggcagca ttcagagcag gcggcgtgcg tggcgggggc cctgggagca cagagaggca	1740
cacgtagggc ccccgagggg ctccccattg gccggcagtg acatcacccc tgtgtcaaca	1800
gtgatgtctg cagctccggc cagccagggt ttatggagcg agaccagcc cggcctgggc	1860
cctcactccc caggcccaca cactagccca ctgttcaggg tccgggggtg cggcatggcc	1920
tgggggtcct ggcaccgctg ctctctgccc caccctaact tcccggcatc gcggctgccc	1980
cctctgagcg tccccaacca gtaagtgtgg ggcccagcag gcctgccgtc ctctctctct	2040
tcccccttag agagaaacgt ggaggctcctg gggctggggg cgctcatagc cctgtgacac	2100
aggtgcatgg ggtcaggggt cccagaatgg cccctgggaa ggacctcagc tgggccggcg	2160
gctctaggct tcaggggtct gtctgcacag gggntagccc ctcccagacc tctgtgaagc	2220
cagtacgggc ctccccctcc tggcccgtgc tctgtccggt gcttcctgga ctgactgcg	2280
ggccactggt gagaggggtg acaggggaagg gccgccgtgg tgcctgttcc tgcccacctg	2340
gctgtgtggt cccctccaag tagggacaac ccttctgagg gcttgggggc accctgggggt	2400
tgccagggcc tcccagagcc ctgtgagccc ctgggggggtc tggcctgatg cccccctcca	2460
cgtccagggc cggctgtggc ccagaacccc agcttcccag caggccggtg tgcggtggtg	2520
acccaggaga ggcctcgcct cactgaggg gccaccgacc tctgtcagac cacagagacc	2580
cccaaggagt ctgaaggctg gagaccggg gctgggacca ggtgggactt tcccacggag	2640
ccgtccccag gccagctgg ggacacgtcc cccttctctc cagacacacc ctgcctgcca	2700
ccaggacaca cgggcctgtt gggggtctct ttaagtgtg tgccactctg aggtgactgt	2760
ccctttccaa agaggtttct ggggccagg tgggatgctg cggcctgagc aggaggatct	2820
gggccgccag gggctgggga ctgtctcctg ggggaaggaa cgcctgggag cgtgtgtgct	2880
gacccaggac catccaggga ggcccgtctg tggggcaagc gggaaggag cggctggaga	2940
ggcttggccg ccccgccct gcctccatt ccttagctcc atgcctgtca acctctgtca	3000
cccagtgagt gatgtccagg ggccctggaa aggtcacagc atgtttgagc ggggtgagag	3060
agaggggaaa ggcggggggc gggaaaagta cgtggaggaa gctttaggcc caaggaagga	3120
gacagggttc tgggaggag ggagccactg gggccgccgg gaaggccct gcttgctgct	3180

gccacccaga accctcgcct cttagctagc ccccgagcc ccagcctttc tggcntgtgg 3240  
 cctctctccc catccccagg tgtcctgtgc aaccaggcct tggacccaaa cctcctgcc 3300  
 cctctctctc cctcctcacc ctcccaatgc agtggctctc agcctggctc tgccctgccg 3360  
 caggtccccct cccctcatta ccaggcctag agcctccagt cccggtggcc ccagagccga 3420  
 ggggtgaacgg cctcaccctg ggtcgtggga cagagggcac gttcatcaag agtggctccc 3480  
 aagggacacg tggctgtttg cagttcacag gaagcattcg agataaggag cttgttttcc 3540  
 cagtgggcac ggagccagca ggggggctgt ggggcagccc aggggtgcaag gccaggctgt 3600  
 ggggctgcag ctgccttggg cccactccc aggcctttgc gggaggtggg aggcgggagg 3660  
 cggcagctgc acagtggccc caggcgaggc tctcagcccc agtcgctctc cgggtgggca 3720  
 gcccaagagg gtctggctga gcctcccaca tctgggactc catcacccaa caacttaatt 3780  
 aaggctgaat ttcacgtgtc ctgtgacttg ggtagacaaa gccctgtcc aaaggggag 3840  
 ccagcctaag gcagtgggga cggcgtgggt ggcgggcgac gggggagatg gacaacagga 3900  
 ccgaggggtgt gcgggcgatg ggggagatgg acaacaggac cgaggggtgtg cgggcgatgg 3960  
 gggagatgga caacaggacc gaggggtgtg gggacacgca tgtcactcat gcacgccaat 4020  
 gggggggcgtg ggaggctggg gagcagacag actgggctgg gctgggcggg aaggacgggc 4080  
 agatg 4085

<210> 6  
 <211> 591  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 6

atggatcctg atgatgttgt tgattcttct aaatcttttg tgatggaaaa cttttcttcg 60  
 taccacggga ctaaaccctg ttatgtagat tccattcaaa aaggtatata aaagccaaaa 120  
 tctggtacac aaggaaatta tgacgatgat tggaaagggt tttatagtac cgacaataaa 180  
 tacgacgctg cgggatactc tgtagataat gaaaacccgc tctctggaaa agctggaggc 240  
 gtggtcaaag tgacgtatcc aggactgacg aaggttctcg cactaaaagt ggataatgcc 300  
 gaaactatta agaaagagtt aggtttaagt ctactgaac cgttgatgga gcaagtcgga 360  
 acggaagagt ttatcaaaag gttcggtgat ggtgcttcgc gtgtagtgct cagccttccc 420  
 ttcgctgagg ggagttctag cgttgaatat attaataact gggaacaggc gaaagcgta 480  
 agcgtagaac ttgagattaa ttttgaaacc cgtggaaaac gtggccaaga tgcgatgtat 540  
 gagtatatgg ctcaagcctg tgcaggaaat cgtgtcaggc gatctttgtg a 591

<210> 7  
 <211> 196  
 <212> PRT  
 <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

gagctcggcc atgcaggtag gatttgagct gtgtttcccg ccctgaccc tctcctctg 60  
 gcggccggag cctccgtagg ctccaagcct ggcccagatt cggcggcgca gccggccttc 120  
 cgcgcgtccg cacctagcgg gggctccggg gctccggcgc ggcaccgggg ggcgctcggg 180  
 atctggctga ggctccaagg ccgcgctggc cggctcctcc tgctggggca ggtggcggct 240  
 gcgcgccccg cccgagccca ggggccccct cagccgcaac aaccagcaag gacccccga 300  
 ctcagcccca agccacctgc atctgcactc agacggggcg caccgcaggt gcagcctcct 360  
  
 ggtggggcgc tgggagcccc cctgccccctg cctgccccga gaccccagct cacgagcaca 420  
 ggccgccccg gcaccccaga aaccgggat ggggccccctg aattctctag gacgggcatt 480  
 cagcatggcc ttggcgctct gcggctccct gccccccacc cagcctcgcc ccgcgcacc 540  
 ccccagcccc tgcgaccgcc gcccccccc ccggggcccc agggccccag cccgcacccc 600  
 ccgccccgct cttggctcgg gttgcggggg cgggccccgg gcggggcgag ggctccgcgg 660  
 gcgcccattg gcgcggggcg gaggccagcg gcccgcgcgc gccctgggccc gcggctggcg 720  
 cgactataag agccgggctt gggcgccccg agttcgctct cttccggcg gagctgcgtg 780  
 agggccggcc ggccccggcc ccccccttcc ggccgcccc gcctcctggc ccacgcctgc 840  
 ccgcgctctg cccaccagcg cctccatcgg gcaaggcggc 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

acttccccggt cggctctgtg gtgcaggggg tgccgcctca catgtgtgat tcgtgccttg 60  
 cgggcccctg cctccggggg gctgggtaac gaggaggggc gcggagccgc agaagccac 120  
 cctgggtatgt tgacgcggtg ccagcgagac cgcgagagga agacgggggt gggcggggcc 180  
 aggatggaga ggggcccaggt tggcaggagt catggcagac gccacattcg cgacatctcc 240  
 cccacacccc ctctggctct gtccgcaaca tttccaaaca ggagtccccg gagaggggga 300  
 gaggggctgc tggcttgagg ctaagaaggg cagagccttc gacccggaga gagggcgcgg 360  
 cccctgccca gtgggcagcg tggaagtttc catacaagga ggtgggaagg agaccccccc 420  
 cccccctcac tgccctgtgc agagatgagc cgggggtgca ggatgggagc ccatggcact 480  
 tcgctacggg atggtccagg gctcccgggt ggggggtgag gagagaagag actggctggg 540  
 aggagggaga gggcgggagc aaaggcgcgg gggagtggc agcagggaga ggggtggggg 600  
 gtaggggtgga gcccgggctg ggaggagtcg gctcacacat aaaagctgag gactgacca 660  
 gcctgcaaac tggacattag cttctcctgt gaaagagact tccagcttcc tcctcctcct 720  
 cttcctcctc ctctcctgc cccagcgagc cttctgctga gctgtagggg 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 gatttgaggaa atttctctct agcgttgccc aaacacactt gggtcggccg	120
cgcgccctca ggacgtggac agggagggct tccccgtgtc caggaaagcg accgggcatt	180
gccccagtc tccccaaat ttgggcattg tccccgggtc ttccaacgga ctgggcgnng	240
ctccccgaca ctgaggactg gccccggggt ctgctcacc ttcagcagcg tccaccgcct	300
gccacagagc gttcgatcgc tcgctgcctg agctcctggg gcgcccgcgg acgcagcctc	360
cagcttcgcg gtgagctccc cgccgcgcgg atccccctcg cctctgcgcc cctgaccggc	420
tctcggcccc catctgctgc tgtcccgcgg gtgctggcgc tcgtccgctg cgccggggag	480
gccggcgtgg ggcgcgggac acggctgcgg acttgcggtc gcgctgcgct cgctcctgct	540
gggcgccccg aaatccgcgc cactttcggt tgctcattgc aaagatctca tttgtgggga	600
aagcggctgg aggggtccaa agtggggcgg gcagggggct ggggcgaggg acgcggagga	660
gaggcgctcc cgccgggcgg taaagtgcct ctagcccgcg ggcctaggac tccgccggga	720
gggcgcgcgg agngcgaagt gattgatggc ggaagcgggg gggcaagggg ggcagggggg	780
cgcgggattc cgccggcgac cccttccccct tggctaggct taggcggcgg ggggctggcg	840
gggtgcggga ttttgtgctg ggtttttgac ttggtaaaaa tcacagtgtt ttcttacatc	900
gttcaaactc tccaggagat ggtttcccca gacccccaaa ttatcgtggg ggcccccgag	960
accgaactcg cgtctatgca agtccaacgc actgaggacg gggtaccat tatccagata	1020
ttttgggtgg gccgcaaagg cgagctactt agacgcaccc cggtagctc ggccatgcag	1080
gtaggatttg agctgtgttt cccgccctga tcctctctcc tctggcggcc ggagcctccg	1140
taggctccaa gcctggccca gattcggcgg cgagccggc cttccgcgcg tccgcaccta	1200
gcgggggctc cggggctccg gcgcggcacc ggggggcgct cgggatctgg ctgaggctcc	1260
aaggccccgc tggccggctc ctctgctgg ggcagggtgg ggtgcgcgc cccgccccgag	1320
cccaggggcc ccctcagccg caacaaccag caaggacccc ccgactcagc cccaagccac	1380
ctgcatctgc actcagacgg ggcgcacccg cagtgcagcc tcctgggtgg gcgctgggag	1440
ccgcctgcc cctgcctgcc cggagacccc agctcacgag cacaggccgc ccgggcaccc	1500
cagaaacccg ggatggggcc cctgaattct ctaggacggg cattcagcat ggccttggcg	1560
ctctgcggct ccctgcccc caccagcct cgccccgcg cccccccag cccctgcgac	1620

cgccgcccc cccccgggg cccagggcc ccagcccga cccccgccc cgctcttggc	1680
tcgggttgcg ggggcgggcc gggggcgggg cgagggtcc gcgggcgccc attggcgcg	1740
gcgcgaggcc agcggcccc cgcgggcctg ggccgcggct ggcgcgacta taagagccgg	1800
gcgtgggcgc ccgcagttcg cctgctctcc ggcgagctg cgtgaggccc ggccggcccc	1860
ggcccccccc ttccggccgc ccccgctcc tggccacgc ctgcccgcgc tctgcccacc	1920
agcgccctcca tcgggcaagg cggccccgcg tcgacgccc ccgctgcctc gctgctgact	1980
cccgtccccg gcgccgtccg cggggtcgcg ctccgcccgg cctgcggatt ccccgccgcc	2040
tcctcttcat ctacctcaac tccccccatc cccgcttcgc ccgaggaggc gggtcccccc	2100
gcaggcagtc cggtcgcag gccgcggcg ttgtacccc cccgcgctc cccctccagc	2160
cctccccccg gcgcgcagcc tcgggcccgt cccctttccg cgctgcgtcc cggagcggcc	2220
ccggtgccgc caccgcctgt cccctcccc agggccgggc tcgcgacggc agagggtcc	2280
gtcggcccaa accgagctgg gcgcccgcg tccgggtgca gcctccactc cgcccccag	2340
tcaccgcctc ccccggcccc tcgacgtggc gcccttccct ccgcttctct gtgctccccg	2400
cgccccctct ggcgctcggc cccggcccc gctctttctc ccgcaacctt cccttcgctc	2460
cctccccgtc cccccagctc ctacgctcc actccctccc cccctcacgc ccgccccctc	2520
gccttcgccc aaccaaagtg gattaattac acgctttctg tttctctccg tgctgttctc	2580
tcccgtgtg cgcttgccc cctctcgctg tcctctctcc cctcgccct ctcttcggcc	2640
ccccctttc acgttcactc tgtctctccc actatctctg cccccctta tccttgatac	2700
aacagctgac ctcatctccc gataccttt ccccccgaa aagtacaaca tctggcccgc	2760
cccagcccga agacagccc tcctccctgg acaatcagac gaattctccc cccccccca	2820
aaaaaaagcc atccccccgc tctgccccgt cgcacattcg gccccgcga ctcgccaga	2880
gcggcgctgg cagaggagtg tccggcagga gggccaacgc ccgctgttcg gtttgcgaca	2940
cgcagcaggg aggtgggcgg cagcgtcgcc ggcttccagg taagcggcgt gtgcgggccg	3000
ggccggggcc ggggctgggg cggcggggc ttgcggcgac gcccgggcct tcctccgcc	3060
gctccccggc cggggcctgc ggggctcggc ggggcggctg agccgggggg gaggaggagg	3120
aggaggagga ggacggacgg ctgcgggtcc cgttccctgc gcggagcccg cgctaccnnn	3180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnagctcc ccgctgaagg gggtcgggtc gtgggtgcag	3240
ggggtgccgc ctacatgtg tgattcgtgc cttgcgggcc ctggcctccg gggtgctggg	3300
taacgaggag gggcgcgag ccgcagaagc ccaccctggg gtcgttgacg ccggtgccag	3360
cgagaccgcg agaggaagac gggggcgggc ggggcccagga tggagagggg ccgagttggc	3420
aggagtcag gcagacgcca cactcgcgac catctcccc acaccctctt ggcctctgtc	3480
cgcaacattt ccaaacagga gtcccgggag agggggagag gggctgctgg tctgaggcta	3540
agaagggcag agccttcgac ccggagagag gccgcggccg cctgccccag tggcaacgtt	3600
gaagttttcc atacaacgga ggtcgggaag gagaccccc ccccccttca ctgccctgtg	3660

aagagatgag ccgggggtgc aggatgggag cccatggcac ttcgctacgg	patgtccagg	3720
gctccggttg ggggtgcagg agagaagaga ctggctggga ggagggagag	ggcgggagca	3780
aaggcgcggg ggtgtggtca gaggagagg ggtgggggtt aggtggagcc	cgggctggga	3840
ggagtcggct cacacataaa actgaggcac tgaccagcct gcaaactgga	tattagcttc	3900
tctgtgaaa gagacttcca gcttcctcct cctcctcttc ctcctcctcc	tcttgcccca	3960
gcgagccttc tgctgagctg taggtaacca gggctgtgga gtgaaggacc	cccgtgccca	4020
tcccactcca gcctgaggca gggcagcagg gggcacggcc cacgcctggg	cctcgggccc	4080
tgcagccgcc agcccgctgc ctctcgga caacccccct cccctctttt	cctctgcccc	4140
tgccccacc tggcgtctct gctccctcac ctgctccttc cctttctgtt	ccttccttc	4200
ggccccctcc ttgccagct caggactttt cctgggccct cacctgctcc	gcaccgctgc	4260
atgcttcctg tctgtcttc tgccggtccc ctgacccgga cctccaagcg	cagagtgggtg	4320
gggcttggtg cggaagcgcg gcgagggcta gagtggccag ctggcggagt	gtgctcttag	4380
aatttggaag ggggtggcag agggggcggt gagaggactg gccagggtcc	gccatgtcaa	4440
ggagatgacc aaggaggctt tcagatcctc ggcgcagtcg cccactagtc	tttagagagg	4500
gcatgcaaa ttgtgcttct gtcccactgc ctgctcagtc gctcacataa	tttattgcat	4560
caaaaactcc cctgggtctg cggagcaagg ctggggctgc ccgcctggag	ggtaccacct	4620
tctgcaggag cagggccaac ttgctgtggt ggctcccggc ctcccacccc	cgagtgggta	4680
accgggccct gtgacctgca gcctgtggag ggggtgtgcc taagactggc	ctcccccttc	4740
agattgtagt ctggggaacc tgggtgctgga cttcccagggt ggctgagct	ggtctcttca	4800
gctccacggg gagagtttgg tagcgcaaat agggagatgt tctgggcccc	tggccttact	4860
ggttcgattt gaggcctgga aaggaggctc tgggcgtgtg tgtgtgtgtt	tgggggtacc	4920
caaggcagac tggagttaga gaactgggtg actgggaaaa caaggtttct	agagcatggg	4980
tggcgtggtt gtgttaacca ttggagtcgc ttgaccagg cctggctcag	ctgcagactg	5040
gaaagggtga aaagccaggg ggagggggcg ggctggccca gcaggactgg	cctgctgctt	5100
tgagggcgat ggtcctcctg gacccccct gctcagctgg gggttgtggg	gaggaagggg	5160
ctggctcctc ttggagcaca tgctctgtag ggggtggggt gtctgccatc	ttggcggcgc	5220
tggaggcctg agaagtggcg atgtaacgct gggctggccc tgcccccatg	gtgtcatagg	5280
acggaggcag gtcgggtgtc cagcctgggc ccctgcagct gtggatgccg	ctgagctcct	5340
gcaataatga ccgtgcagat ggtcacccct cgtgtaaaat tactagtgtc	tcttgcaaat	5400
ggaaggaact gggccttttc tgtgtgcttc tggacgcttc attctgcaca	tggccctgcg	5460
ccctcacctc ggcattatga cctgtgtgtt acttttgtaa taaaaataat	gtttatagga	5520
aagccgtgct ttcaattttc aactgaattt gtaggttggc aaatttggtt	tgggaggggc	5580
acctctggcc tggggcttgg cctggctgcc ccgctcacgc cacttctctc	ccgccccag	5640
acaccaatgg gaatcccaat ggggaagtcg atgctgggtgc ttctcacctt	cttggccttc	5700

gcctcgtgct gcattgctgc ttaccgcccc agtgagaccc tgtgcggcgg ggagctgggtg	5760
gacaccctcc agttcgtctg tggggaccgc ggcttctact tcagtaagta gcagggagggg	5820
gcttcctcag acctggtcag gcccctagag tgaccggtga ggatctccca tcctcaagcc	5880
aggggagcac actcctaggt cagcagccca gccgcttgct ctgagacttt gaccttccccg	5940
ccgcgtttct gagcacgtgc ggtgtcccag ggcatccaca ccagctgcct tccccatcac	6000
acgcctcctt cgaagggtgg gccagaggtg ccccctagac gtcaggggca tctacagggg	6060
tctccctggg catcagaatt tctgttgggg gccgtgaggc tcctgctcct gaggcaccgc	6120
acgcctagtg cagggcttca ggctctggag gaagagcctg cctttcttcc tgcacctttt	6180
ggacattttg acaagggacg tgcgttcggt gaatgatcag aattaaaatc aataaagtga	6240
tttatataat taaaatcaat aagacaagt cagttgggtg gtggcagggg tgagcgggtgc	6300
atgcgcctcc ttgggcccc aaggctgccgt ggggggtgcc cacctgctga cctcaaggac	6360
gcttcagcct ttctcatgt ttctctcttg gttctccagc ctgggggctg gcaggtgggt	6420
gcatggccca ttgtccttga gacccacccc ccagataggg gggctgggtg gatgcagagg	6480
caggcatggt gcctgggcat gcctgatggg gcaggggagg ggcgctcct tactggcaga	6540
ggccgcaact tattccacct gacactcacc acgtgacatc ttaccacca ctgcttactc	6600
acgctgtgaa atgggctcac aggatgcaaa tgcacttcaa agcttctctc tgaaaagttc	6660
ctgctgcttg actctggaag cccctgcccg ccttgccctc tcctgtgccc tctctcttgc	6720
ctgccccatt tgggggtagg aagtggcact gcagggcctg gtgccagcca gtccttgccc	6780
agggagaagc ttccctgcac caggctttcc tgagaggagg ggaggggcaa gccccactt	6840
gggggcccc gtgacggggc ctctgctcc ctctccggc tgatggcacc tgccctttgg	6900
cacccaagg tggagcccc agcgaccttc ccttccagc tgagcattgc tgtgggggag	6960
agggggaaga cgggaggaaa gaaggagtg gttccatcac gcctcctcag cctcctctcc	7020
tcccgcttc tcctctctg cccttgctc cctgtctcag cagctccagg ggtggtgtgg	7080
gccccctcag cctcccagg ggtgccaggc cagagtccaa gctcacggac agcagtcctc	7140
ctgtgggggc cctgaactgg gctcacatcc cacacatttt ccaaaccact cccattgtga	7200
gcctttggtc ctggtggtgt cctctggtt gtgggaccaa gagcttgtgc ccatttttca	7260
tctgaggaag gaggcagcag aagtcacggg ctggtctggg cccactcac ctccccctc	7320
acctctcttc ttcttgggac gcctctgcct gccggctctc acttccctcc cctgacccgc	7380
agggtggctg cgnccctcca gggcctggcc tgagggcagg ggtggtttgc tgggggttcg	7440
gcctccgggg gctgggggtc ggtgcggtgc taacacggct ctctctgtgc tgtgggactt	7500
ccaggcaggc ccgcaagccg tgtgagccgt cgcagccgtg gcatcggtga ggagtgtgt	7560
ttccgcagct gtgacctggc cctcctggag acgtactgtg ctacccccgc caagtcagag	7620
agggacgtgt cgacccctcc gaccgtgctt ccggtgaggg tcctggggcc ctttccact	7680
ctctagagac agagaaatag ggcttcgggc gcccagcgtt tcctgtggcc tctgggacct	7740

cttggccagg gacaaggacc cgtgacttcc ttgcttgctg tgtggcccgg gagcagctca	7800
gacgctgggt ccttctgtcc ctctgcccgt ggacattagc tcaagtcact gatcagtcac	7860
aggggtggcc tgtcagggtca ggcgggcggc tcaggcggaa gagcgtggag agcaggcacc	7920
tgctgaccag ccccttcccc tcccaggaca acttccccga gatacccctg ggcaagttct	7980
tccaatatga cacctggaag cagtccaccc agcgcctgcg caggggcctg cctgccctcc	8040
tgcgtgcccc ccgggggtcac gtgctcgcca aggagctcga ggcgttcagg gaggccaaac	8100
gtcaccgtcc cctgattgct ctaccacccc aagaccccg cccacgggggc gccccccag	8160
agatggccag caatcggaag tgagcaaaac tgccgcaagt ctgcagcccc gcgccaccat	8220
cctgcagcct cctcctgacc acggacgttt ccatcaggtt ccatcccga aatctctcgg	8280
ttccacgtcc cctggggctt ctctgaccc agtccccgtg ccccgccctc ccgaaacagg	8340
ctactctcct cggccccctc catcgggctg aggaagcaca gcagcatctt caaacatgta	8400
caaaatcgat tggctttaa cacccttcac ataccctccc cccaaattat cccaattat	8460
ccccacacat aaaaaatcaa aacattaaac taacccccct cccccccccc cacaacaacc	8520
ctcttaaaac taattggctt tttagaaaca cccacaaaaa gctcagaaat tggctttaa	8580
aaaaacaacc accaaaaaaa atcaattggc taaaaaaaaa aagtattaaa aacgaattgg	8640
ctgagaaaca attggcaaaa taaaggaatt tggcactccc cccccccctc tttctcttct	8700
cccttggtgact ttgagtcaaa ttggcctgga cttgagtccc tgaaccagca aagagaaaag	8760
aagggcccca gaaatcacag gtgggcacgt cgcgtctacc gccatctccc ttctcacggg	8820
aatttttcagg gtaaaact	8837

<210> 11  
 <211> 6045  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

<400> 11



ccctcaccaa	gggccaaggt	ggtgaccgac	ggacccacag	cggggtggct	gggggagtcg	60
aaactcgcca	gtctccactc	cactcccaac	cgtggtgccc	cacgcgggcc	tgggagagtc	120
tgtgaggccg	cccaccgctt	gtcagtagag	tgcgcccgcg	agccgtaagc	acagcccggc	180
aacatgcggt	cttcagacag	gaaagtggcc	gcgaatggga	ccggggtgcc	cagcggctgt	240
ggggactctg	tcctgcggaa	accgcggtga	cgagcacaag	ctcgggtcaac	tggtatgggaa	300
tcggcctggg	gggctggcac	cgcgcccacc	agggggtttg	cggcacttcc	ctctgccccct	360
cagcacccca	cccctactct	ccaggaacgt	gagttctgag	ccgtgatggt	ggcaggaagg	420
ggccctctgt	gcatccgag	tccccaggga	cccgcagctg	gccccagcc	atgtgcaaag	480
tatgtgcagg	gcgctggcag	gcaggagca	gcaggcatgg	tgtccccctga	ggggagacag	540
tggctctggga	gggagaagtc	ctggaccctg	agggaggtga	tggggcaatg	ctcagccctg	600

tctccggatg ccaaaggagg ggtgcgggga ggccgtcttt ggagaattcc aggatgggtg	660
ctgggtgaga gagacgtgtg ctggaactgt ccagggcgga ggtgggccct gcggggggccc	720
tcgggagggc cctgctctga ttggccggca gggcaggggc ggggaatcctg ggcggggcca	780
ccccagttag aaaaagcccc ggctaggacc gaggagcagg gtgagggaga agcttgccat	840
tccggtactg ttggtaaagc caccatggat cctgatgatg ttgttgattc ttctaaatct	900
tttgtgatgg aaaacttttc ttcgtaccac gggactaaac ctggttatgt agattccatt	960
caaaaaggta taaaaagcc aaaatctggt acacaaggaa attatgacga tgattggaaa	1020
gggttttata gtaccgacaa taaatacgac gctgcgggat actctgtaga taatgaaaac	1080
ccgctctctg gaaaagctgg aggcgtggtc aaagtgcagt atccaggact gacgaagggt	1140
ctcgactaa aagtggataa tgccgaaact attaagaaag agttagggtt aagtctcact	1200
gaaccgttga tggagcaagt cggaacggaa gagtttatca aaaggttcgg tgatggtgct	1260
tcgcgtgtag tgctcagcct tcccttcgct gaggggaggt ctacgcttga atatattaat	1320
aactgggaac aggcgaaagc gttaagcgta gaacttgaga ttaattttga aaccctgga	1380
aaacgtggcc aagatgcgat gtatgagtat atggctcaag cctgtgcagg aaatcgtgtc	1440
aggcgatctt tgtgaaggaa ccttacttct gtggtgtgac ataattggac aaactaccta	1500
cagagatttg gggatcctct agagtcgggg cgccggccg cttcgagcag acatgataag	1560
atacattgat gagtttgac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat gctttatttg	1620
tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa	1680
caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta	1740
aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtaa aatcgataag gatccgtcga ccgatgccct	1800
tgagagcctt caaccagtc agctccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg	1860
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctcttc	1920
gcttcctcgc tactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1980
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	2040
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttcc	2100
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	2160
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	2220
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg	2280
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	2340
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttatt cggttaactat	2400
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	2460
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	2520
tacggctaca ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc	2580
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtgggttt	2640

tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2700
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg	2760
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaataca	2820
atctaaagta tatatgagta aacttgggtct gacagttaga aaaactcatc gagcatcaaa	2880
tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc	2940
tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg	3000
tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc gtcaaaaaata	3060
aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaaagt	3120
ttatgcattt ctttcagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaaatca	3180
ctcgcaccaa ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgctt gagcgagacg aaatacgcga	3240
tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag gaacactgcc	3300
agcgcaccaa caatattttc acctgaatca ggatattctt ctaataacctg gaatgctgtt	3360
ttcccgggga tcgcagtggg gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat aaaatgcttg	3420
atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca	3480
tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcacg gggcttccca	3540
tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca ttataacca	3600
tataaatcag catccatggt ggaatttaat cgcggcctag agcaagacgt ttcccgttga	3660
atatggctca tactcttcct tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc	3720
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca	3780
tttccccgaa aagtgccacc tgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg	3840
gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgct	3900
ttctttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg	3960
ctcccttttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag	4020
ggatgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg	4080
gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc	4140
tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat	4200
gagctgattt aacaaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaatttgc	4260
cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta	4320
ttacgccagc ccaagctacc atgataagta agtaatatta aggtacggga ggtacttggg	4380
gcggccgcaa taaaatatct ttattttcat tacatctgtg tgttggtttt ttgtgtgaat	4440
cgatagtact aacatacgtc ctccatcaaa acaaaacgaa acaaaacaaa ctagcaaaat	4500
aggctgtccc cagtgaagt gcaggtgcca gaacatttct ctatcgataa cttcccggtc	4560
ggctctgtggg tgcagggggg gccgcctcac atgtgtgatt cgtgccttgc gggccctggc	4620
ctccgggggtg ctgggtaacg aggaggggag cggagccgca gaagcccacc ctggtatgtt	4680

gacgcggtgc cagcgagacc gcgagaggaa gacgggggtg ggcggggcca ggatggagag	4740
gggccgagtt ggcaggagtc atggcagacg ccacattcgc gacatctccc ccacaccccc	4800
tctggctctg tccgcaacat ttccaaacag gagtccccgg agaggggggag aggggctgct	4860
ggtctgaggc taagaagggc agagccttcg acccggagag aggccgcggc ccctgcccag	4920
tgggcagcgt ggaagtttcc atacaaggag gtgggaagga gacccccccc ccccttcaact	4980
gccctgtgca gagatgagcc ggggggtgcag gatgggagcc catggcactt cgctacggga	5040
tgggtccaggg ctcccggttg ggggtgcagg agagaagaga ctggctggga ggagggagag	5100
ggcgggagca aaggcgcggg ggagtgggtca gcagggagag ggggtggggg taggggtggag	5160
cccgggctgg gaggagtcgg ctccacacata aaagctgagg cactgaccag cctgcaaact	5220
ggacattagc ttctcctgtg aaagagactt ccagcttcct cctcctcctc ttctcctcc	5280
tcctcctgcc ccagcgagcc ttctgtgag ctgtaggggg atcttctaga gtcggctagc	5340
ggcattccgg tactgttggg aaagccacca tggatcctga tgatgttgtt gattcttcta	5400
aatcttttgt gatggaaaac ttttcttcgt accacgggac taaacctggt tatgtagatt	5460
ccattcaaaa aggtatacaa aagccaaaat ctggtacaca aggaaattat gacgatgatt	5520
ggaaaggggt ttatagtacc gacaataaat acgacgctgc gggatactct gtagataatg	5580
aaaacccgct ctctggaaaa gctggaggcg tggtaaagt gacgtatcca ggactgacga	5640
aggttctcgc actaaaagt gataatgccg aaactattaa gaaagagtta ggtttaagtc	5700
tcactgaacc gttgatggag caagtcggaa cggaagagtt tatcaaaagg ttcgggtgatg	5760
gtgcttcgcg tgtagtgctc agccttcctt tcgctgaggg gagttctagc gttgaatata	5820
ttaataactg ggaacaggcg aaagcgtaa gcgtagaact tgagattaat tttgaaaccc	5880
gtggaaaacg tggccaagat gcgatgtatg agtatatggc tcaagcctgt gcaggaaatc	5940
gtgtcaggcg atctttgtga aggaacctta cttctgtggt gtgacataat tggacaaact	6000
acctacagag atttggggat ccctcgagac gtagggtacc gacaa	6045

<210> 12  
 <211> 632  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

<b>gacgggggtg ggcggggcca ggatggagag gggccgagtt ggcaggagtc atggcagacg</b>	<b>60</b>
<b>ccacattcgc gacactctcc ccacaccccc tctggctctg tccgcaacat ttccaaacag</b>	<b>120</b>
<b>gagtcccggg agagggggag aggggctgct ggtctgaggc taagaagggc agagccttcg</b>	<b>180</b>
<b>acccggagag aggccgcggc ccctgcccag tgggcagcgt ggaagtttcc atacaaggag</b>	<b>240</b>
<b>gtgggaagga gacccccccc ccccttcact gccctgtgca gagatgagcc gggggtgcag</b>	<b>300</b>
<b>gatgggagcc catggcactt cgctacggga tggtcagggc tcccggttgg ggggtgcagga</b>	<b>360</b>
<b>gagaagagac tggctgggag gagggagagg gcgggagcaa aggcgcgggg gagtggtcag</b>	<b>420</b>
<b>cagggagagg ggtgggggggt aggggtggagc ccgggctggg aggagtcggc tcacacataa</b>	<b>480</b>
<b>aagctgaggc actgaccagc ctgcaaactg gacattagct tctcctgtga aagagacttc</b>	<b>540</b>
<b>cagcttcctc ctctcctct tctcctcct cctcctgccc cagcgagcct tctgctgagc</b>	<b>600</b>
<b>tgtaggtaac cagggccgtg gatgagactc tc</b>	<b>632</b>

<210> 13  
 <211> 870  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

<b>ggatcccca aatgtgttcc ttgctttcat ctgccaatTT tacgtaatat ggctctacgg</b>	<b>60</b>
<b>caaaattccc aatttcatat ggagaatttt ctttaactac ccctcctcac aaattgggtcc</b>	<b>120</b>
<b>cccaagctag ctggccccta tttgagacct ctttctctat gttcccaatt gcatggagca</b>	<b>180</b>
<b>acttctctca tccccaaac ctgtaatcta tttttctgga gtctcgagtt tagtcattaa</b>	<b>240</b>
<b>tcacggttcc cacattaacg gagtccccgg ggtccccctcc tccaggacac ccattcgcta</b>	<b>300</b>
<b>agccccgaag gcagaaagaa ctctgccttg cgttccccaa aatttgggca ttgttcgggc</b>	<b>360</b>
<b>tcgccggcca cccactgcag cttccccaac cccgcgcaca gcgggcactg gtttcggggc</b>	<b>420</b>
<b>tctctgtctc ctacgaagtc ccagagcaa ctcggttttg ggaaatttct ctctagcgtt</b>	<b>480</b>
<b>gccccaaacac acttgggtcg gccgcgcgcc ctcaggacgt ggacagggag ggcttccccg</b>	<b>540</b>
<b>tgtccaggaa agcgaccggg cattgcccc agtctcccc aaatttgggc attgtccccg</b>	<b>600</b>
<b>ggtctttccaa cggactgggc gttgtctccg gacactgagg actggccccg gggctctcgt</b>	<b>660</b>
<b>caccttcagc agcgtccacc gcctgccaca gagcgttcga tcgctcgctg cctgagctcc</b>	<b>720</b>
<b>tgggtgcgccc gcggacgcag cctccagctt cgcggtgagc tccccgccgc gccgatcccc</b>	<b>780</b>
<b>tccgcctctg cggccctgac cggctctcgg cccgcattctg ctgctgtccc gccggtgctg</b>	<b>840</b>
<b>gcgctcgtct ccggctgccg ccggggaggc</b>	<b>870</b>

<210> 14  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

<b>tcatgagcac</b>	<b>cgagagcatg</b>	<b>atcagggatg</b>	<b>tggagctggc</b>	<b>cgaggaggcc</b>	<b>ctgcccaga</b>	<b>60</b>
<b>aaacaggcgg</b>	<b>ccctcagggc</b>	<b>agcagaagat</b>	<b>gcctgttcct</b>	<b>gagcctgttc</b>	<b>agcttcctga</b>	<b>120</b>
<b>tcgtggccgg</b>	<b>agccaccacc</b>	<b>ctgttctgcc</b>	<b>tgttgaactt</b>	<b>cggcgtgatc</b>	<b>ggccccaga</b>	<b>180</b>
<b>gagaggagtt</b>	<b>ccccagagac</b>	<b>ctgagcctga</b>	<b>tctccccct</b>	<b>ggcccaggct</b>	<b>gtgagaagca</b>	<b>240</b>
<b>gcagcagaac</b>	<b>ccccagcgac</b>	<b>aagcccgtgg</b>	<b>cccacgtggt</b>	<b>ggccaacccc</b>	<b>caggccgagg</b>	<b>300</b>
<b>gccagctgca</b>	<b>gtggctgaac</b>	<b>agaagagcca</b>	<b>acgccctgct</b>	<b>ggccaacggc</b>	<b>gtggagctga</b>	<b>360</b>
<b>gagacaacca</b>	<b>gctggtggtg</b>	<b>cccagcgagg</b>	<b>gcctgtacct</b>	<b>gatctacagc</b>	<b>cagggtgctgt</b>	<b>420</b>
<b>tcaagggcca</b>	<b>gggctgcccc</b>	<b>agcaccacg</b>	<b>tgttctgac</b>	<b>ccacaccatc</b>	<b>agcagaatcg</b>	<b>480</b>
<b>ccgtgtccta</b>	<b>ccagaccaag</b>	<b>gtgaacctgc</b>	<b>tgtccgccat</b>	<b>caagagccct</b>	<b>tgccagagag</b>	<b>540</b>
<b>agacccccga</b>	<b>gggcgcccag</b>	<b>gccaagccct</b>	<b>ggtacgagcc</b>	<b>tatctacctg</b>	<b>ggcggcgtgt</b>	<b>600</b>
<b>tccagctgga</b>	<b>gaagggcgac</b>	<b>agactgagcg</b>	<b>ccgagatcaa</b>	<b>cagacccgac</b>	<b>tacctggatt</b>	<b>660</b>
<b>tcgccgagag</b>	<b>cggccagggtg</b>	<b>tacttcggca</b>	<b>tcacgcct</b>	<b>gtgataatct</b>	<b>agaaccatgg</b>	<b>720</b>

5 <210> 15  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 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  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

&lt;400&gt; 16

ggtaccgaca accctcacca agggccaagg tggtagaccga cggacccaca gcgggggtggc	60
tgggggagtc gaaactcgcc agtctccact ccactcccaa ccgtggtgcc ccacgcgggc	120
ctgggagagt ctgtgaggcc gcccaccgct tgtagtaga gtgcgcccgc gagccgtaag	180
cacagcccgg caacatgcgg tcttcagaca ggaaagtggc cgcaaatggg accgggggtgc	240
ccagcggctg tggggactct gtcctgcgga aaccgcggtg acgagcacia gctcgggtcaa	300
ctggatggga atcggcctg ggggctggca ccgcgcccac caggggggtt gcggcacttc	360
cctctgcccc tcagcacccc acccctactc tccaggaacg tgagttctga gccgtgatgg	420
tggcaggaag gggccctctg tgccatccga gtccccaggg acccgcagct ggcccccagc	480
catgtgcaaa gtatgtgcag ggcgctggca ggcaggagagc agcaggcatg gtgtcccctg	540
aggggagaca gtggtctggg agggagaagt cctggaccct gagggaggtg atggggcaat	600
gctcagccct gtctccgat gccaaaggag ggggtgcgggg aggccgtctt tggagaattc	660
caggatgggt gctgggtgag agagacgtgt gctggaactg tccagggcgg aggtgggccc	720
tgcgggggcc ctggggaggg ccctgctctg attggccggc agggcagggg cgggaatcct	780
gggcggggcc accccagtta gaaaaagccc gggctaggac cgaggagcag ggtgagggag	840
aagcttgga ttccggtact gttggtaaag ccaccatgga tcctgatgat gttgttgatt	900
cttctaaatc ttttgtgatg gaaaactttt cttcgtacca cgggactaaa cctggttatg	960
tagattccat tcaaaaagggt atacaaaagc caaatcttg tacacaagga aattatgacg	1020
atgattggaa agggttttat agtaccgaca ataaatacga cgctgcggga tactctgtag	1080
ataatgaaaa ccgctctctt ggaaaagctg gaggcgtggt caaagtgacg tatccaggac	1140
tgacgaaggt tctgcacta aaagtggata atgccgaaac tattaagaaa gagttaggtt	1200
taagtctcac tgaaccgtt atggagcaag tcggaacgga agagtttatc aaaagggttcg	1260
gtgatggtgc ttcgcgtgta gtgctcagcc ttcccttcgc tgaggggagt tctagcgttg	1320
aatatattaa taactgggaa caggcgaaag cgtaagcgt agaacttgag attaatattg	1380
aaaccctggtg aaacgtggc caagatgcga tgtatgagta tatggctcaa gcctgtgcag	1440
gaaatcgtgt caggcgatct ttgtgaagga accttacttc tgtggtgtga cataattgga	1500
caaactacct acagagattt ggggatcctc tagagtcggg gcggccggcc gcttcgagca	1560



gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa	1620
tgctttatatt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat	1680
aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg	1740
gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta aaatcgataa ggatccgctg	1800
accgatgccc ttgagagcct tcaaccaggt cagctccttc cggtgggccc ggggcatgac	1860
tatcgctgcc gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctctaggac aggtgccggc	1920
agcgtctctt cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag	1980
cggtatcagc tactcaaag gcggtataac gggtatccac agaatcaggg gataacgcag	2040
gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc	2100
tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc	2160
agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc	2220
tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt	2280
cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg	2340
ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat	2400
ccggttaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag	2460
ccactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt	2520
gggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc	2580
cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta	2640
gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag	2700
atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctacgtggaa cgaaaactca cgtaaggga	2760
ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa	2820
gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttag aaaaactcat	2880
cgagcatcaa atgaaactgc aattttattca tatcaggatt atcaatacca tatttttgaa	2940
aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca gttccatagg atggcaagat	3000
cctggatatc gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt aatttcccc	3060
cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga	3120
atggcaaaaag tttatgcatt tctttccaga cttgttcaac aggccagcca ttacgctcgt	3180
catcaaaatc actcgcatca accaaaccgt tattcattcg tgattgcgcc tgagcgagac	3240
gaaatacgcg atcgtgttta aaaggacaat tacaacagg aatcgaatgc aaccggcgca	3300
ggaacactgc cagcgcatca acaatatatt cacctgaatc aggatattct tctaatacct	3360
ggaatgctgt tttccgggg atcgcagtg tgagtaacca tgcacatca ggagtacgga	3420
taaaatgctt gatggtcggg agaggcataa attccgtcag ccagtttagt ctgaccatct	3480
catctgtaac atcattggca acgctacctt tgccatgttt cagaaacaac tctggcgcat	3540
cggtcttccc atacaatcga tagattgtcg cacctgattg cccgacatta tcgcgagccc	3600

atttataccc atataaatca gcatccatgt tggaatttaa tcgcggccta gagcaagacg	3660
tttcccgttg aatatggctc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg	3720
gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	3780
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg	3840
cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcggccg	3900
ctcctttcgc tttcttccct tcttttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc	3960
taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa	4020
aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc	4080
ctttgacgtt ggagtcacg tcttttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac	4140
tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt	4200
ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc	4260
ttacaatttg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga tcggtgcggg	4320
cctcttcgct attacgccag cccaagctac catgataagt aagtaatatt aaggtagggg	4380
aggtacttgg agcggccgca ataaaatatc tttattttca ttacatctgt gtgttggttt	4440
tttgtgtgaa tcgatagtac taacatacgc tctccatcaa aacaaaacga aacaaaacaa	4500
actagcaaaa taggctgtcc ccagtgcag tgcaggtgcc agaacatttc tctatcgata	4560

<210> 17  
 <211> 885  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

<400> 17

ggccatgcag gtaggatttg agctgtgttt cccgccctga tcctctctcc tctggcggcc	60
ggagcctccg taggctccaa gcctggccca gattcggcgg cgcagccggc cttccgcgcg	120
tccgcaccta gcgggggctc cgggggtccg gcgcggcacc ggggggcgct cgggatctgg	180
ctgaggctcc aaggccccgcg tggccggctc ctctgctgg ggcagggtggc ggctgcgcgc	240
cccgcccagag cccagggggcc ccctcagccg caacaaccag caaggacccc ccgactcagc	300
cccaagccac ctgcatctgc actcagacgg ggcgcacccg cagtgcagcc tcctgggtggg	360
gcgctgggag cccgcctgcc cctgcctgcc cggagacccc agctcacgag cacaggccgc	420
ccgggcacccc cagaaacccg ggatggggcc cctgaattct ctaggacggg cattcagcat	480
ggccttggcg ctctgcggct ccctgcccc caccagcct cggccccgcg cccccccag	540
cccctgcgac cggcgcccc cccccgggg ccccagggcc ccagcccga cccccgccc	600
cgtctttggc tcgggttgcg ggggcgggcc gggggcgggg cgagggtctc gcgggcgccc	660
attggcgcgg gcgcgaggcc agcggcccc cgcggccctg ggccgcggct ggcgcgacta	720
taagagccgg gcgtgggcgc ccgcagttcg cctgctctcc ggcggagctg cgtgaggccc	780
ggccggcccc ggccccccc ttccggccgc cccgcctcc tggeccacgc ctgccccgcg	840
tctgcccacc agcgcctcca tcgggcaagg cggccccgcg tcgac	885

<210> 18  
 <211> 6163  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

<400> 18

ccctcaccaa gggccaaggt ggtgaccgac ggacccacag cggggtggct gggggagtcg	60
aaactcgcca gtctccactc cactcccaac cgtggtgccc cacgcgggcc tgggagagtc	120
tgtgaggccg cccaccgctt gtcagtagag tgcgcccgcg agccgtaagc acagcccggc	180
aacatgcggt cttcagacag gaaagtggcc gcgaatggga ccgggggtgcc cagcggctgt	240
ggggactctg tcctgcggaa accgcggtga cgagcacaag ctcggtcaac tggatgggaa	300
tcggcctggg gggctggcac cgcgcccacc aggggggttg cggcacttcc ctctgcccct	360
cagcacccca cccctactct ccaggaacgt gagttctgag ccgtgatggg ggcaggaagg	420
ggccctctgt gccatccgag tccccaggga cccgcagctg gccccagcc atgtgcaaag	480
tatgtgcagg gcgctggcag gcagggagca gcaggcatgg tgtcccctga ggggagacag	540
tggtctggga gggagaagtc ctggaccctg agggaggtga tggggcaatg ctcagccctg	600
tctccggatg ccaaaggagg ggtgcgggga ggccgtcttt ggagaattcc aggatgggtg	660
ctgggtgaga gagacgtgtg ctggaactgt ccagggcgga ggtgggccct gcggggggccc	720
tcgggagggc cctgctctga ttggccggca gggcaggggc gggaatcctg ggcggggcca	780
ccccagttag aaaaagcccg ggctaggacc gaggagcagg gtgagggaga agcttggcat	840
tccggtactg ttggtaaagc caccatggat cctgatgatg ttgttgattc ttctaaatct	900
tttgtgatgg aaaacttttc ttcgtaccac gggactaaac ctggttatgt agattccatt	960
caaaaaggta tacaaaagcc aaaatctggt acacaaggaa attatgacga tgattggaaa	1020
gggttttata gtaccgacaa taaatacgac gctgcgggat actctgtaga taatgaaaac	1080
ccgctctctg gaaaagctgg aggcgtggtc aaagtgacgt atccaggact gacgaagggt	1140
ctcgcactaa aagtggataa tgccgaaact attaagaaag agttaggttt aagtctcact	1200
gaaccgttga tggagcaagt cggaacggaa gagtttatca aaaggttcgg tgatggtgct	1260
tcgcgtgtag tgctcagcct tcccttcgct gaggggagtt ctagcgttga atatattaat	1320
aactgggaac aggcgaaagc gttaagcgta gaacttgaga ttaattttga aaccctgga	1380
aaacgtggcc aagatgcgat gtatgagtat atggctcaag cctgtgcagg aaatcgtgtc	1440
aggcgatctt tgtgaaggaa ccttacttct gtggtgtgac ataattggac aaactaccta	1500
cagagatttg gggatcctct agagtcgggg cggccggccg cttcgagcag acatgataag	1560
atacattgat gaggtttgac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg	1620

tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa	1680
caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta	1740
aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtaa aatcgataag gatccgtcga ccgatgccct	1800
tgagagcctt caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg	1860
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctcttcc	1920
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	1980
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	2040
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc	2100
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	2160
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	2220
cctgtttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggagcgctg	2280
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	2340
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaaactat	2400
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	2460
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	2520
tacggctaca ctagaagaac agtatgttgt atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc	2580
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt	2640
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	2700
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg	2760
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca	2820
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttaga aaaactcatc gagcatcaaa	2880
tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc	2940
tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg	3000
tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccccctc gtcaaaaata	3060
aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt	3120
ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaatca	3180
ctcgcaccaa ccaaaccggt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg aaatacgcg	3240
tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgagc gaacactgcc	3300
agcgcaccaa caatattttc acctgaatca ggatattctt ctaataacctg gaatgctgtt	3360
ttccggggga tcgcagtggg gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat aaaatgcttg	3420
atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca	3480
tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc gggcttccca	3540
tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca ttataacca	3600
tataaatcag catccatggt ggaatttaac cgcggcctag agcaagacgt ttcccggtga	3660

atatggctca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc	3720
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca	3780
tttccccgaa aagtgccacc tgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg	3840
gtgggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgcct	3900
ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg	3960
ctccctttag gggtccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag	4020
ggatgatgggt cacgtagtgg gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc ttgacggtg	4080
gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc	4140
tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat	4200
gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttttaaaaaa tattaacgct tacaatttgc	4260
cattcggcat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta	4320
ttacgccagc ccaagctacc atgataagta agtaatatta aggtacggga ggtacttgga	4380
gcggccgcaa taaaatatct ttattttcat tacatctgtg tggttggtttt ttgtgtgaat	4440
cgatagtact aacatacgtc ctccatcaaa acaaaacgaa acaaaacaaa ctagcaaaat	4500
aggctgtccc cagtgcgaat gcaggtgccg gaacatttct ctatcgatac tcgagggcca	4560
tgcaggtagg atttgagctg tgtttcccg cctgatcctc tctcctctgg cggccggagc	4620
ctccgtaggc tccaagcctg gccagattc ggcggcgcag ccggccttcc gcgcgtccgc	4680
acctagcggg ggctccgggg ctccggcgcg gcaccggggg gcgctcggga tctggctgag	4740
gctccaaggc ccgcgtggcc ggctcctcct gctggggcag gtggcggctg cgcgccccgc	4800
ccgagcccag gggccccctc agccgcaaca accagcaagg accccccgac tcagccccaa	4860
gccacctgca tctgactca gacggggcgc acccgagtg cagcctcctg gtggggcgct	4920
gggagccccg ctgccccctg ctgcccggag accccagctc acgagcacag gccgcccggg	4980
cacccagaa acccgggatg gggccccctga attctctagg acgggcattc agcatggcct	5040
tggcgctctg cggtcctctg cccccaccc agcctcgccc ccgcgacccc cccagcccc	5100
gcgaccgccc ccccccccc cggggccccca gggccccagc ccgcaccccc cgccccgctc	5160
ttggctcggg ttgcgggggc gggccggggg cggggcgagg gctccgcggg cgcccattgg	5220
cgcgggcgcg aggccagcgg ccccgcgcg ccctggggcg cggtggcg gactataaga	5280
gccgggctg ggcgcccga gtgcgctgc tctccggcg agctgcgtga ggcccggccg	5340
gccccggccc ccccttccg gccgccccg cctcctggcc cacgcctgcc cgcgctctgc	5400
ccaccagcgc ctccatcgg caaggcggcc ccgcgtcgac aagcttagct acgctagcgg	5460
cattccggta ctgttggtaa agccaccatg gatcctgatg atgttggtga ttcttctaaa	5520
tcttttgtga tggaaaactt ttcttcgtac cacgggacta aacctgggta thtagattcc	5580
attcaaaaag gtatacaaaa gccaaaatct ggtacacaag gaaattatga cgatgattgg	5640
aaagggtttt atagtaccga caataaatac gacgctgcgg gatactctgt agataatgaa	5700

aacccgctct ctggaaaagc tggaggcgtg gtcaaagtga cgtatccagg actgacgaag	5760
gttctcgcac taaaagtgga taatgccgaa actattaaga aagagttagg tttaagtctc	5820
actgaaccgt tgatggagca agtcggaacg gaagagttta tcaaaagggt cggtgatggt	5880
gcttcgcgtg tagtgctcag ccttcccttc gctgagggga gttctagcgt tgaatatatt	5940
aataactggg aacaggcgaa agcgttaagc gtagaacttg agattaattt tgaaaccctg	6000
ggaaaacgtg gccaaagatgc gatgtatgag tatatggctc aagcctgtgc aggaaatcgt	6060
gtcaggcgat ctttgtgaag gaaccttact tctgtggtgt gacataattg gacaaactac	6120
ctacagagat ttggggatcc ctcgagacgt agggtagcga 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 cgccctgac ctctctctc tggcggccgg agcctccgta	120
ggctccaagc ctggcccaga ttcggcggcg cagccggcct tccgcgcgtc cgcacctagc	180
gggggctccg gggctccggc gcggcaccgg ggggcgctcg ggatctggct gaggtccaa	240
ggcccgcgtg gccggctcct cctgctgggg cagggtggcg ctgcgcgcc cggccgagcc	300
caggggcccc ctcagccgca acaaccagca aggaccccc gactcagccc caagccacct	360
gcatctgcac tcagacgggg cgcacccgca gtgcagcctc ctggtggggc gctgggagcc	420
cgcctgcccc tgcttgccc gagaccccag ctcacgagca caggccgcc gggcacccca	480
gaaaccggg atggggcccc tgaattctct aggacggga ttcagcatgg ccttggcgct	540
ctgcggctcc ctgccccca cccagcctcg ccccgcgca cccccagcc cctgcgaccg	600
ccgccccccc ccccgggggc ccagggcccc agcccgcacc ccccgcccc ctcttggtc	660
gggttgcggg ggcggggccgg gggcgggggc agggctccgc gggcgcccat tggcgcgggc	720
gcgaggccag cggccccgcg cggccctggg ccgcggctgg cgcgactata agagccgggc	780
gtgggcgccc gcagttcgcc tgctctccgg cggagctgcg tgaggcccg cggccccgg	840
cccccccctt ccggccgccc ccgcctcctg gcccacgcct gccgcgctc tgcccaccag	900
cgcctccatc gggcaaggcg gccccgcaag cttggcattc cggtagtgtt ggtaaagcca	960
ccatggatcc tgatgatgtt gttgattctt ctaaattctt tgtgatggaa aacttttctt	1020
cgtaccacgg gactaaacct ggttatgtag attccattca aaaaggata caaaagccaa	1080
aatctggtac acaaggaaat tatgacgatg attggaaagg gttttatagt accgacaata	1140
aatacgacgc tcggggatac tctgtagata atgaaaaccc gctctctgga aaagctggag	1200
gcgtggtcaa agtgacgtat ccaggactga cgaaggttct cgcactaaaa gtggataatg	1260



ccgaaactat taagaaagag ttaggtttaa gtctcactga accgttgatg gagcaagtcg	1320
gaacggaaga gtttatcaaa aggttcggtg atggtgcttc gcgtgtagtg ctcagccttc	1380
ccttcgctga ggggagttct agcgttgaat atattaataa ctgggaacag gcgaaagcgt	1440
taagcgtaga acttgagatt aattttgaaa cccgtggaaa acgtggccaa gatgcgatgt	1500
atgagtatat ggctcaagcc tgtgcaggaa atcgtgtcag gcgatctttg tgaaggaaacc	1560
ttactttctgt ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttggg gatcctctag	1620
agtcggggcg gccggccgct tcgagcagac atgataagat acattgatga gtttgacaaa	1680
accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttattttgtg aaattttgtg tgctatttgc	1740
ttattttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt	1800
atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag gtttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa	1860
tgtggtaaaa tcgataagga tccgtcgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag	1920
ctccttcggg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat	1980
catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctcttcgc ttcctcgctc actgactcgc	2040
tgcgtcgggt cgttcgggtg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgggt	2100
tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	2160
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg	2220
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	2280
accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgtctcc tgttccgacc ctgccgctta	2340
ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct	2400
gtaggtatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	2460
ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aacccggtaa	2520
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	2580
taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag	2640
tatttggtat ctgcgtctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	2700
gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta	2760
cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc	2820
agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatg attatcaaaa aggatcttca	2880
cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa	2940
cttgggtctga cagttagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat	3000
caggattatc aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac	3060
cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtccaa	3120
catcaatata acctattaat ttccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac	3180
catgagtgac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagtgt atgcatttct ttccagactt	3240
gttcaacagg ccagccatta cgctcgctcat caaaatcact cgcacacacc aaaccgttat	3300

tcatttcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgacg gctgttaaaa ggacaattac	3360
aaacaggaat cgaatgcaac cggcgcagga acactgccag cgcatcaaca atattttcac	3420
ctgaatcagg atattcttct aatacctgga atgctgtttt cccggggatc gcagtgggtga	3480
gtaaccatgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcggaaga ggcataaatt	3540
ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctacctttgc	3600
catgtttcag aaacaactct ggcgcacggt gcttcccata caatcgatag attgtcgcac	3660
ctgattgccc gacattatcg cgagcccatt tatacccata taaatcagca tccatgttgg	3720
aatttaaatcg cggcctagag caagacgttt cccgttgaat atggctcata ctcttccttt	3780
ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggt attgtctcat gagcggatac atatttgaat	3840
gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg	3900
acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg	3960
ctacacttgc cagcgcctta gcgcccgtc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca	4020
cgttcgcgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttagggt tccgattta	4080
gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattagggt tgatgggttca cgtagtgggc	4140
catcgccctg atagacgggt tttcgccctt tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg	4200
gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct tttgatttat	4260
aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta	4320
acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttgcca ttcgccattc aggctgcgca	4380
actgttggga agggcgatcg gtgcgggcct cttcgctatt acgccagccc aagctaccat	4440
gataagtaag taatattaag gtacgggagg tacttggagc ggccgcaata aaatatcttt	4500
attttcatta catctgtgtg ttgggttttt gtgtgaatcg atagtactaa catacgtct	4560
ccatcaaac aaaacgaaac aaaacaaact agcaaaatag gctgtcccca gtgcaagtgc	4620
aggtgccaga acatttctct atcgatagggt accgaca	4657

<210> 20  
 <211> 8162  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

<400> 20

<b>gacaaccctc</b>	<b>accaagggcc</b>	<b>aagggtggtga</b>	<b>ccgacggacc</b>	<b>cacagcgggg</b>	<b>tggctggggg</b>	<b>60</b>
<b>agtcgaaact</b>	<b>cgccagtctc</b>	<b>cactccactc</b>	<b>ccaaccgtgg</b>	<b>tgccccacgc</b>	<b>gggcctggga</b>	<b>120</b>
<b>gagtctgtga</b>	<b>ggccgcccac</b>	<b>cgcttgtcag</b>	<b>tagagtgcgc</b>	<b>ccgcgagccg</b>	<b>taagcacagc</b>	<b>180</b>
<b>ccggcaacat</b>	<b>gcggtcttca</b>	<b>gacaggaaaag</b>	<b>tggccgcgaa</b>	<b>tgggaccggg</b>	<b>gtgcccagcg</b>	<b>240</b>
<b>gctgtgggga</b>	<b>ctctgtcctg</b>	<b>cggaaaccgc</b>	<b>ggtgacgagc</b>	<b>acaagctcgg</b>	<b>tcaactggat</b>	<b>300</b>
<b>gggaatcggc</b>	<b>ctggggggct</b>	<b>ggcaccgcgc</b>	<b>ccaccagggg</b>	<b>gtttgcggca</b>	<b>cttccctctg</b>	<b>360</b>

ccccctcagca cccaccccct actctccagg aacgtgagtt ctgagccgtg atggtggcag	420
gaagggggccc tctgtgccat ccgagtcctc agggacccgc agctggcccc cagccatgtg	480
caaagtatgt gcagggcgct ggcaggcagg gagcagcagg catggtgtcc cctgagggga	540
gacagtggtc tgggagggag aagtcctggc cctgagggag gtgatggggc aatgctcagc	600
cctgtctccg gatgccaaag gaggggtgcg gggaggccgt ctttgagaa ttccaggatg	660
ggtgctgggt gagagagacg tgtgctggaa ctgtccaggg cggaggtggg ccctgcgggg	720
gccctcggga gggccctgct ctgattggcc ggcagggcag gggcgggaat tctgggcggg	780
gccaccccag ttagaaaaag cccgggctag gaccgaggag cagggtgagg gaagcttggc	840
attccggtac tgttggtaaa gccaccatgg aagacgcaa aaacataaag aaaggcccgg	900
cgccattcta tccgctggaa gatggaaccg ctggagagca actgcataag gctatgaaga	960
gatacgccct gggttcctgga acaattgctt ttacagatgc acatatcgag gtggacatca	1020
cttacgctga gtacttcgaa atgtccgttc gggtggcaga agctatgaaa cgatatgggc	1080
tgaatacaaa tcacagaatc gtcgtatgca gtgaaaactc tctcaattc tttatgccgg	1140
tgttgggcgc gttatttata ggagttgcag ttgcgcccgc gaacgacatt tataatgaac	1200
gtgaattgct caacagtatg ggcatttcgc agcctaccgt ggtgttcggt tccaaaaagg	1260
ggttgcaaaa aattttgaac gtgcaaaaaa agctcccaat catccaaaaa attattatca	1320
tggattctaa aacggattac cagggatttc agtcgatgta cacgttcgtc acatctcatc	1380
tacctcccgg ttttaatgaa tacgattttg tgccagagtc cttcgatagg gacaagacaa	1440
ttgcactgat catgaactcc tctggatcta ctggtctgcc taaagggtgc gctctgcctc	1500
atagaactgc ctgctgaga ttctcgcatg ccagagatcc tatttttggc aatcaaatca	1560
ttccggatac tgcgatttta agtgttgttc cattccatca cggttttgga atgtttacta	1620
cactcggata tttgatatgt ggatttcgag tcgtcttaat gtatagattt gaagaagagc	1680
tgtttctgag gagccttcag gattacaaga ttcaaagtgc gctgctggtg ccaaccctat	1740
tctccttctt cgccaaaagc actctgattg acaaatcga tttatctaatt ttacacgaaa	1800
ttgcttctgg tggcgctccc ctctctaagg aagtcgggga agcggttgcc aagaggttcc	1860
atctgccagg tatcaggcaa ggatatgggc tcactgagac tacatcagct attctgatta	1920
cacccgaggg ggatgataaa ccgggcgcgg tcggtaaagt tgttccattt tttgaagcga	1980
aggttgtgga tctggatacc gggaaaacgc tgggcgttaa tcaaagaggc gaactgtgtg	2040
tgagaggctc tatgattatg tccggttatg taaacaatcc ggaagcgacc aacgccttga	2100
ttgacaagga tggatggcta cattctggag acatagctta ctgggacgaa gacgaacact	2160
tcttcatcgt tgaccgcctg aagtctctga ttaagtacaa aggctatcag gtggctccccg	2220
ctgaattgga atccatcttg ctccaacacc ccaacatctt cgacgcagggt gtcgcaggtc	2280
ttcccagcga tgacgccggt gaacttcccc ccgccgttgt tgttttggag cacggaaaga	2340
cgatgacgga aaaagagatc gtggattacg tcgccagtca agtaacaacc gcgaaaaagt	2400

tgcgcgagg agttgtgttt gtggacgaag taccgaaagg tcttaccgga aaactcgacg	2460
caagaaaaat cagagagatc ctcataaagg ccaagaaggg cggaaagatc gccgtgtaat	2520
tctagagtcg gggcgggccg cgccttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg	2580
gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta	2640
ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc	2700
attttatgtt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct	2760
acaaatgtgg taaaatcgat aaggatccgt cgaccgatgc ccttgagagc cttcaaccca	2820
gtcagctcct tccggtgggc gcggggcatg actatcgctg ccgcacttat gactgtcttc	2880
tttatcatgc aactcgtagg acagggtgcc gcagcgctct tccgcttcct cgctcactga	2940
ctcgtgctgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat	3000
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	3060
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccc	3120
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata	3180
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgctg tctcctgttc cgaccctgcc	3240
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	3300
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgctcgtccc aagctgggct gtgtgcacga	3360
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	3420
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	3480
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	3540
aacagtatth ggtatctgct ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	3600
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca	3660
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	3720
cgctcagtg aacgaaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat	3780
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	3840
gtaaacttgg tctgacagtt agaaaaactc atcgagcatc aaatgaaact gcaatttatt	3900
catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagccgt ttctgtaatg aaggagaaaa	3960
ctcaccgagg cagttccata ggatggcaag atcctgggtat cggtctgcga ttccgactcg	4020
tccaacatca atacaacctt ttaatttccc ctctgcaaaa ataaggttat caagtgagaa	4080
atcaccatga gtgacgactg aatccgggtg gaatggcaaa agtttatgca tttctttcca	4140
gacttggtca acaggccagc cattacgctc gtcacaaaa tctctcgcat caaccaaac	4200
gttattcatt cgtgattgct cctgagcgag acgaaatacg cgatcgctgt taaaaggaca	4260
attacaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat caacaatatt	4320
ttcacctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct gttttcccg ggatcgag	4380
ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg gataaaatgc ttgatggctg gaagaggcat	4440

aaattccgtc agccagttta gtctgaccat ctcatctgta acatcattgg caacgctacc	4500
tttgccatgt ttcagaaaca actctggcgc atcgggcttc ccatacaatc gatagattgt	4560
cgcacctgat tgccccgacat tatcgcgagc ccatttatac ccataataat cagcatccat	4620
gttggaattt aatcgcggcc tagagcaaga cgtttcccg tgaatatggc tcatactctt	4680
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt	4740
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg gggtccgcgc acatttccc gaaaagtgcc	4800
acctgacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtggtgggta cgcgcagcgt	4860
gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttc gctttcttcc cttcctttct	4920
cgccacgttc gccggctttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccct taggggtccg	4980
atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat taggggatg gttcacgtag	5040
tgggcatcg ccctgataga cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa	5100
tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctc attcttttga	5160
tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa	5220
atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gcttacaatt tgccattcgc cattcaggct	5280
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtcg ggccctctcg ctattacgcc agcccaagct	5340
accatgataa gtaagtaata ttaagggtacg ggagggtactt ggagcggccg caataaaata	5400
tctttatttt cattacatct gtgtgttggt tttttgtgtg aatcgatagt actaacatac	5460
gctctccatc aaaacaaaac gaaacaaaac aaactagcaa aataggctgt ccccagtgca	5520
agtgcagggt ccagaacatt tctctatcga tactcgaggg ccatgcagggt aggatttgag	5580
ctgtgtttcc cgccctgac cttctctctc tggcgggccg agcctccgta ggctccaagc	5640
ctggcccaga ttcggcgggc cagccggcct tccgcgcgtc cgcacctagc gggggctccg	5700
gggctccggc gcggcaccgg ggggcgctcg ggatctggct gaggtccaa ggcccgctg	5760
gccggctcct cctgctgggg cagggtggcg ctgcgcgccc cgcccagacc caggggcccc	5820
ctcagccgca acaaccagca aggaccccc gactcagccc caagccacct gcattctcac	5880
tcagacgggg cgcaccgcga gtgcagctc ctgggtgggg gctgggagcc cgctgcccc	5940
tgctgcccc gagaccccag ctacagagca caggccgccc gggcacccca gaaaccggg	6000
atggggcccc tgaattctct aggacgggca ttcagcatgg ccttggcgct ctgcggctcc	6060
ctgcccccca ccagcctcg cccccgcga cccccagcc cctgcgaccg ccgccccccc	6120
ccccggggcc ccaggggccc agcccgacc ccccgcccc ctcttggctc ggggtgcggg	6180
ggcggggccg gggcgggggc agggctccgc gggcgcccat tggcggggc gcgaggccag	6240
cggccccgcg cggccctggg ccgcggctgg cgcgactata agagccgggc gtgggcgccc	6300
gcagttcgcc tgctctccg cggagctgc tgaggcccg cggccccg cccccctt	6360
ccggccgccc ccgctcctg gcccacgct gccgcgctc tgcccaccag cgctccatc	6420
gggcaaggcg gccccgcgtc gacaagctta gctacgctag cggcattccg gtactgttgg	6480

taaagccacc atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgct	6540
ggaagatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc	6600
tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgaggctggac atcacttacg ctgagtactt	6660
cgaaatgtcc gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag	6720
aatcgtcgtg tgcagtgaag actctcttca attctttatg ccggtggttg gcgcgttatt	6780
tatcggagtt gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag	6840
tatgggcatt tcgcagccta ccgtggtggt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt	6900
gaacgtgcaa aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga	6960
ttaccagggg tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa	7020
tgaatacgat tttgtgccag agtccttcga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa	7080
ctcctctgga tctactggtc tgcctaaagg tgcgctctg cctcatagaa ctgcctgcgt	7140
gagattctcg catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat	7200
tttaagtgtt gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat	7260
atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct	7320
tcaggattac aagattcaaa gtgcgctgct ggtgccaaacc ctattctcct tcttcgccaa	7380
aagcactctg attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc	7440
tccccctctt aaggaagtcg ggggaagcgg tgcgaagagg ttccatctgc caggtatcag	7500
gcaaggatat gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga	7560
taaaccgggc gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga	7620
taccgggaaa acgctgggcg ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtcctatgat	7680
tatgtccggt tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg	7740
gctacattct ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg	7800
cctgaagtct ctgattaagt acaaaggcta tcagggtggct cccgctgaat tggaatccat	7860
cttgctccaa caccccaaca tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttcccg acgatgacgc	7920
cgggtgaactt cccgccgccg ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga	7980
gatcgtggat tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt	8040
gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga	8100
gatcctcata aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taatctcgag acgtagggtg	8160
cc	8162

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 3579

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construcción recombinante

&lt;400&gt; 21

ctaaattgta agcggttaata ttttggttaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggctatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatacagt tttttggggt cgagggtgcc taaagcacta aatcgggaacc cttaaaggag	300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttccagt cacgacgtt	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccct	660
acgtctcgag ggatcccaa atctctgtag gtagtttgtc caattatgtc acaccacaga	720
agtaagggtt cttcacaag atcgctgac acgatttcct gcacaggctt gagccatata	780
ctcatacatc gcatcttggc cacgttttcc acgggtttca aaattaatct caagttctac	840
gcttaacgct ttcgcctgtt cccagttatt aatatattca acgctagaac tccccacgc	900
gaagggaaagg ctgagcacta cacgcgaagc accatcaccg aaccttttga taaactcttc	960
cgttccgact tgctccatca acggttcagt gagacttaaa cctaactctt tcttaatagt	1020
ttcggcatta tccactttta gtgcgagaac cttcgtcagt cctggatacg tcactttgac	1080
cacgcctcca gcttttccag agagcgggtt ttcattatct acagagtatc ccgcagcgtc	1140
gtattttattg tcggtactat aaaacccttt ccaatcatcg tcataatttc cttgtgtacc	1200
agattttggc ttttgtatac ctttttgaat ggaatctaca taaccagggt tagtcccgtg	1260
gtacgaagaa aagttttcca tcacaaaaga tttagaagaa tcaacaacat catcaggatc	1320
catggtggct ttaccaacag taccggaatg ccgctagcgt agctgcggcc gcgagctcca	1380
gcttttgttc ccttttagtga gggttaattg cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt	1440
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa	1500
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac	1560
tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	1620
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc	1680
gctcggctcg tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	1740
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	1800
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	1860
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagagggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc	1920
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg	1980
gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	2040



```

ggatatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 2100
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac 2160
acgacttatt gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 2220
gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat 2280
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat 2340
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 2400
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt 2460
ggaacgaaaa ctacggttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 2520
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 2580
ggctctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgagatc tgtctatttc 2640
gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 2700
catctggccc cagtgcctga atgataccgc gagaaccacg ctaccgggct ccagatttat 2760
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg 2820
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 2880
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta 2940
tggcttcatt cagctccggg tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 3000
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 3060
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 3120
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 3180
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgccgacat agcagaactt 3240
taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 3300
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 3360
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 3420
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca 3480
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 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;

10 &lt;223&gt; construcción recombinante

&lt;400&gt; 22

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

caaaacaaac tagcaaaata ggctgtcccc agtgcaagtg caggtgccag aacattttctc	240
tatcgataac ttccccggtcg gtctgtgggt gcaggggggtg ccgcctcaca tgtgtgattc	300
gtgccttgcg ggccctggcc tccgggggtgc tgggtaacga ggagggggcgc ggagccgcag	360
aagcccaccc tggatatgtg acgcggtgcc agcgagaccg cgagaggaag acgggggtgg	420
gcggggccag gatggagagg ggccgagttg gcaggagtca tggcagacgc cacattcgcg	480
acatctcccc cacacccccct ctggctctgt ccgcaacatt tccaaacagg agtcccggga	540
gagggggaga ggggctgctg gtctgaggct aagaaggga gagccttcga cccggagaga	600
ggccgcggcc cctgccaggt gggcagcgtg gaagtttcca tacaaggagg tgggaaggag	660
aaaaaaaaa cccttcaactg ccctgtgcag agatgagccg ggggtgcagg atgggagccc	720
atggcacttc gctacgggat ggtccagggc tcccggttgg ggggtgcagga gagaagagac	780
tggctgggag gagggagagg gcgggagcaa aggcgcgggg gagtggtcag caggagagg	840
ggtgggggggt agggtgagac ccgggctggg aggagtcggc tcacacataa aagctgaggc	900
actgaccagc ctgcaaactg gacattagct tctcctgtga aagagacttc cagcttcctc	960
ctcctcctct tctcctcct cctcctgcc cagcagacct tctgctgagc tgtaggggga	1020
tcttctagag tcggctagcg gcattccggt actgttggtg aagccaccat ggaagacgcc	1080
aaaaacataa agaaaggccc ggcgccattc tatccgctgg aagatggaac cgctggagag	1140
caactgcata aggttatgaa gagatacgcc ctggttcctg gaacaattgc tttacagat	1200
gcacatatcg aggtggacat cacttacgct gagtacttcg aaatgtccgt tcggttgga	1260
gaagctatga aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac	1320
tctcttcaat tctttatgcc ggtgttggg gcgttattta tcggagttgc agttgcgcc	1380
gcgaacgaca ttataatga acgtgaattg ctcaacagta tgggcatttc gcagcctacc	1440
gtggtgttcg ttccaaaaa ggggttgcaa aaaattttga acgtgcaaaa aaagctccca	1500
atcatccaaa aaattattat catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg	1560
tacacgttcg tcacatctca tctacctccc ggttttaatg aatacgattt tgtgccagag	1620
tccttcgata gggacaagac aattgcaact atcatgaact cctctggatc tactggtctg	1680
cctaaagggtg tcgctctgcc tcatagaact gcctgcgtga gattctcgca tgccagagat	1740
cctatttttg gcaatcaaat cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat	1800
cacggttttg gaatgtttac tacactcggg tatttgatat gtggatttcg agtcgtctta	1860
atgtatagat ttgaagaaga gctgtttctg aggagccttc aggattacaa gattcaaagt	1920
gcgctgctgg tgccaaccct attctccttc ttcgccaaaa gcaactctgat tgacaaatac	1980
gatttatcta atttacacga aattgcttct ggtggcgtc cctctctaa ggaagtcggg	2040
gaagcgggtg ccaagagggt ccatctgcca ggtatcaggc aaggatatgg gctcactgag	2100
actacatcag ctattctgat tacacccgag ggggatgata aaccgggcgc ggtcggtaaa	2160
gttgttccat ttttgaagc gaaggttgtg gatctggata ccgggaaaac gctgggcgtt	2220

aatcaaagag gcgaactgtg tgtgagaggt cctatgatta tgtccggtta tgtaaacaat	2280
ccggaagcga ccaacgcctt gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct	2340
tactgggacg aagacgaaca cttcttcacg gttgaccgcc tgaagtctct gattaagtac	2400
aaaggctatc aggtggctcc cgctgaattg gaatccatct tgctccaaca cccaacatc	2460
ttcgacgcag gtgtcgcagg tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgccgccgtt	2520
gttgtttttg agcacggaaa gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgccagt	2580
caagtaacaa ccgcgaaaaa gttgcgcgga ggagttgtgt ttgtggacga agtaccgaaa	2640
ggtcttaccg gaaaactcga cgcaagaaaa atcagagaga tcctcataaa ggccaagaag	2700
ggcggaaaga tcgccgtgta atctcgaggg ccatgcagggt aggatttgag ctgtgtttcc	2760
cgccctgacg ctctctcttc tggcgccgg agcctccgta ggctccaagc ctggcccaga	2820
ttcggcggcg cagccggcct tccgcgcgct cgacacctagc gggggctccg gggctccggc	2880
gcggcaccgg ggggcgctcg ggatctggct gaggctccaa gggccgcgtg gccggctcct	2940
cctgctgggg caggtggcgg ctgcgcgcc cgcccgagcc caggggcccc ctgagccga	3000
acaaccagca aggaccccc gactcagccc caagccacct gcattctgac tcagacgggg	3060
cgcacccgca gtgcagcctc ctggtggggc gctgggagcc cgcttcccc tgcttccccg	3120
gagacccag ctacagagca caggccgcc gggcaccaca gaaaccggg atggggcccc	3180
tgaattctct aggacgggca ttcagcatgg ccttggcgct ctgcggctcc ctgccccca	3240
cccagcctcg ccccgcgca cccccagcc cctgcgaccg ccgccccccc ccccggggcc	3300
ccagggcccc agcccgacc ccccgcccc ctcttggctc gggttgcggg ggcgggccgg	3360
gggcggggcg agggctccgc gggcgcccat tggcgcgggc gcgaggccag cggccccgcg	3420
cggccctggg ccgcggctgg cgcgactata agagccgggc gtgggcgcc gcagttcgcc	3480
tgtctctcgg cggagctgcg tgaggccccg ccggccccgg cccccccctt ccggccgcc	3540
ccgctcctg gccacgcct gccgcgctc tgcccaccag cgctccatc gggcaaggcg	3600
gccccgcgct gacaagcttg gcattccggt actgttggtg aagccaccat ggaagacgcc	3660
aaaaacataa agaaaggccc ggcgccattc tatccgctgg aagatggaac cgctggagag	3720
caactgcata aggtatgaa gagatacgcc ctggttctct gaacaattgc ttttacagat	3780
gcacatatcg aggtggacat cacttacgct gagtacttcg aaatgtccgt tcggttgga	3840
gaagctatga aacgatatgg gctgaataca aatcacagaa tcgtcgtatg cagtgaaaac	3900
tctcttcaat tctttatgcc ggtgttgggc gcgttattta tcggagttgc agttgcgcc	3960
gcgaacgaca ttataatga acgtgaattg ctcaacagta tgggcatttc gcagcctacc	4020
gtggtgttcg ttccaaaaa ggggttgcaa aaaatttga acgtgcaaaa aaagctccca	4080
atcatccaaa aaattattat catggattct aaaacggatt accagggatt tcagtcgatg	4140
tacacgttcg tcacatctca tctacctcc ggttttaatg aatacgattt tgtgccagag	4200
tccttcgata gggacaagac aattgcactg atcatgaact cctctggatc tactggtctg	4260

cctaaagggtg tgcgtctgcc tcatagaact gcctgcgtga gattctcgca tgccagagat	4320
cctattttttg gcaatcaa at cattccggat actgcgattt taagtgttgt tccattccat	4380
cacggttttg gaatgtttac tacactcgga tatttgatat gtggatttcg agtcgtctta	4440
atgtatagat ttgaagaaga gctgtttctg aggagccttc aggattacaa gattcaaagt	4500
gcgctgctgg tgccaaccct attctccttc ttcgccaaaa gcactctgat tgacaaatac	4560
gatttatcta atttacacga aattgcttct ggtggcgctc ccctctctaa ggaagtcggg	4620
gaagcggttg ccaagagggt ccatctgcca ggtatcaggc aaggatatgg gctcactgag	4680
actacatcag ctattctgat tacacccgag ggggatgata aaccgggctc ggtcggtaaa	4740
gttggttccat tttttgaagc gaagggtgtg gatctggata ccgggaaaac gctgggctgt	4800
aatcaaagag gcgaactgtg tgtgagaggc cctatgatta tgtccgggta tgtaaacaat	4860
ccggaagcga ccaacgcctt gattgacaag gatggatggc tacattctgg agacatagct	4920
tactgggacg aagacgaaca cttcttcctc gttgaccgcc tgaagtctct gattaagtac	4980
aaaggctatc aggtggctcc cgctgaattg gaatccatct tgctccaaca cccaacatc	5040
ttcgacgcag gtgtcgcagg tcttcccgac gatgacgccg gtgaacttcc cgccgccgtt	5100
gttggttttg agcacggaaa gacgatgacg gaaaaagaga tcgtggatta cgtcgccagt	5160
caagtaacaa ccgcgaaaaa gttgcgcgga ggagtttgtt ttgtggacga agtaccgaaa	5220
ggtcttaccg gaaaactcga cgcaagaaaa atcagagaga tcctcataaa ggccaagaag	5280
ggcggaaaga tcgccgtgta attctagagt cggggcgggc ggccgcttcg agcagacatg	5340
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt	5400
atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca	5460
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc agggggagggt gtgggagggt	5520
ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcg ataaggatcc gtcgaccgat	5580
gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc cttccgggtg gcgcggggca tgactatcgt	5640
cgccgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta ggacagggtg cggcagcgct	5700
cttcgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat	5760
cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	5820
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt	5880
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagagggt	5940
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc	6000
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa	6060
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct	6120
ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagccccg ccgctgcgcc ttatccggta	6180
actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg	6240
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc	6300

ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta	6360
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg	6420
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	6480
tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg	6540
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	6600
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttagaaaaac tcatcgagca	6660
tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc	6720
gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt	6780
atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa	6840
aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca	6900
aaagtttatg catttcttcc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa	6960
aatcactcgc atcaaccaa cggttattca ttcgtgattg cgcctgagcg agacgaaata	7020
cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca	7080
ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg	7140
ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcac atcaggagta cggataaaat	7200
gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg	7260
taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct	7320
tcccatataa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc attatcgca gccatttat	7380
acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cctagagcaa gacgtttccc	7440
gttgaatatg gctcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt	7500
gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc	7560
gcacatttcc ccgaaaagt ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg	7620
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt	7680
tcgctttctt cccttcctt ctcgccacgt tcgcccgtt tccccgtcaa gctctaaatc	7740
gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg	7800
attagggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga	7860
cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc	7920
ctatctcggc ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggttaa	7980
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgcttacaa	8040
tttgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg gcgatc	8086

<210> 23  
 <211> 3843  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> construcción recombinante

<400> 23

ctaaattgta agcgtaata ttttgtaaa attcgcgta aatttttggt aaatcagctc	60
attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
gatagggttg agtggtgttc cagtttgga caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggctatggc ccactacgtg aaccatcacc	240
ctaatacaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaagggag	300
ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
cacaccgccc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480
caactgttgg gaagggcgat cgggtgcggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg	540
gggatgtgct gcaaggcgat taagtgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg	600
taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta tagggcgaat tgggtaccct	660
acgtctcgag gtagctgcta gccgactcta gaagatcccc ctacagctca gcagaaggct	720
cgctggggca ggaggaggag gaggaagagg aggaggagga agctggaagt ctctttcaca	780
ggagaagcta atgtccagtt tgcaggctgg tcagtgcctc agcttttatg tgtgagccga	840
ctctcccag cccgggctcc accctacccc ccacccctct ccctgctgac cactcccccg	900
cgcttttgct cccgccctct ccctcctccc agccagctctc ttctctctg ccccccaac	960
cgggagccct ggaccatccc gtagcgaagt gccatgggct cccatcctgc accccggct	1020
catctctgca cagggcagtg aagggggggg ggggtctcct tcccacctcc ttgtatggaa	1080
acttcacgc tgcccactgg gcagggggcg cgccctctct ccgggtcgaa ggctctgccc	1140
ttcttagcct cagaccagca gcccctctcc ccctctcccg ggactcctgt ttggaaatgt	1200
tgcgacaga gccagagggg gtgtggggga gatgtcgca atgtggcgct tgccatgact	1260
cctgccaaact cggccctct ccctcctggc cccgcccacc cccgtcttc tctcgggtc	1320
tcgctggcac cgcgtcaaca taccagggtg ggcttctgcg gctccgcgc cctcctcgtt	1380
accagcacc ccggaggcca gggcccgcaa ggcacgaatc acacatgtga ggcggcacc	1440
cctgcacca cagaccgacc ggaagttat cgatagagaa atgttctggc acctgcactt	1500
gcactgggga cagcctattt tgctagtttg ttttgtttcg ttttgtttg atggagagcg	1560
tatgttagta ctatcgattc acacaaaaa ccaacacaca gatgtaatga aaataaagat	1620
attttattgc ggccgcgagc tccagctttt gttcccttta gtgagggtta attgcgcgt	1680
tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac	1740
acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg tgcctaata gtgagctaac	1800
tcacattaat tgcgttgccg tccactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc	1860
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttcg	1920
cttcctcgt cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc	1980



actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt	2040
gagcaaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc	2100
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa	2160
acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc	2220
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg	2280
cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcggt cgctccaagc	2340
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc	2400
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca	2460
ggattagcag agcgaggat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact	2520
acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg	2580
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt	2640
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct	2700
tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga	2760
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa	2820
tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac	2880
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	2940
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagaac	3000
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca	3060
gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta	3120
gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg	3180
tgggtgcacg ctcgctggtt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc	3240
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg	3300
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt	3360
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac tcaaccaagt	3420
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata	3480
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc	3540
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac	3600
ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa	3660
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	3720
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat	3780
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc	3840
cac	3843

<210> 24  
 <211> 6084  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción recombinante

5

<400> 24

gcggccgcaa taaaatatct ttattttcat tacatctgtg tgttggtttt ttgtgtgaat	60
cgatagtact aacatacgtc ctccatcaaa acaaaacgaa acaaaacaaa ctagcaaaat	120
aggctgtccc cagtgaagt gcaggtgcca gaacatttct ctatcgataa cttcccgtc	180
ggctctgtggg tgcaggggggt gccgcctcac atgtgtgatt cgtgccttgc gggccctggc	240
ctccgggggtg ctgggtaacg aggagggggcg cggagccgca gaagcccacc ctggtatggt	300
gacgcggtgc cagcgagacc gcgagaggaa gacgggggtg ggcggggcca ggatggagag	360
gggccgagtt ggcaggagtc atggcagacg ccacattcgc gacatctccc ccacaccccc	420
tctggctctg tccgcaacat ttccaaacag gagtcccggg agagggggag aggggctgct	480
ggctctgaggc taagaagggc agagccttcg acccgagag aggccgcggc ccctgcccag	540
tgggcagcgt ggaagtttcc atacaaggag gtgggaagga gacccccccc ccccttact	600
gccctgtgca gagatgagcc ggggggtgcag gatgggagcc catggcactt cgctacggga	660
tgggtccaggg ctcccgggtg ggggtgcagg agagaagaga ctggctggga ggaggagag	720
ggcgggagca aaggcgcggg ggagtggcga gcaggagag ggggtggggg taggggtgag	780
cccgggctgg gaggagtcgg ctcacacata aaagctgagg cactgaccag cctgcaaact	840
ggacattagc ttctcctgtg aaagagactt ccagcttctt cctcctcctc ttctcctcc	900
tcctcctgcc ccagcgagcc ttctgctgag ctgtaggggg atcttctaga gtcggctagc	960
ggcattccgg tactgttggg aaagccacca tggatcctga tgatgttgtt gattcttcta	1020
aatcttttgt gatggaaaac ttttcttcgt accacgggac taaacctggt tatgtagatt	1080
ccattcaaaa aggtatacaa aagccaaaat ctggtacaca aggaaattat gacgatgatt	1140
ggaaagggtt ttatagtacc gacaataaat acgacgtgc gggatactct gtagataatg	1200
aaaaccgcgt ctctggaaaa gctggaggcg tggtaaagt gacgtatcca ggactgacga	1260
aggttctcgc actaaaagtg gataatgccg aaactattaa gaaagagtta ggtttaagtc	1320
tcactgaacc gttgatggag caagtcggaa cggaagagtt tatcaaaagg ttcggtgatg	1380
gtgcttcgcg tgtagtgtc agccttcctt tcgctgaggg gagttctagc gttgaatata	1440
ttaataactg ggaacaggcg aaagcgtaa gcgtagaact tgagattaat tttgaaacct	1500
gtggaaaacg tggccaagat gcgatgtatg agtatatggc tcaagcctgt gcaggaaatc	1560
gtgtcaggcg atctttgtga aggaacctta cttctgtggg gtgacataat tggacaaact	1620
acctacagag atttggggat ccctcgaggg ccatgcaggt aggatttgag ctgtgtttcc	1680
cgccctgatc ctctctcctc tggcggccgg agcctccgta ggctccaagc ctggcccaga	1740
ttcggcggcg cagccggcct tccgcgcgtc cgcacctagc gggggctccg gggctccggc	1800
gcggcaccgg ggggcgctcg ggatctggct gaggtccaa ggcccgcgtg gccggctcct	1860

cctgctgggg	caggtggcgg	ctgcgcgccc	cgcccagacc	caggggcccc	ctcagccgca	1920
acaaccagca	aggaccccc	gactcagccc	caagccacct	gcatctgcac	tcagacgggg	1980
cgcacccgca	gtgcagcctc	ctggtggggc	gctgggagcc	cgcttgcccc	tgcctgcccc	2040
gagaccccag	ctcacgagca	caggccgccc	gggcacccca	gaaacccggg	atggggcccc	2100
tgaattctct	aggacgggca	ttcagcatgg	ccttggcgct	ctgcggctcc	ctgcccccca	2160
cccagcctcg	ccccgcgca	ccccccagcc	cctgcgaccg	ccgccccccc	ccccggggcc	2220
ccagggcccc	agcccgaccc	ccccgccccg	ctcttggtct	gggttgcggg	ggcgggcccg	2280
gggcgggggc	agggtccgc	gggcgcccac	tggcgggggc	gcgaggccag	cggccccgcg	2340
cggccctggg	ccgcggctgg	cgcgactata	agagccgggc	gtgggcgccc	gcagttcgcc	2400
tgctctccgg	cggagctgcg	tgaggccccg	ccggccccgg	cccccccctt	ccggccgccc	2460
ccgcctcctg	gcccacgcct	gcccgcgctc	tgcccaccag	cgcctccatc	gggcaaggcg	2520
gccccgcgtc	gacaagcttg	gcattccggt	actgttggtg	aagccaccat	ggatcctgat	2580
gatgttggtg	attcttctaa	atcttttggg	atggaaaact	tttcttcgta	ccacgggact	2640
aaacctgggt	atgtagattc	cattcaaaaa	ggtatacaaa	agccaaaatc	tggtacacaa	2700
ggaaattatg	acgatgattg	gaaagggttt	tatagtaccg	acaataaata	cgacgctgcg	2760
ggatactctg	tagataatga	aaaccgcgtc	tctggaaaag	ctggaggcgt	ggtcaaagtg	2820
acgtatccag	gactgacgaa	ggttctcgca	ctaaaagtgg	ataatgccga	aactattaag	2880
aaagagttag	gtttaagtct	cactgaaccg	ttgatggagc	aagtcggaac	ggaagagttt	2940
atcaaaagggt	tcggtgatgg	tgcttcgctg	gtagtgtcca	gccttccttt	cgctgagggg	3000
agttctagcg	ttgaatatat	taataactgg	gaacaggcga	aagcgtaag	cgtagaactt	3060
gagattaatt	ttgaaacccg	tggaaaacgt	ggccaagatg	cgatgtatga	gtatatggct	3120
caagcctgtg	caggaaatcg	tgtcaggcga	tctttgtgaa	ggaaccttac	ttctgtgggtg	3180
tgacataatt	ggacaaacta	cctacagaga	tttggggatc	ctctagagtc	ggggcgggccg	3240
gccgcttcga	gcagacatga	taagatacat	tgatgagttt	ggacaaacca	caactagaat	3300
gcagtgaaaa	aaatgcttta	tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	ttgtaaccat	3360
tataagctgc	aataaacaag	ttaacaacaa	caattgcatt	cattttatgt	ttcaggttca	3420
gggggaggtg	tgggaggttt	tttaaagcaa	gtaaaacctc	tacaaatgtg	gtaaaatcga	3480
taaggatccg	tcgaccgatg	cccttgagag	ccttcaaccc	agtcagctcc	ttccgggtggg	3540
cgcggggcat	gactatcgtc	gccgcactta	tgactgtctt	ctttatcatg	caactcgtag	3600
gacaggtgcc	ggcagcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	3660
cggctgcggc	gagcggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	3720
ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	3780
aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	3840
cgacgctcaa	gtcagaggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	3900

cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt cgcaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc	3960
gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt	4020
tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcac	4080
cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg	4140
ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca	4200
gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatcttgc	4260
gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggtg gctcttgatc cggcaaaaaa	4320
accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa	4380
ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac	4440
tcacgttaag ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta	4500
aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt	4560
tagaaaaact catcgagcat caaatgaaac tgcaatttat tcatatcagg attatcaata	4620
ccatattttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa actcaccgag gcagttccat	4680
aggatggcaa gatcctggta tcggtctgcg attccgactc gtccaacatc aatacaacct	4740
attaatttcc cctcgtcaaa aataagggtt tcaagtgaga aatcaccatg agtgacgact	4800
gaatccggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc agacttggtc aacaggccag	4860
ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac cgttattcat tcgtgattgc	4920
gcctgagcga gacgaaatac gcgatcgtg ttaaaaggac aattacaaac aggaatcgaa	4980
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat tttcacctga atcaggatat	5040
tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgcag tggtgagtaa ccatgcatca	5100
tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca taaattccgt cagccagttt	5160
agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac	5220
aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg tcgcacctga ttgcccgcac	5280
ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca tgttggaatt taatcgcggc	5340
ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcatactct tcccttttca atattattga	5400
agcatttate agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat	5460
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgc gccctgtagc	5520
ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgggtggt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc	5580
gccctagcgc ccgctcctt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt	5640
ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttaggggttc gatttagtgc tttacggcac	5700
ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtgat ggttcacgta gtgggcatc gccctgatag	5760
acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa	5820
actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgccg	5880
atttcggcct attgggttaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac	5940

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

## REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico, que comprende:

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 de IGF-II seleccionada de las secuencias P4 de IGF-II y P3 de IGF-II, o que comprende:

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

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:

la secuencia reguladora de la transcripción específica de H19 es un promotor cuya secuencia es SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2; la secuencia reguladora de la transcripción P4 de IGF-II es una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 13; y la secuencia P3 de IGF-II es SEC ID N°: 17 o se selecciona de SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 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 N°: 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.

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.

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.

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 transcrito dirigido por el promotor de H19, un transcrito dirigido por el promotor P3 de IGF-II o un transcrito dirigido por el promotor P4 de IGF-II.

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.

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.

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.

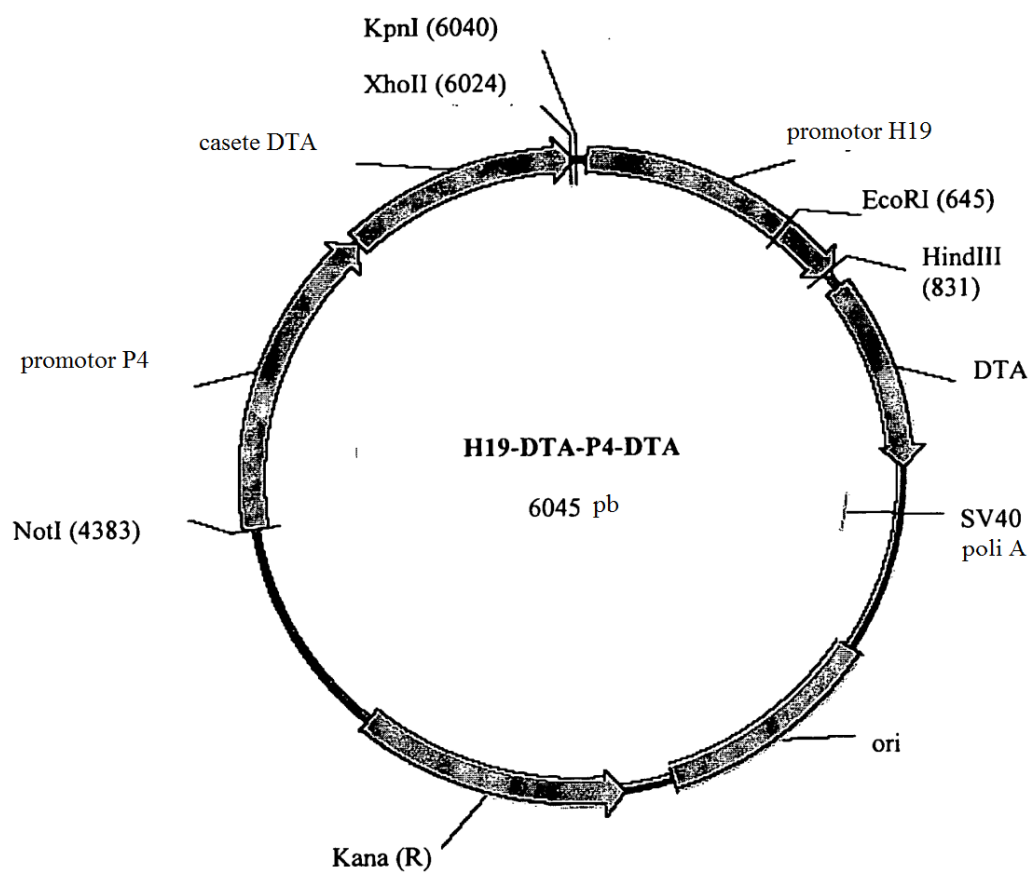
13. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7 para uso en el tratamiento de un tumor, inhibición de la progresión tumoral o inhibición de la metástasis tumoral en un sujeto humano que lo necesite, en la que una célula de dicho tumor es capaz de expresar un transcrito dirigido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

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.

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**

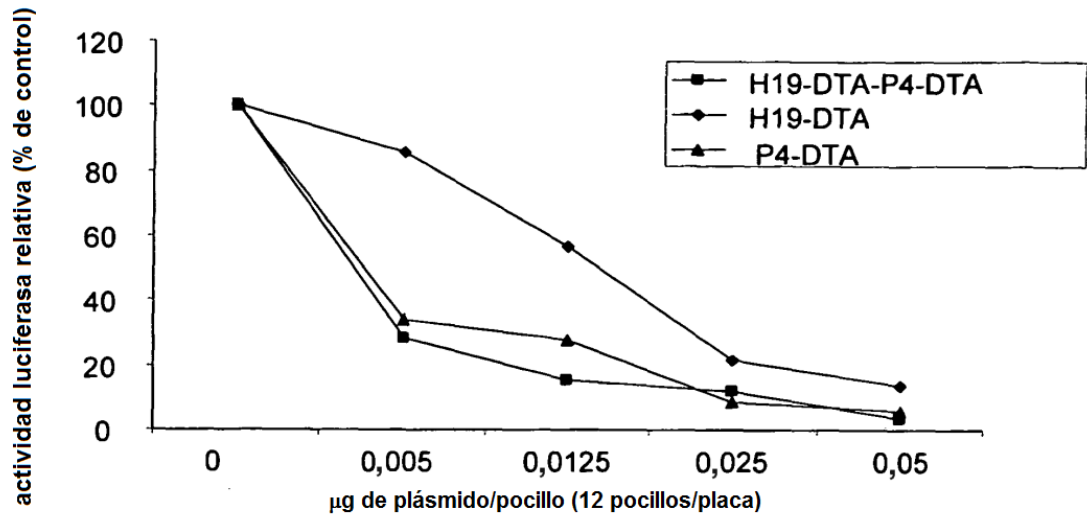


Figura 2A

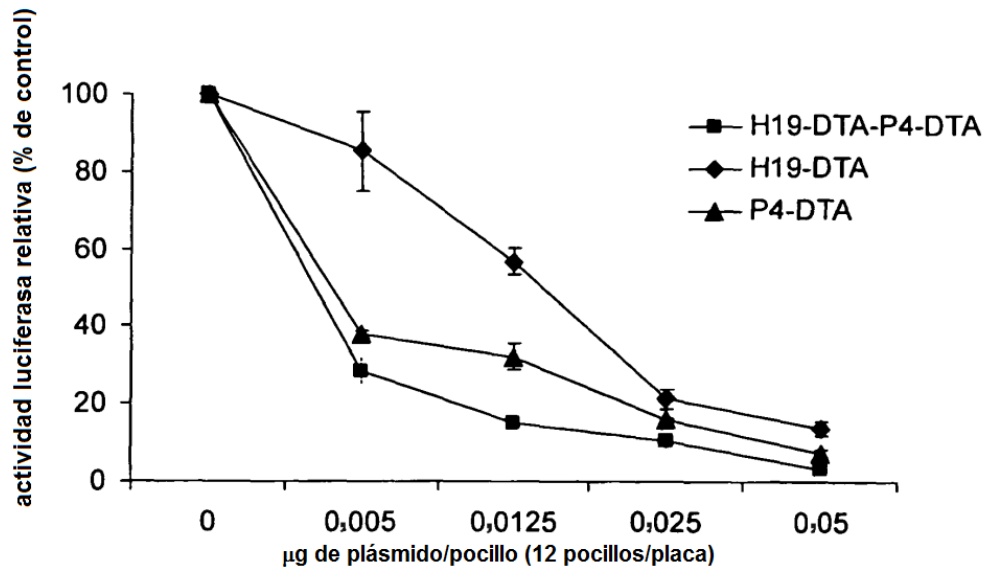
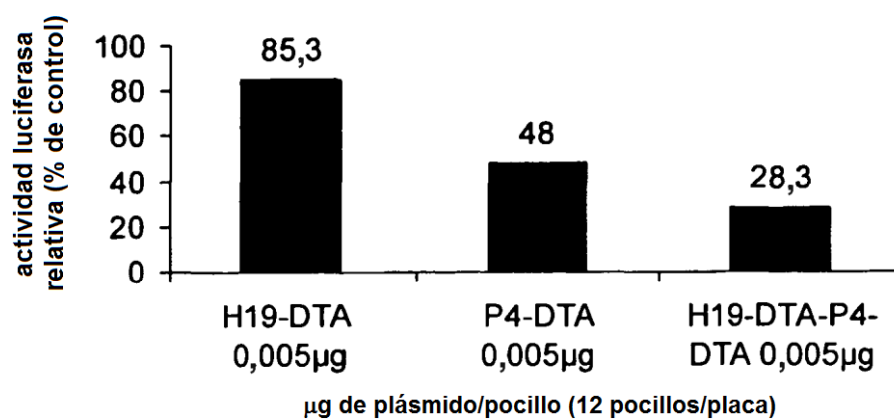


Figura 2B

**Figura 2C**

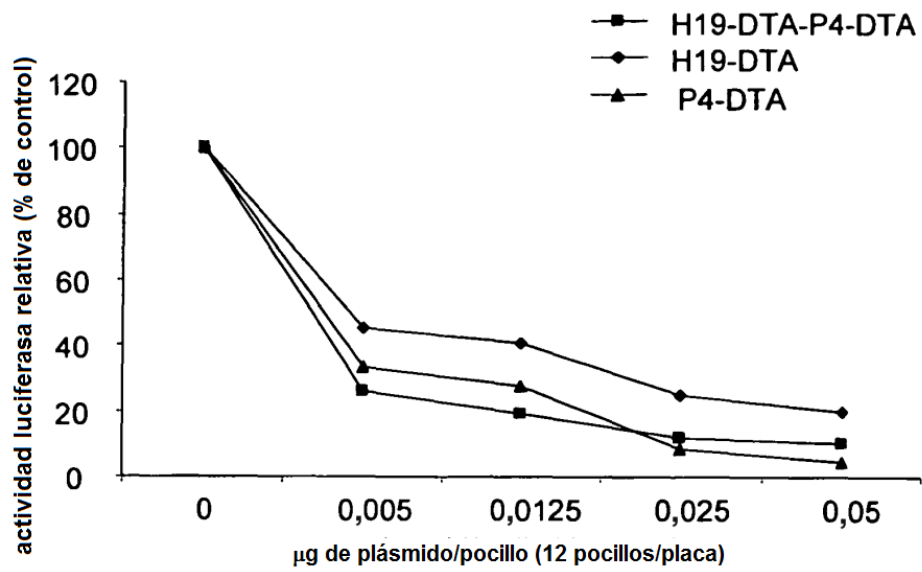


Figura 3A

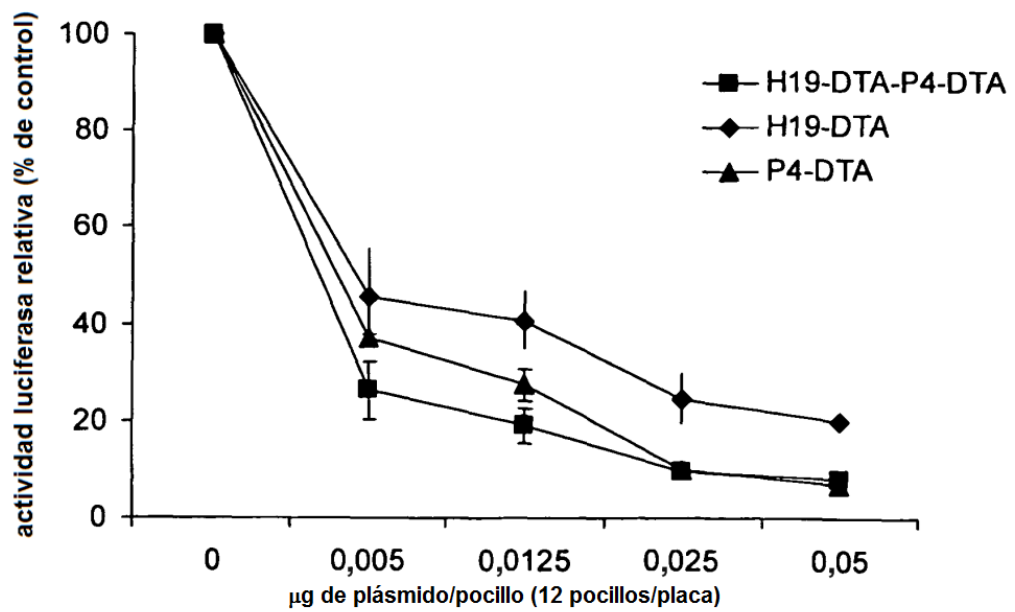
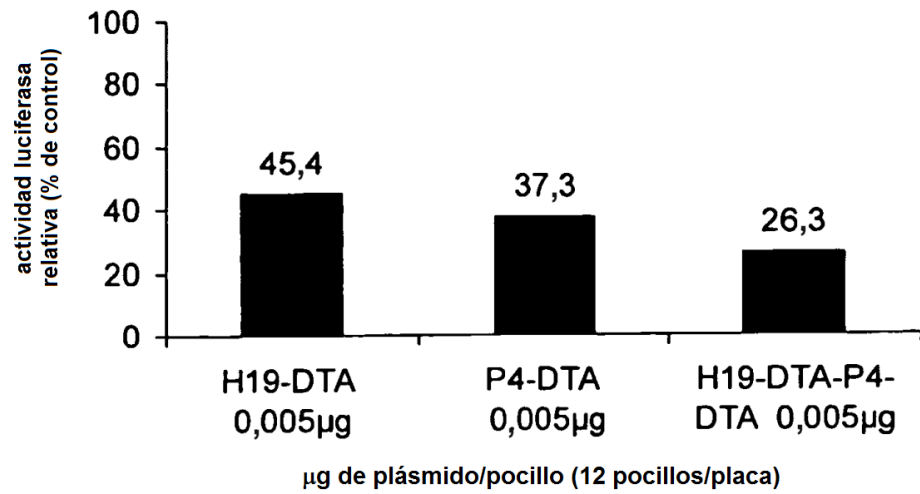
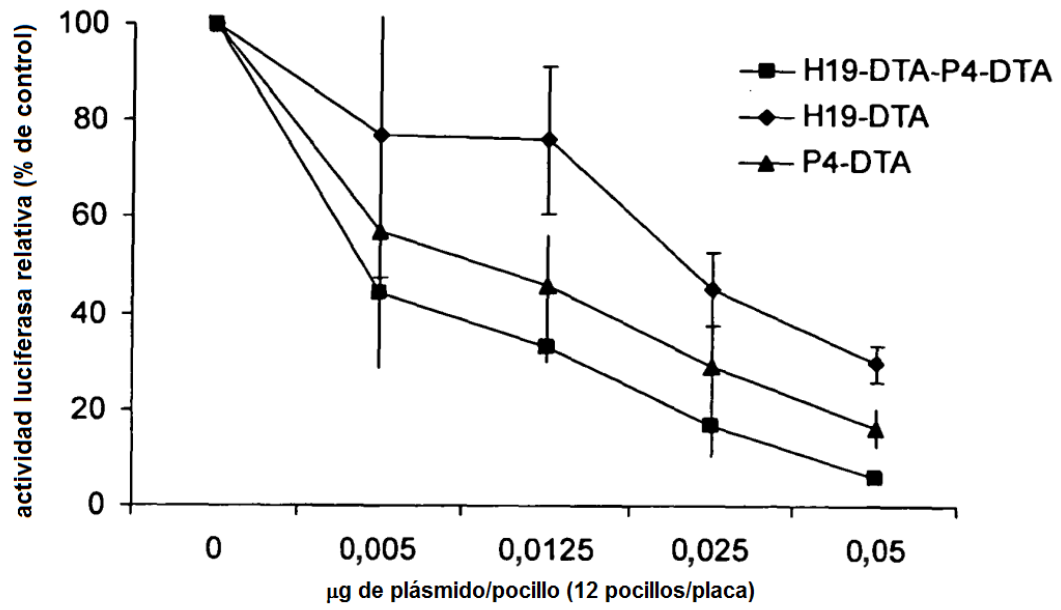


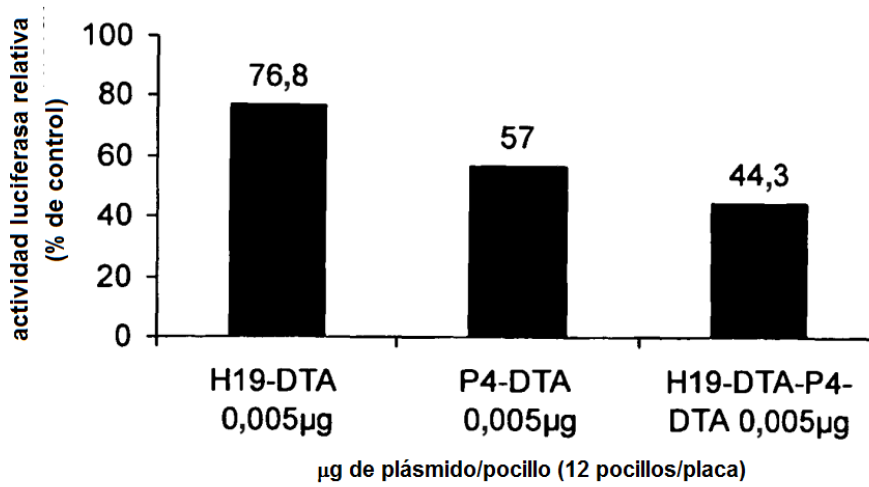
Figura 3B



**Figura 3C**



**Figura 4A**



**Figura 4B**

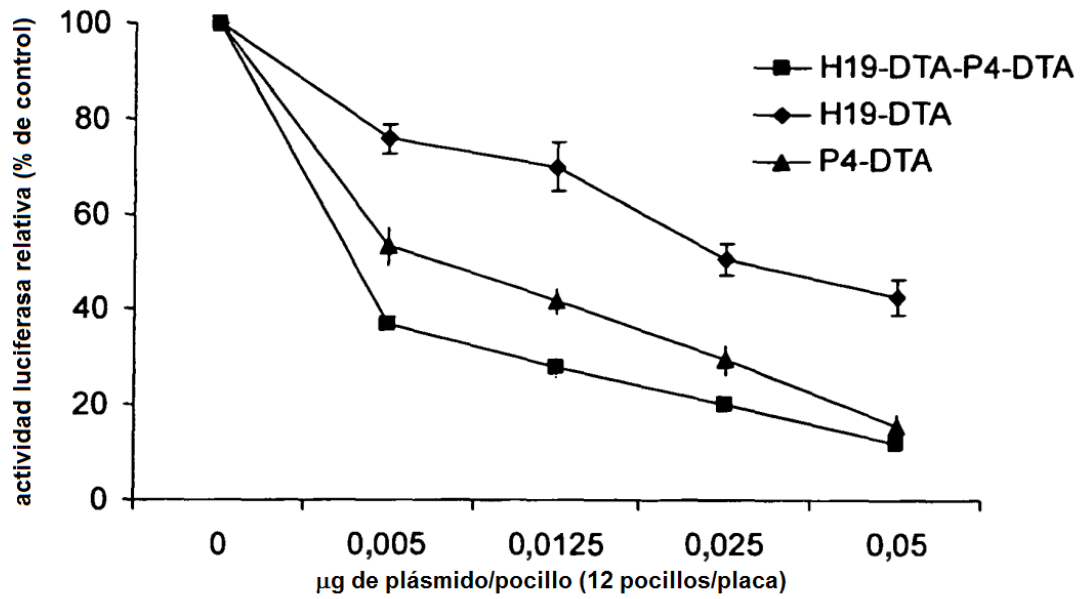


Figura 5A

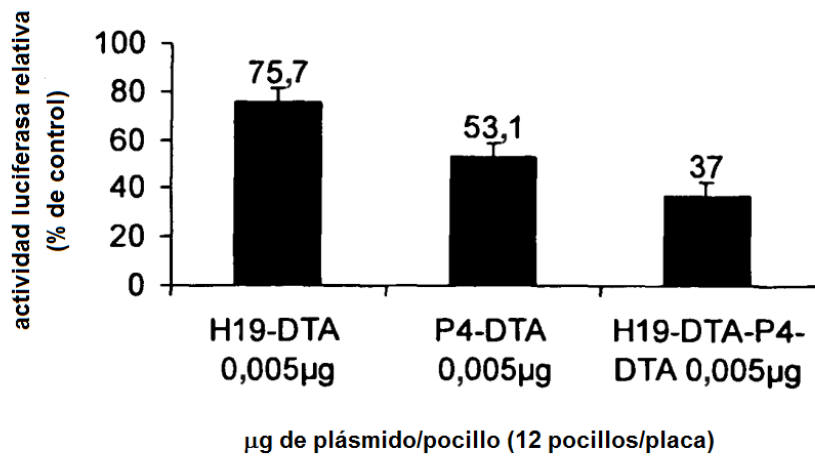


Figura 5B

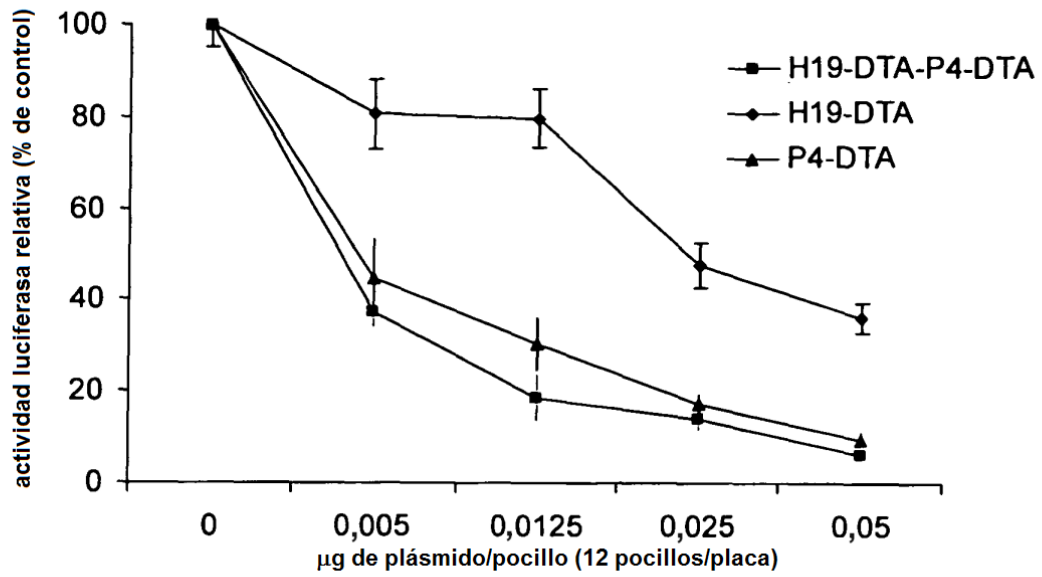


Figura 6A

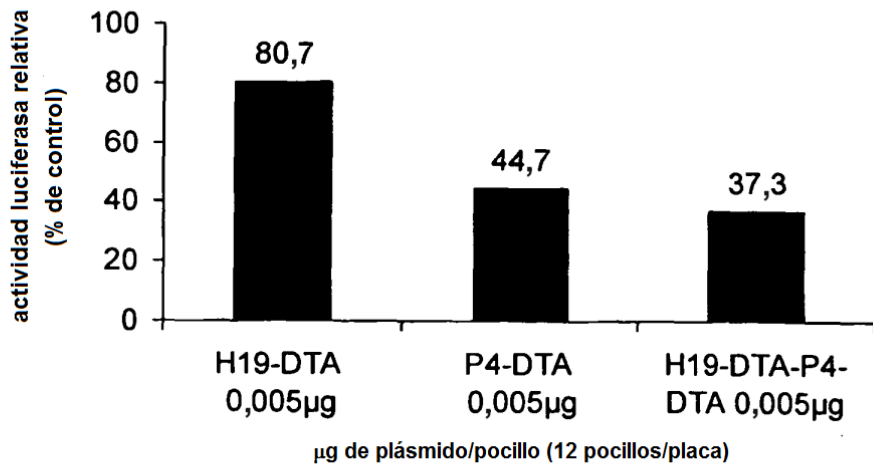


Figura 6B



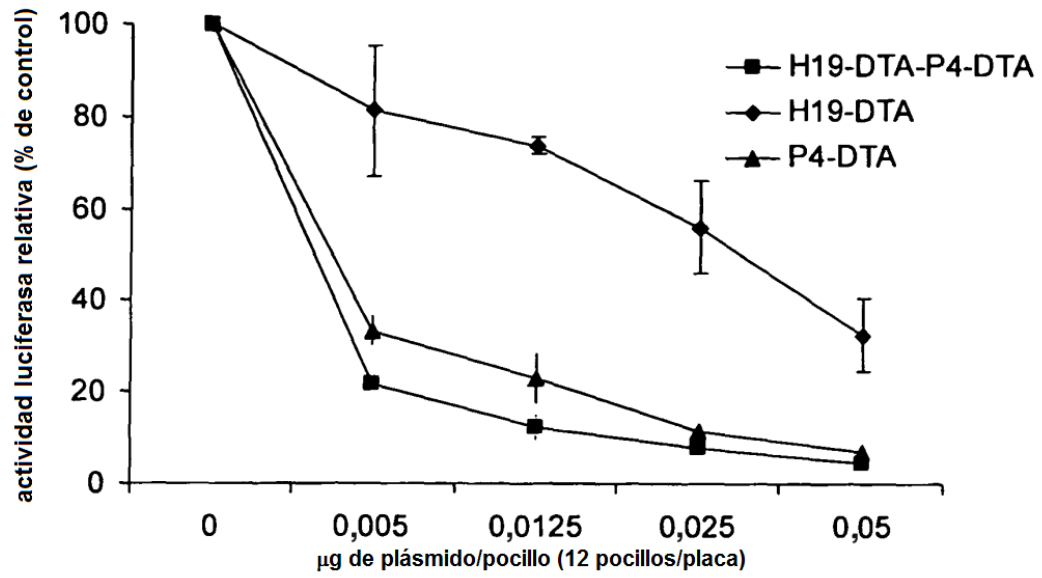


Figura 7A

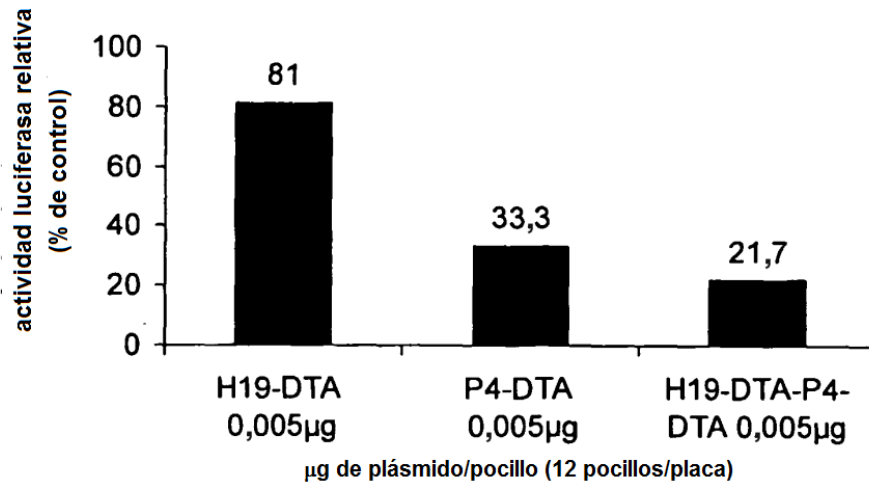
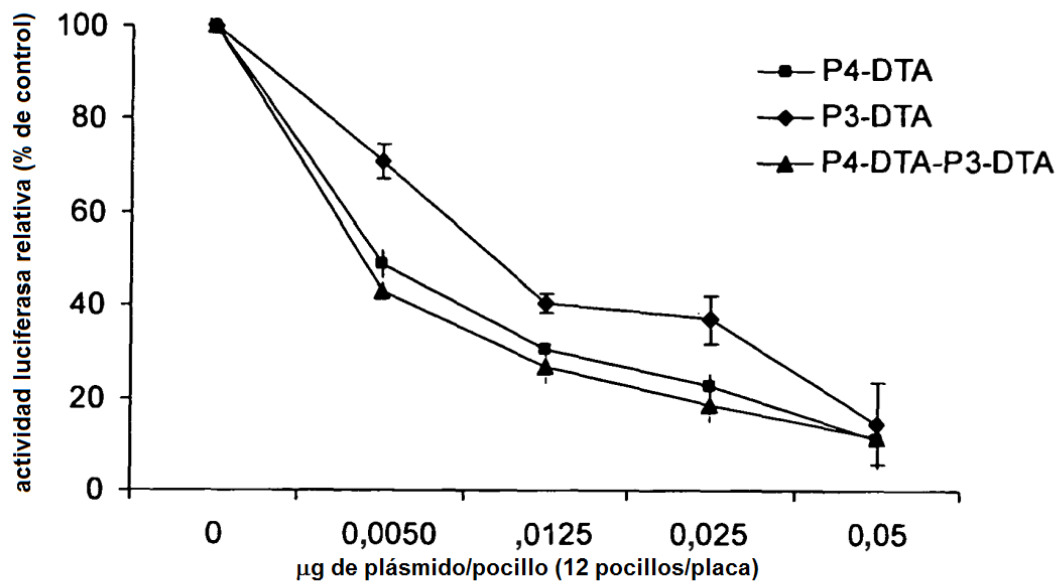
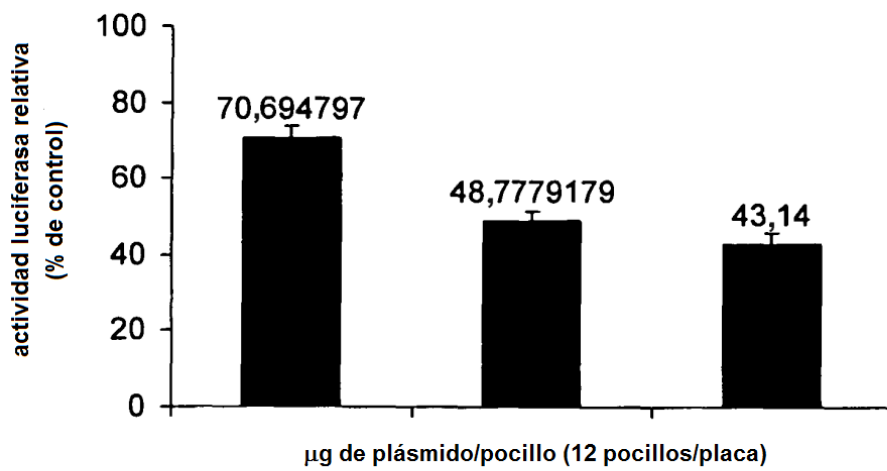


Figura 7B



**Figura 8A**



**Figura 8B**

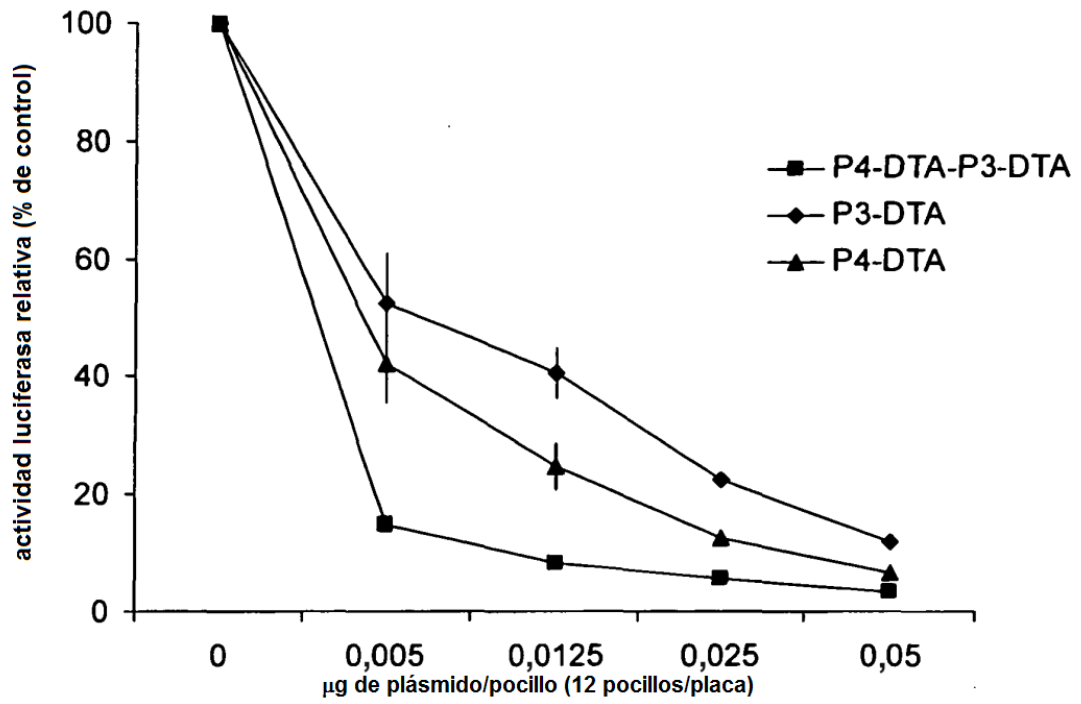


Figura 9A

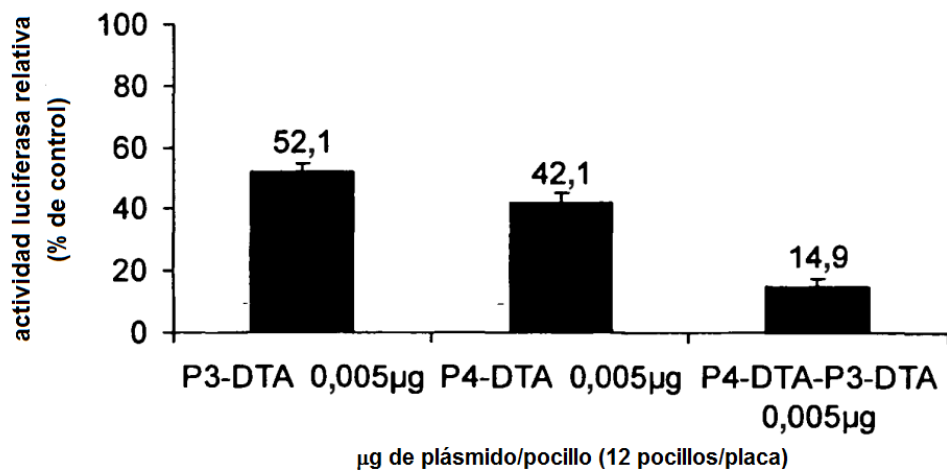


Figura 9B

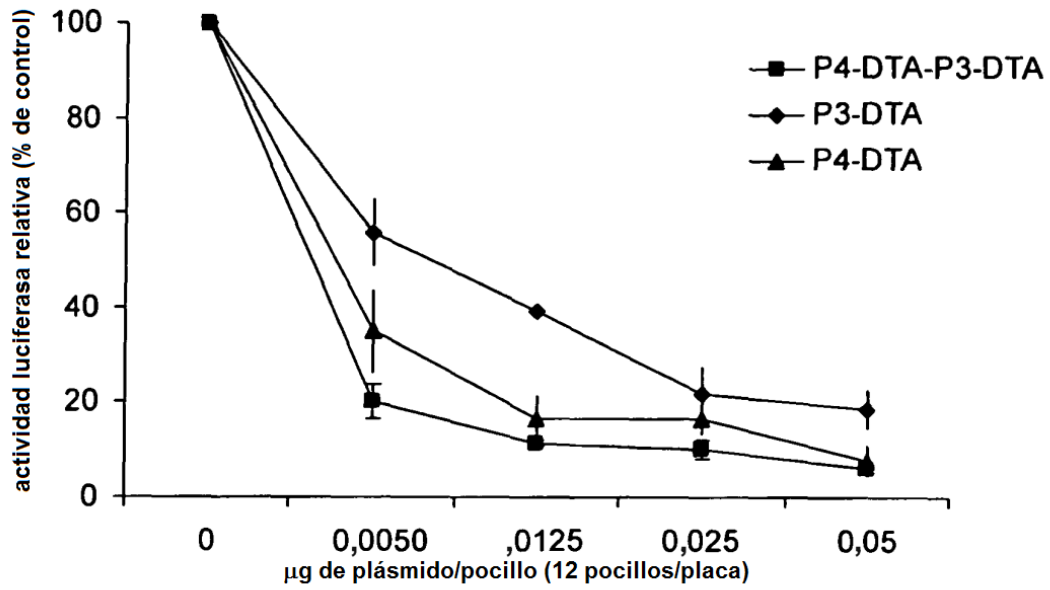


Figura 10A

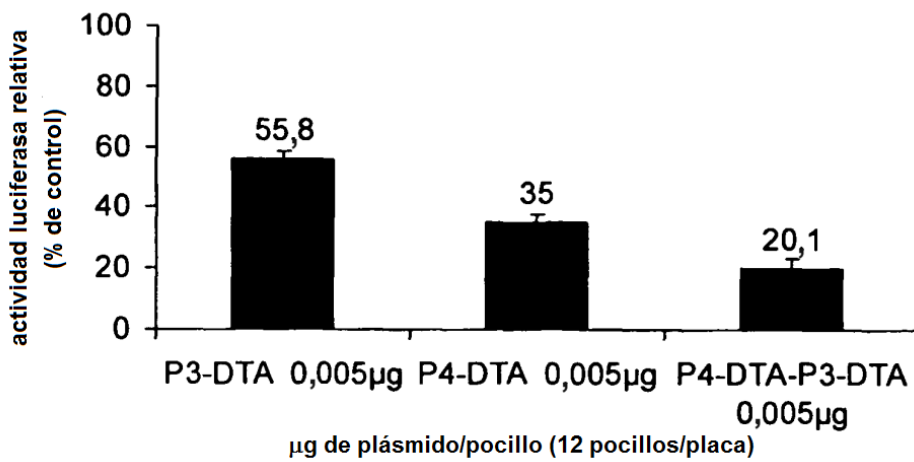
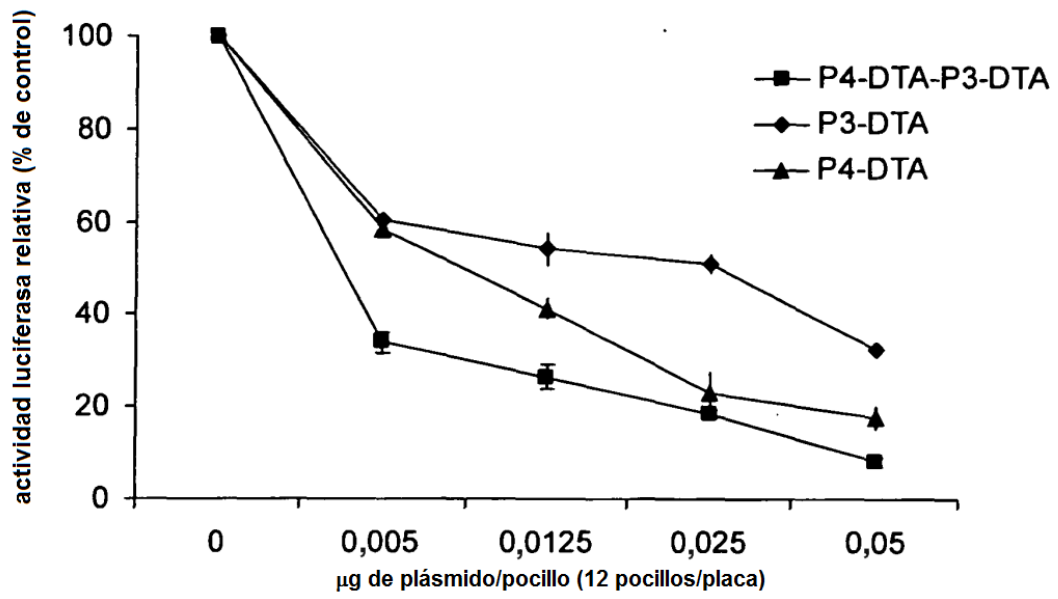
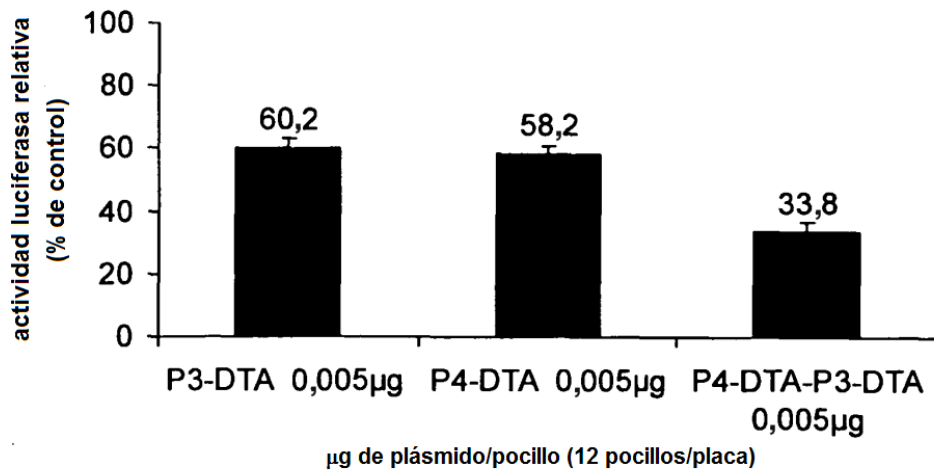


Figura 10B



**Figura 11A**



**Figura 11B**

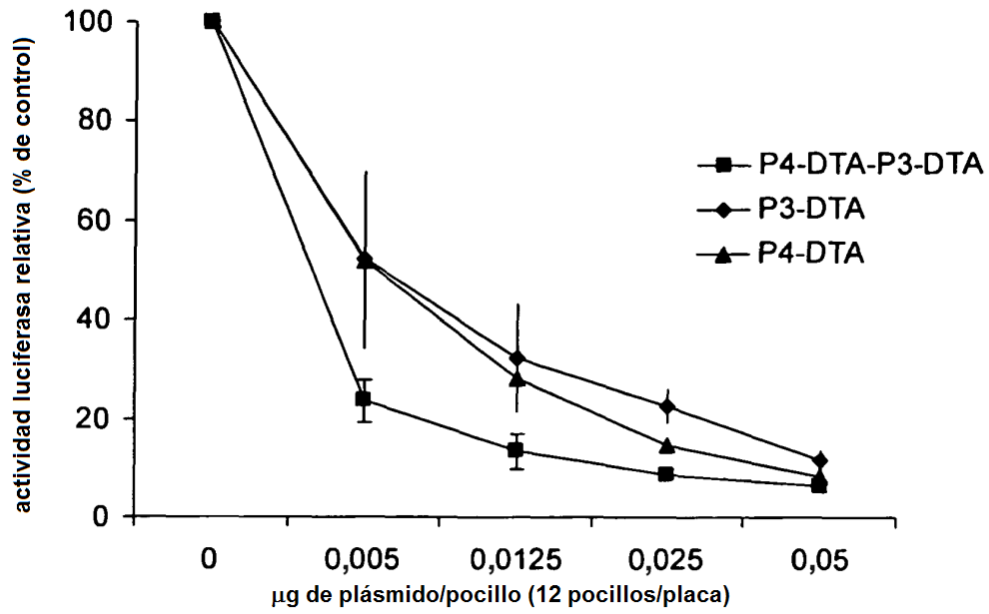


Figura 12A

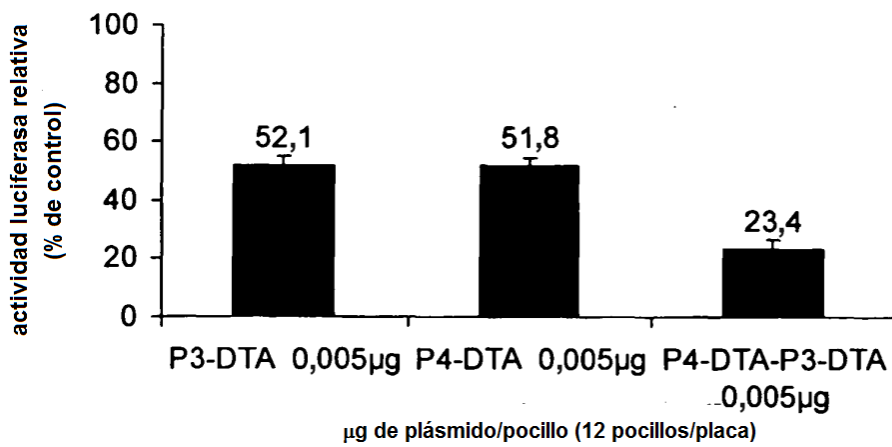


Figura 12B

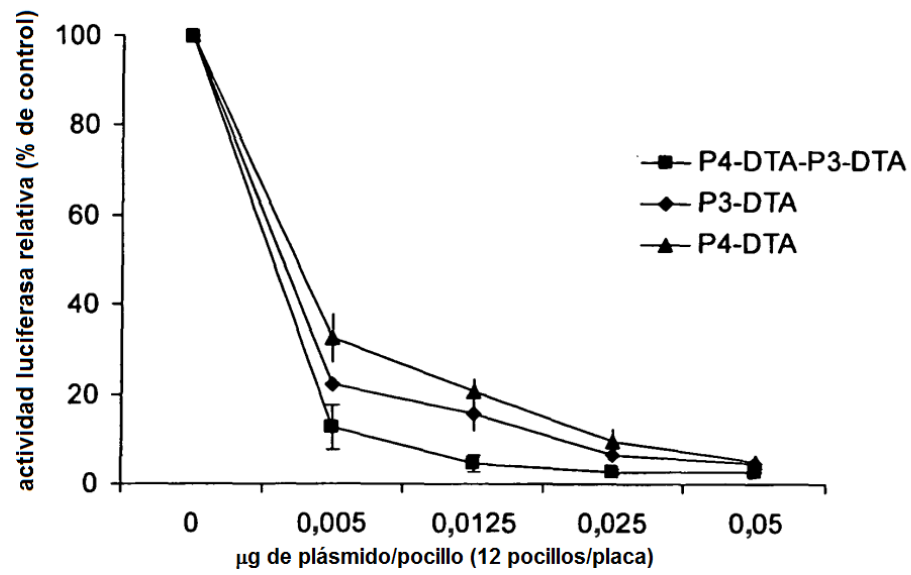


Figura 13A

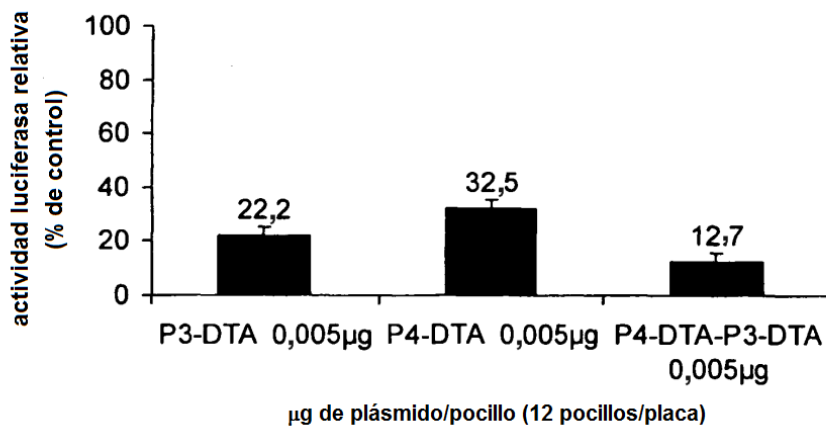
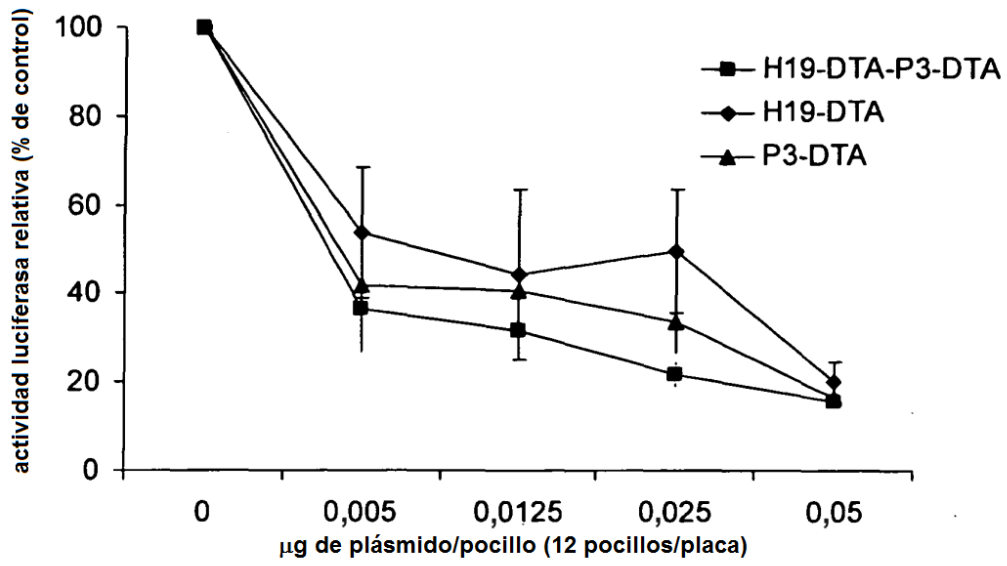
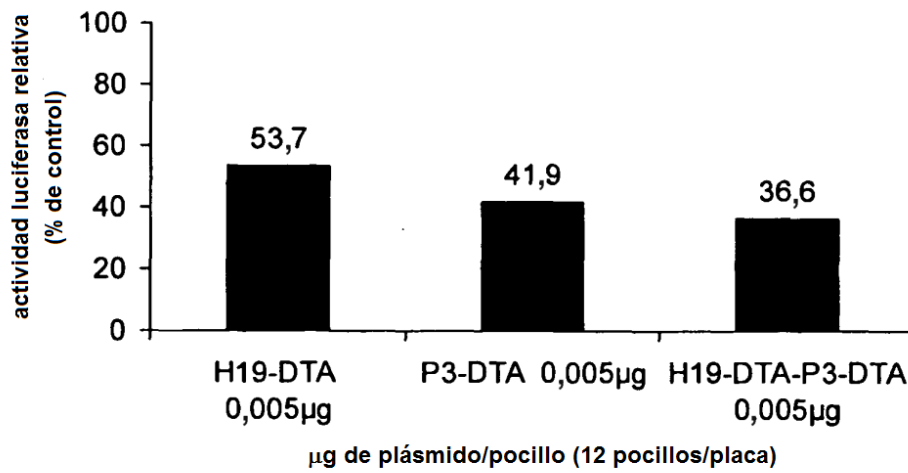


Figura 13B

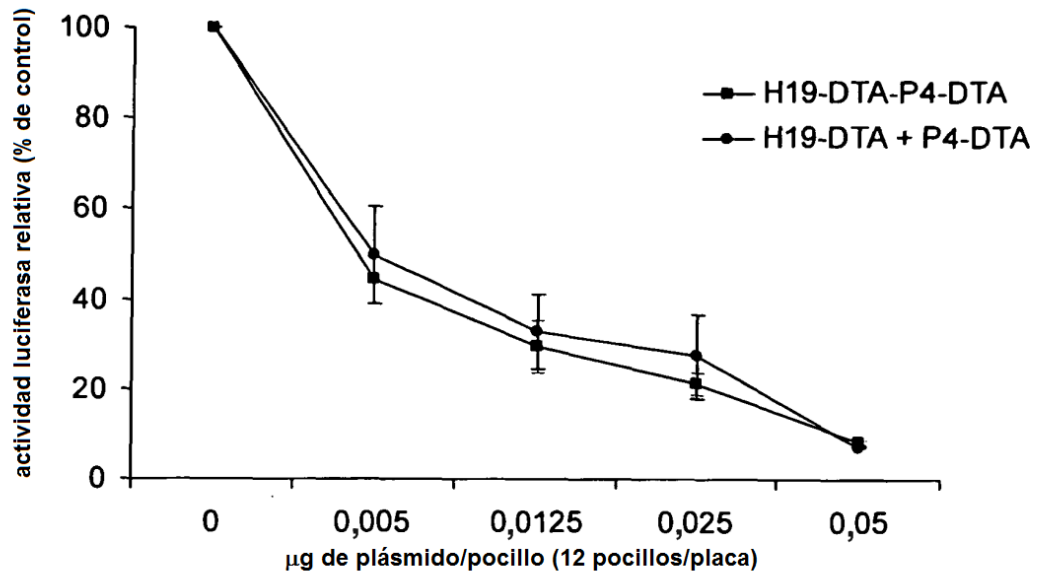


**Figura 14A**

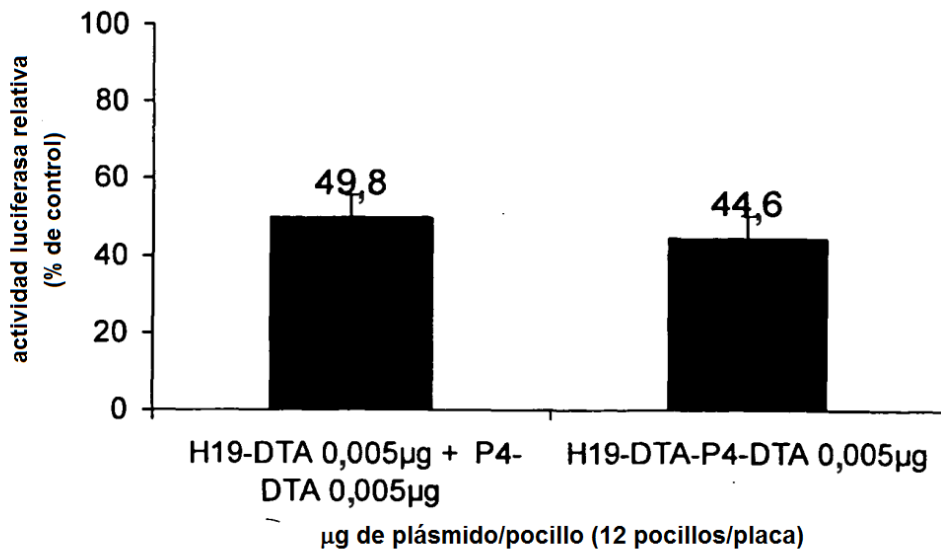


**Figura 14B**





**Figura 15A**



**Figura 15B**

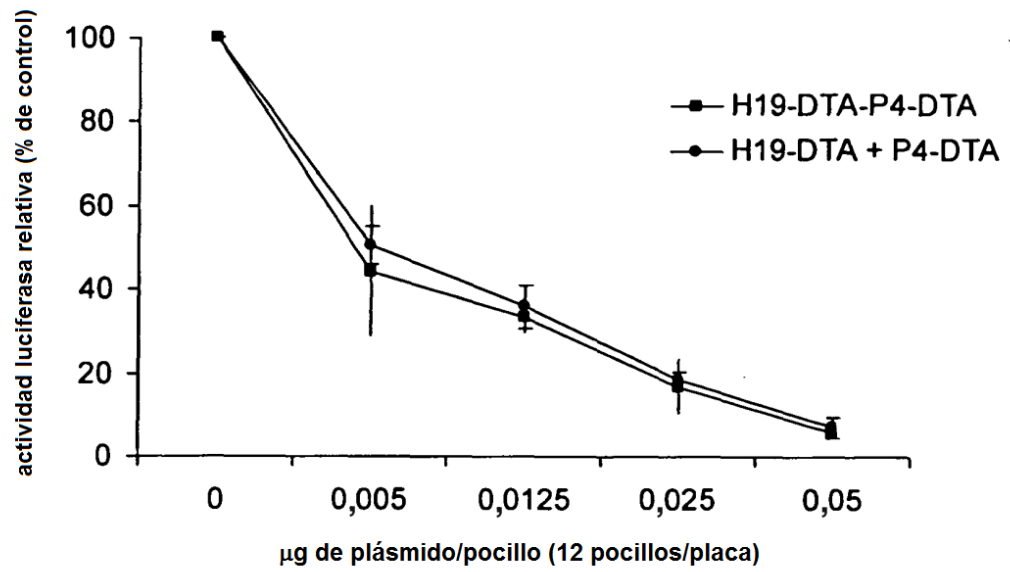


Figura 16A

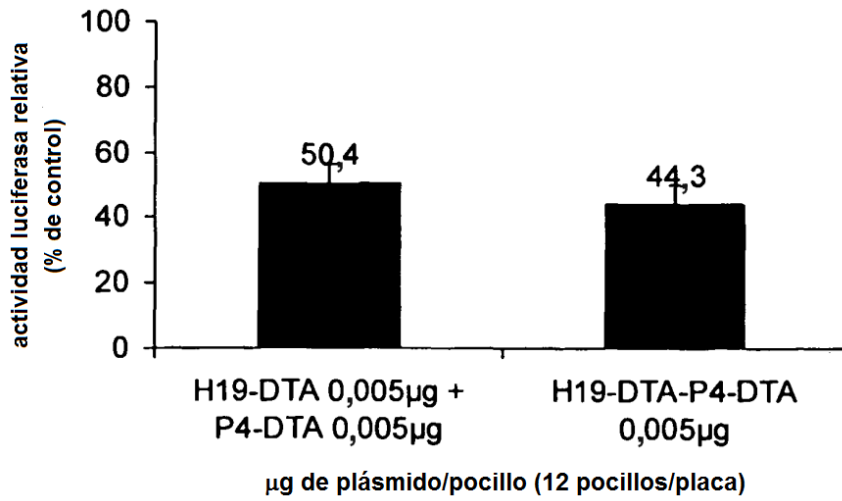
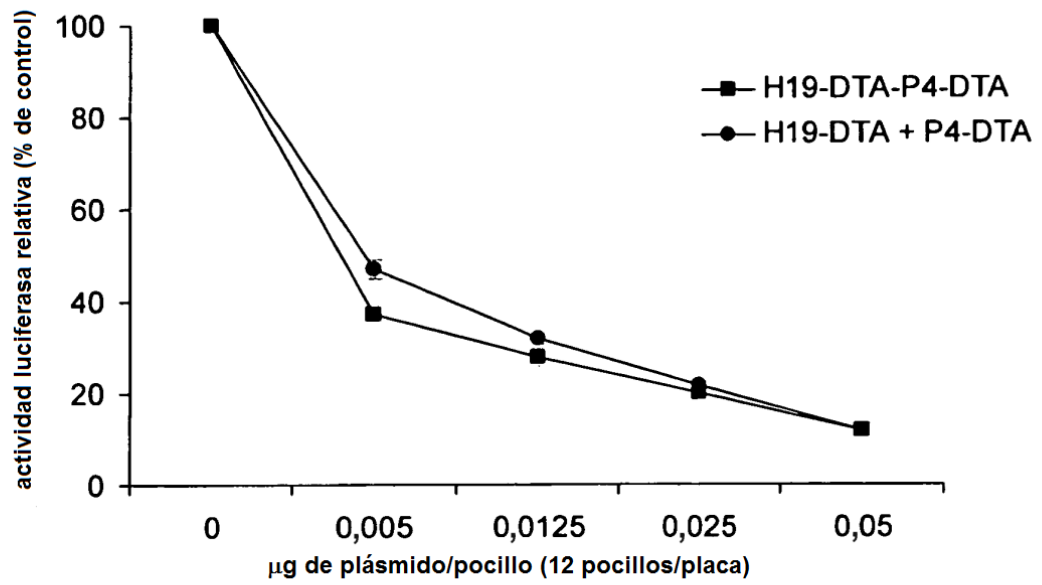
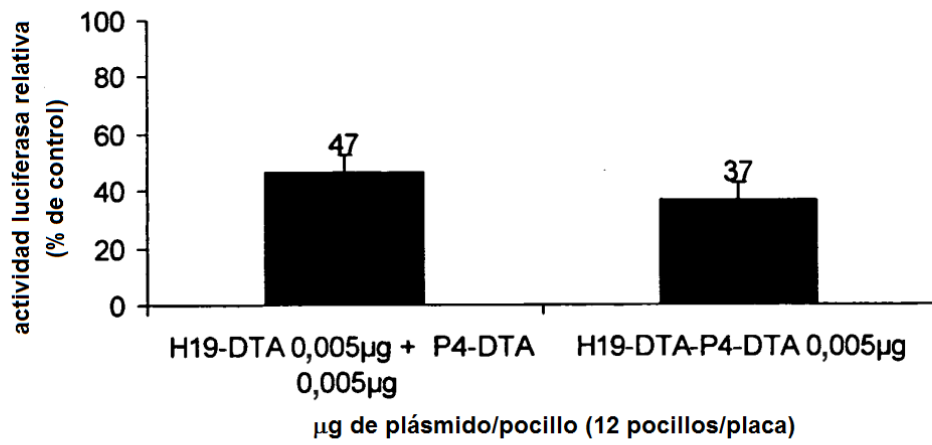


Figura 16B



**Figura 17A**



**Figura 17B**

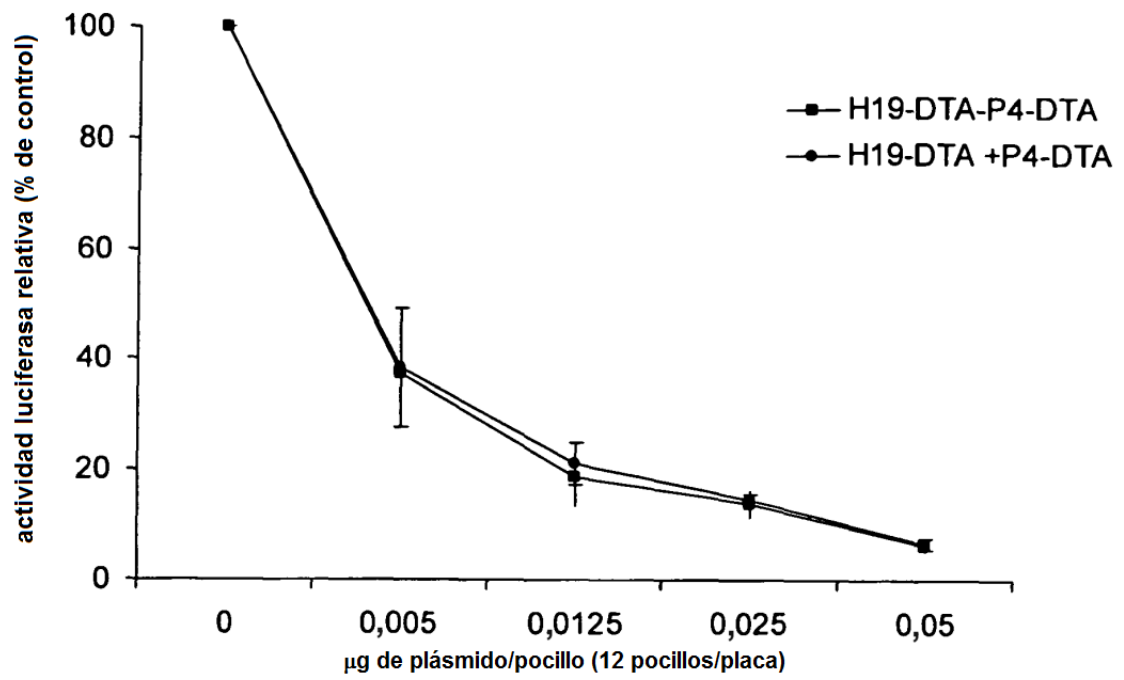


Figura 18A

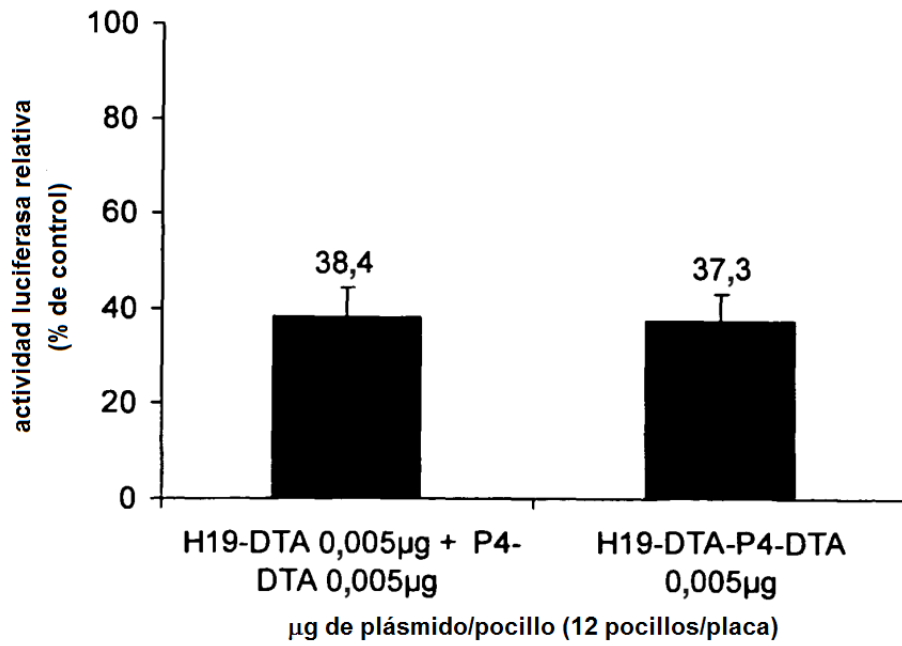
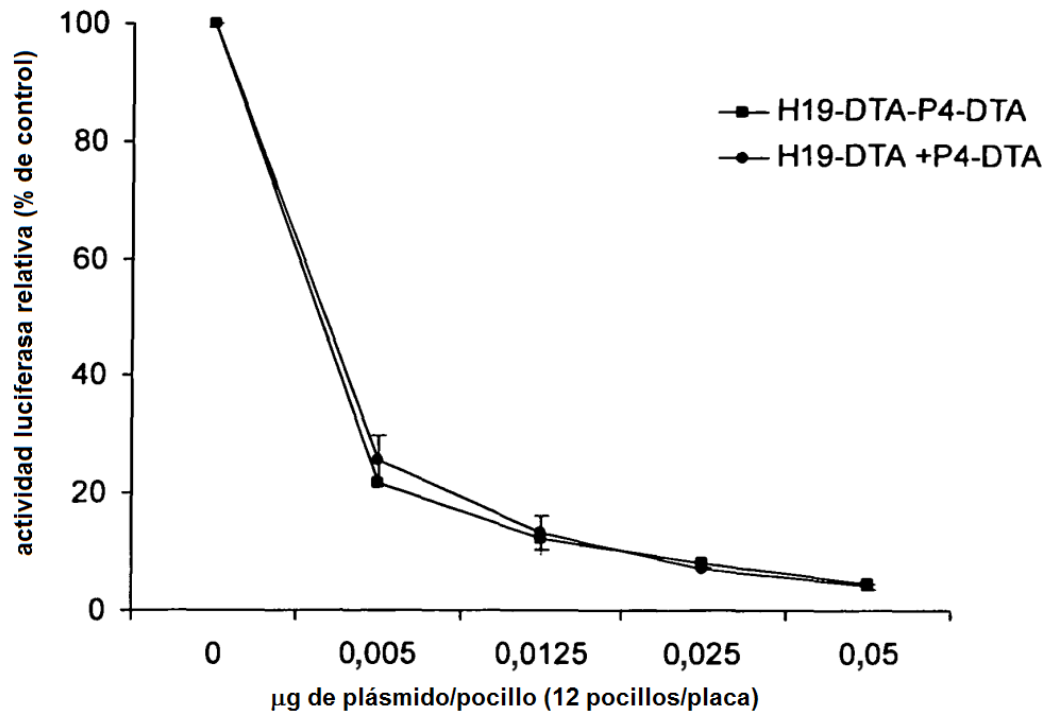
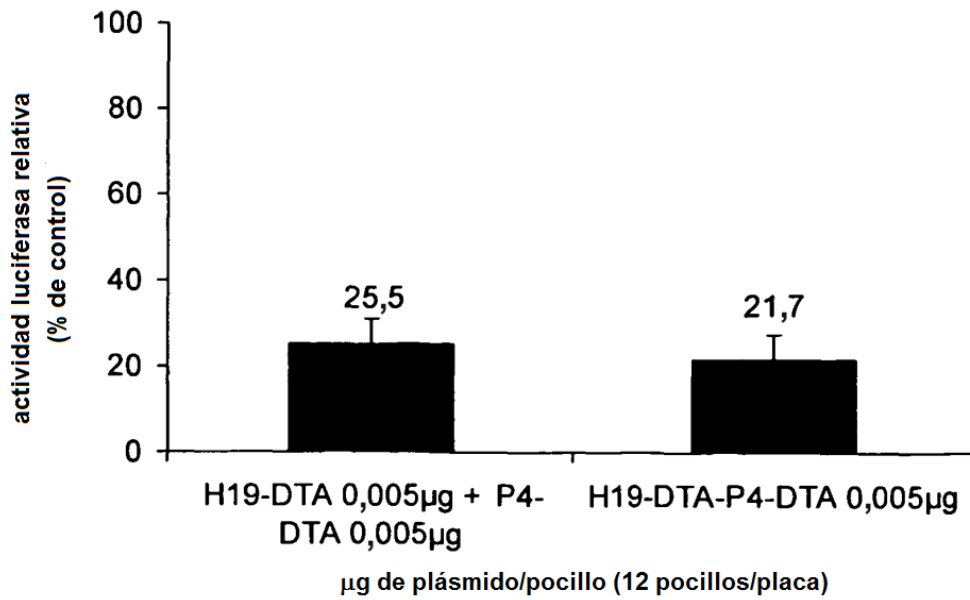


Figura 18B



**Figura 19A**



**Figura 19B**

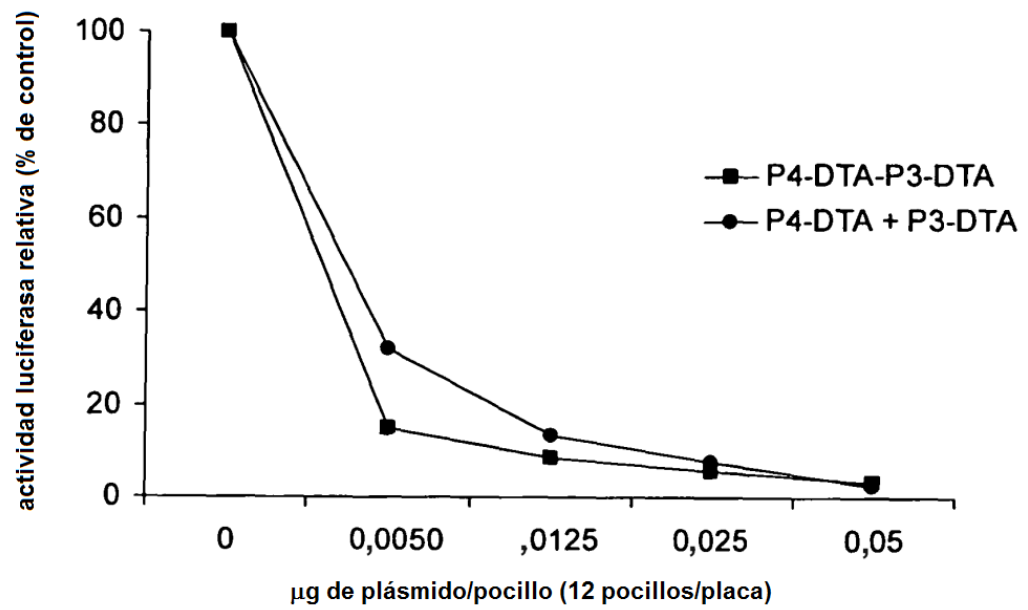


Figura 20A

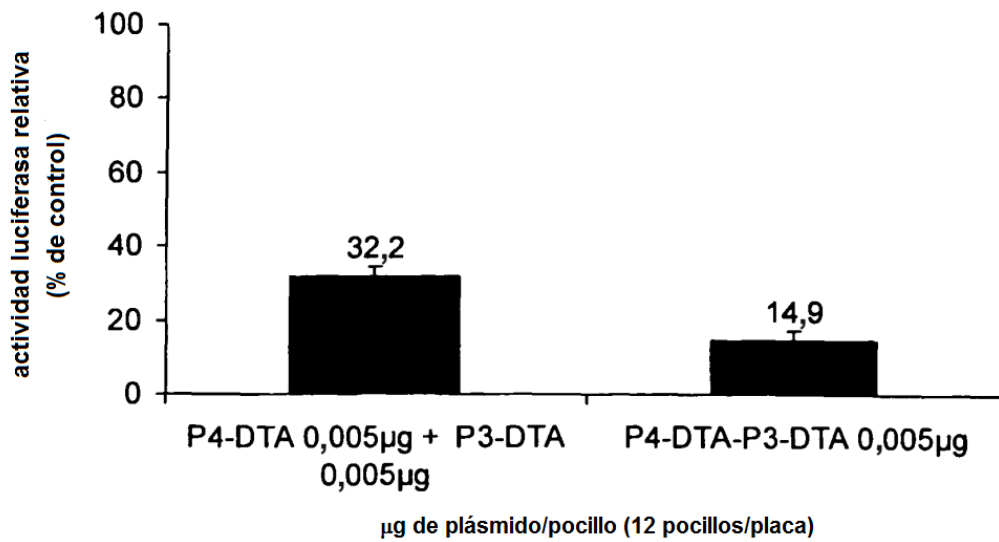
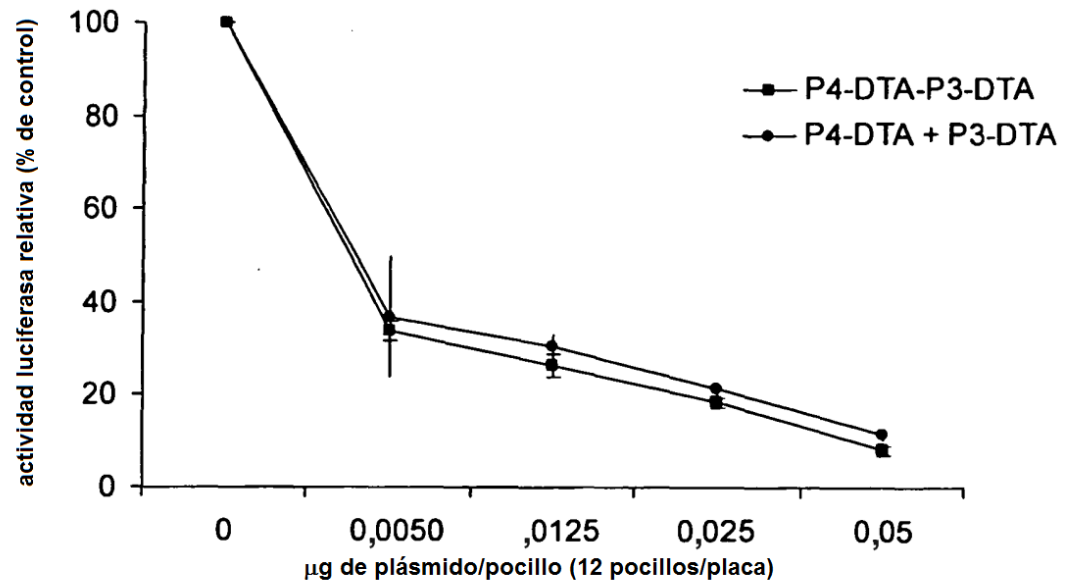
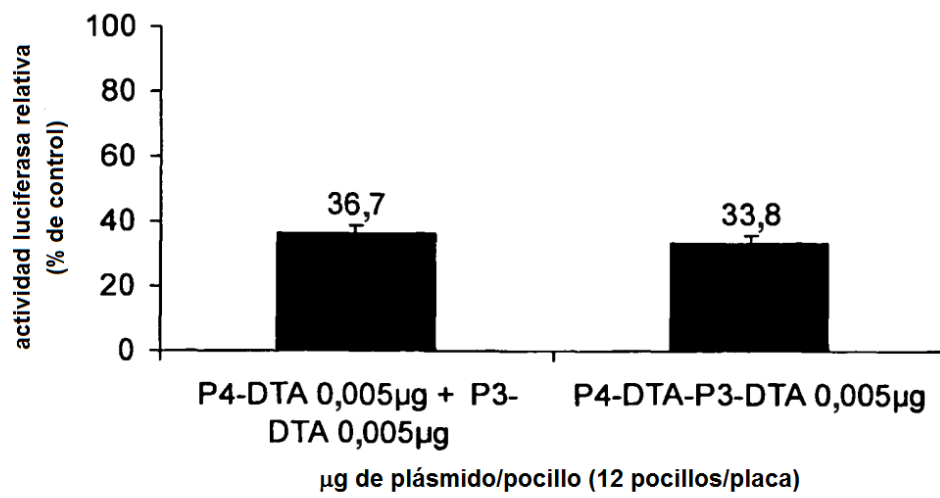


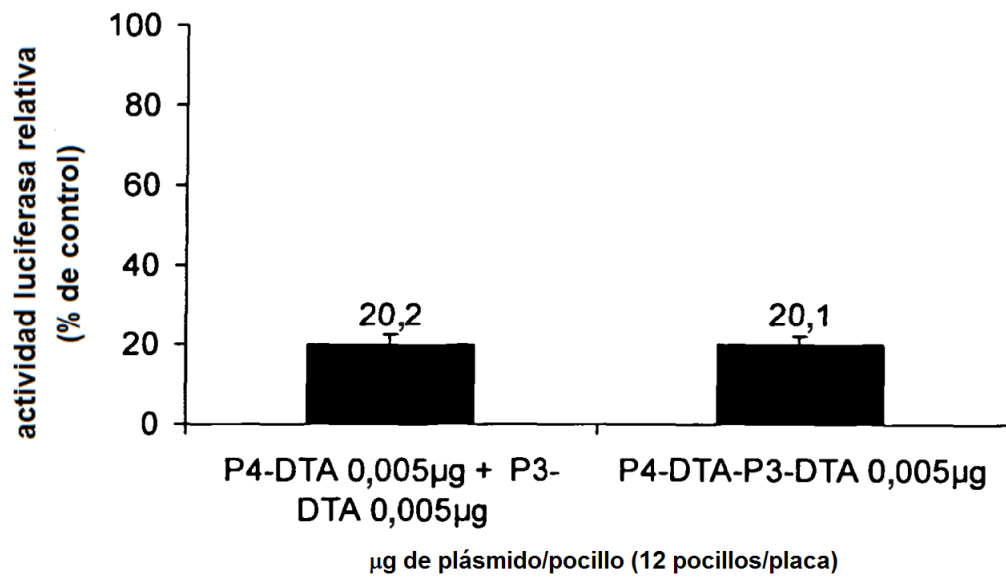
Figura 20B



**Figura 21A**

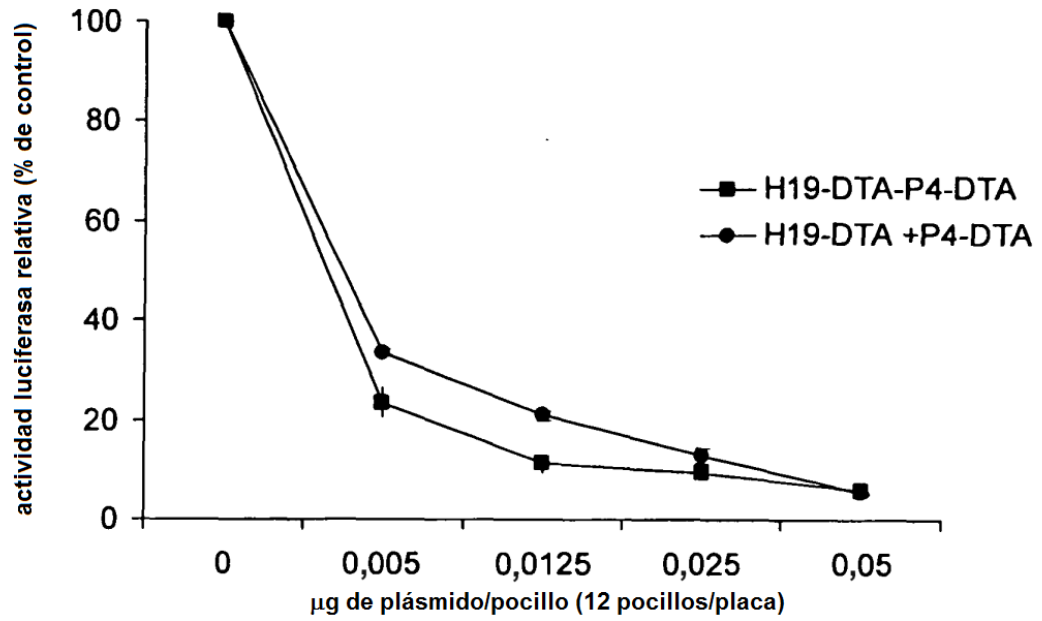


**Figura 21B**

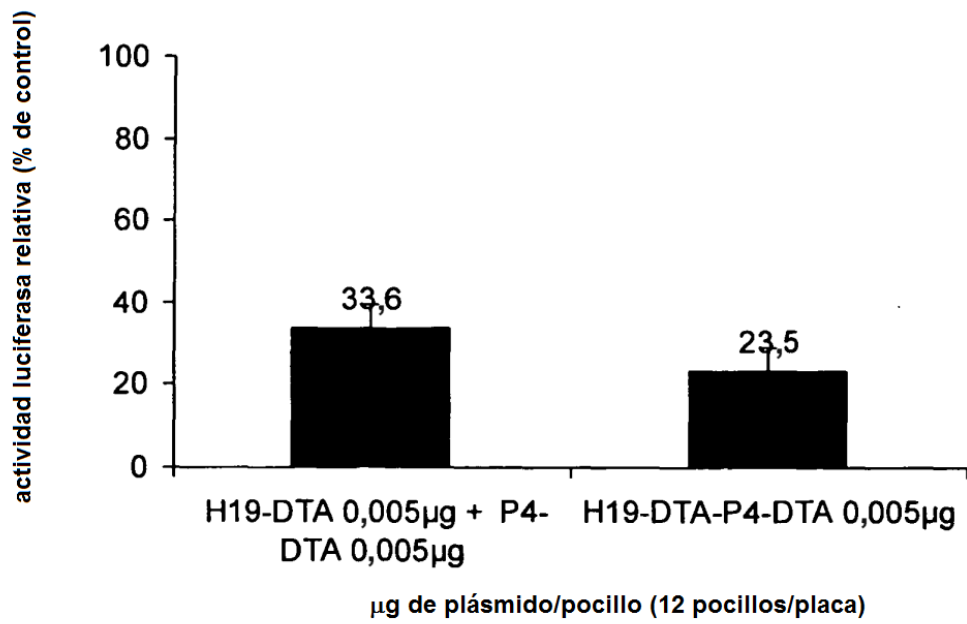


**Figura 22**





**Figura 23A**



**Figura 23B**

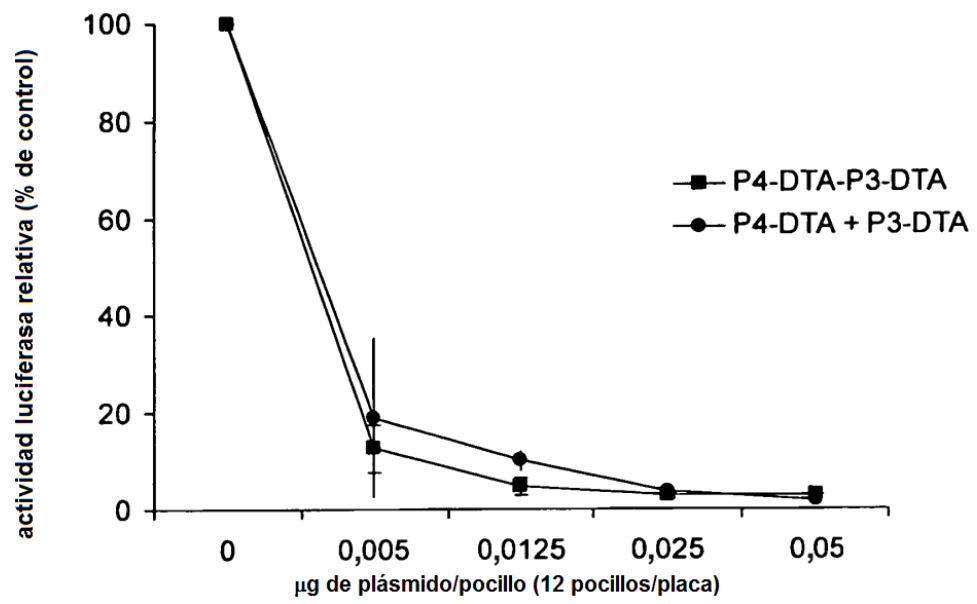


Figura 24A

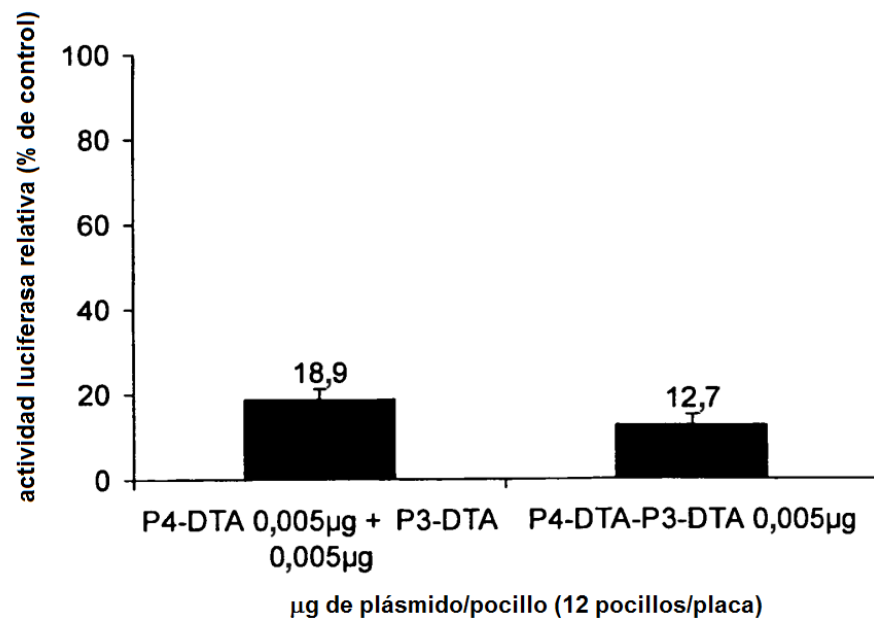


Figura 24B

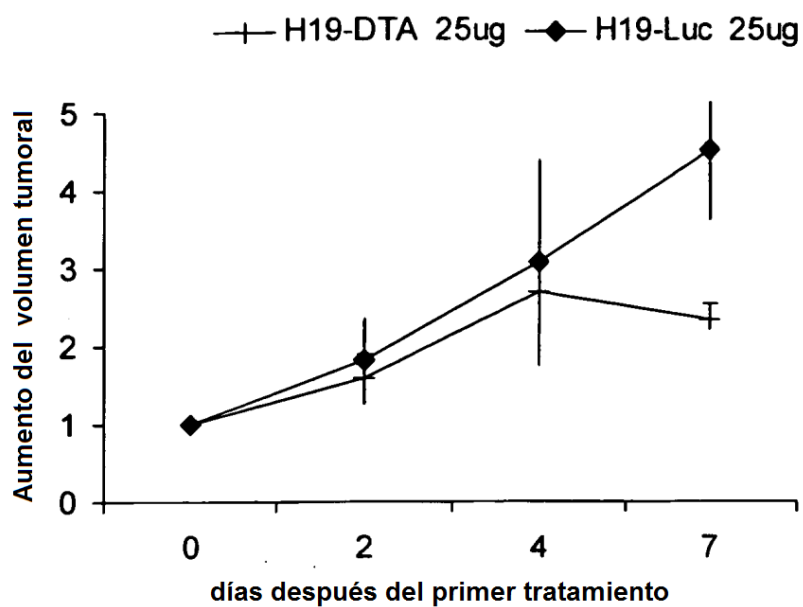


Figura 25

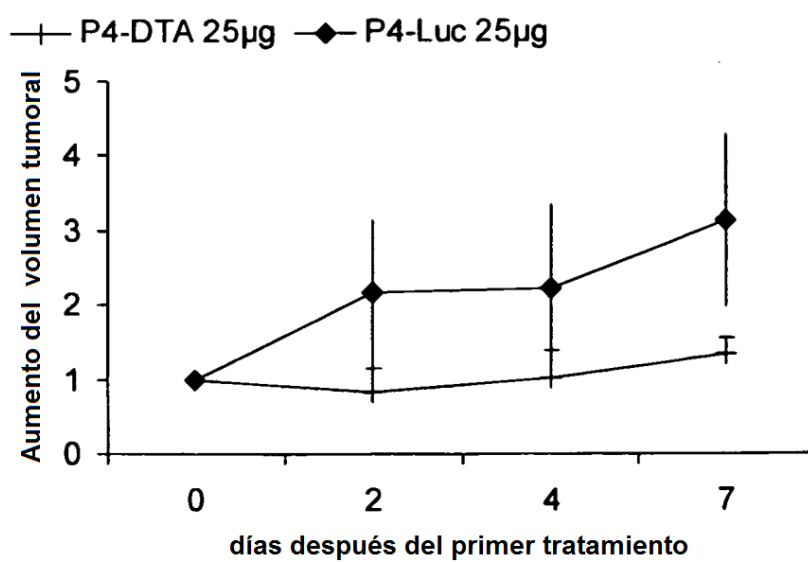
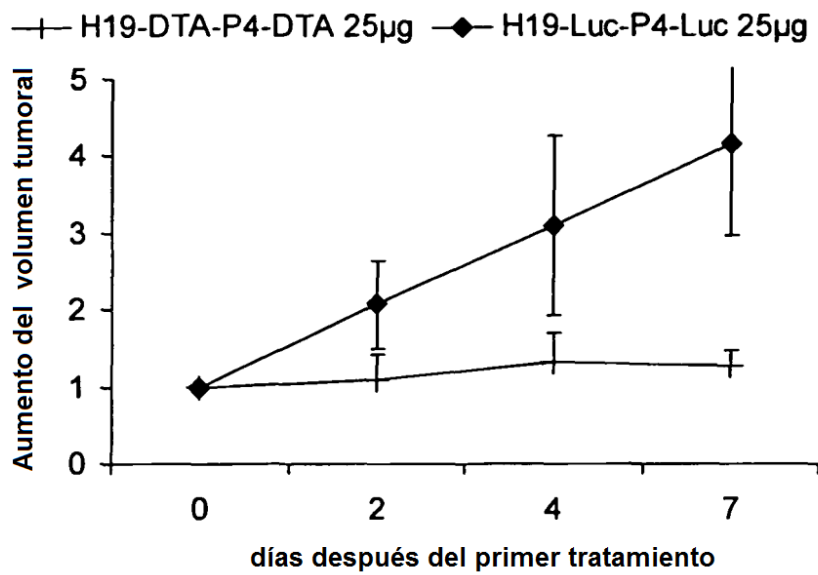
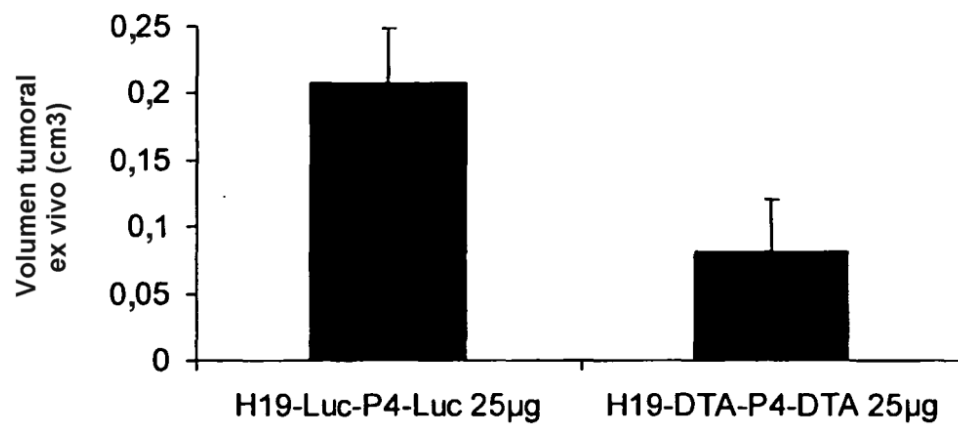


Figura 26



**Figura 27**



**Figura 28**

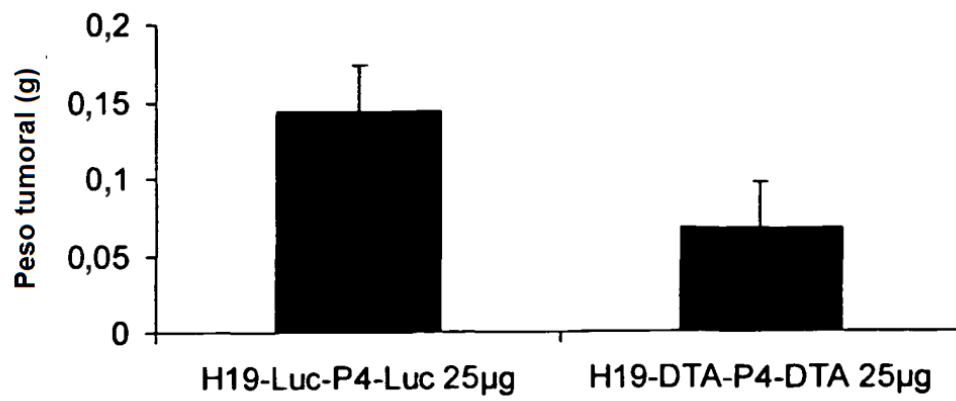


Figura 29

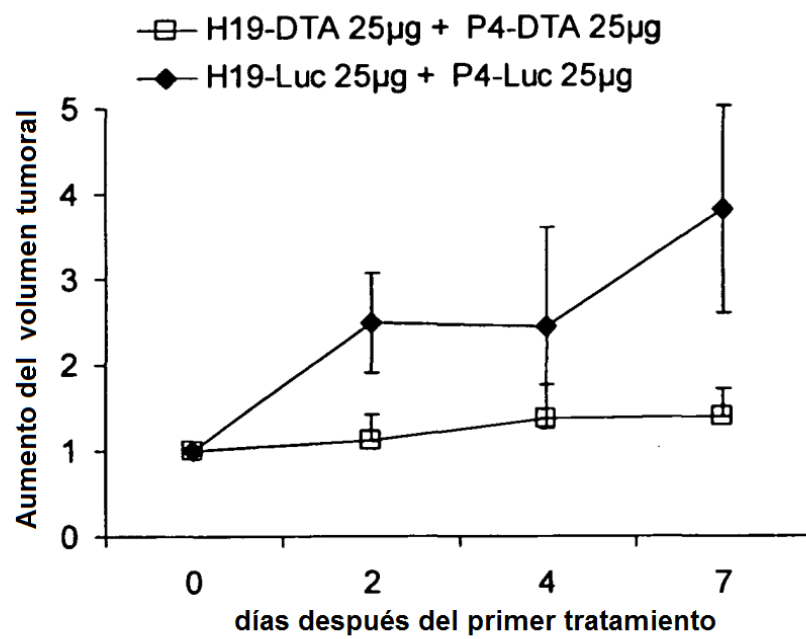


Figura 30

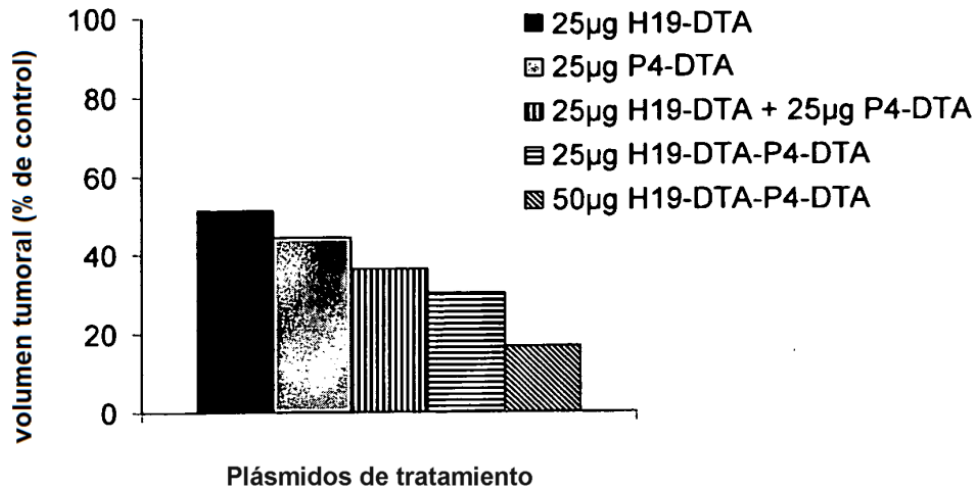


Figura 31

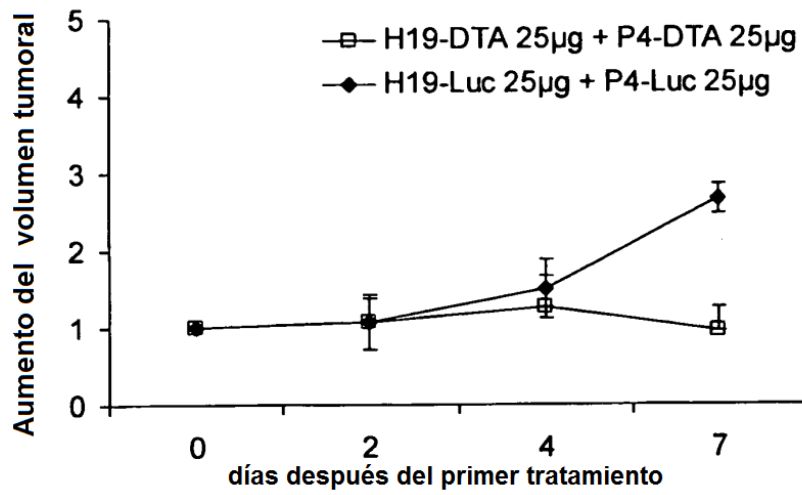


Figura 32

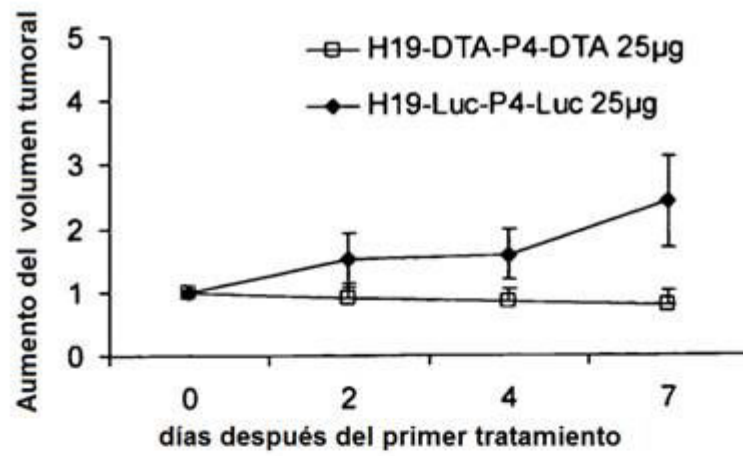


Figura 33

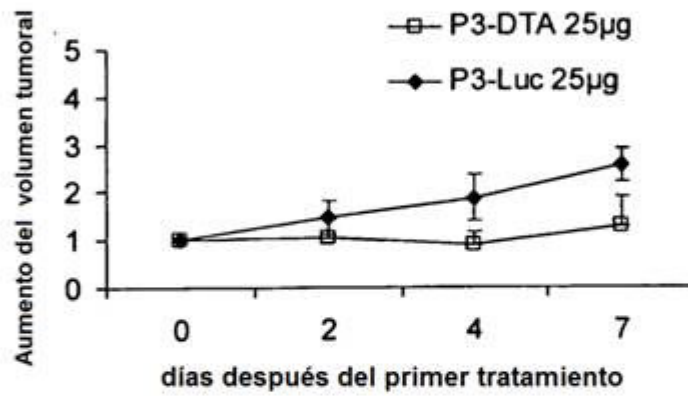


Figura 34

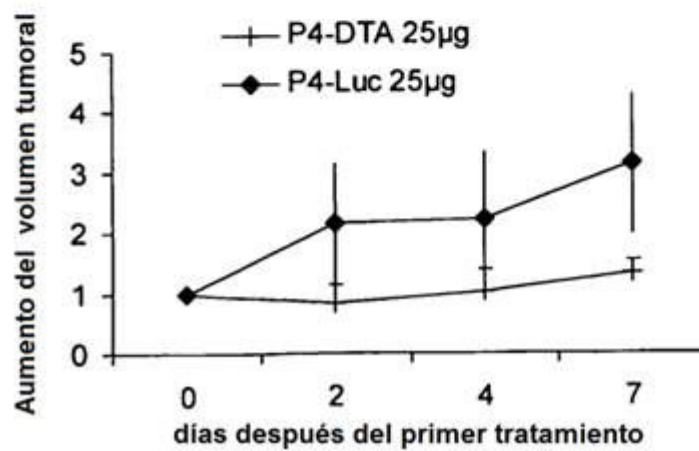


Figura 35

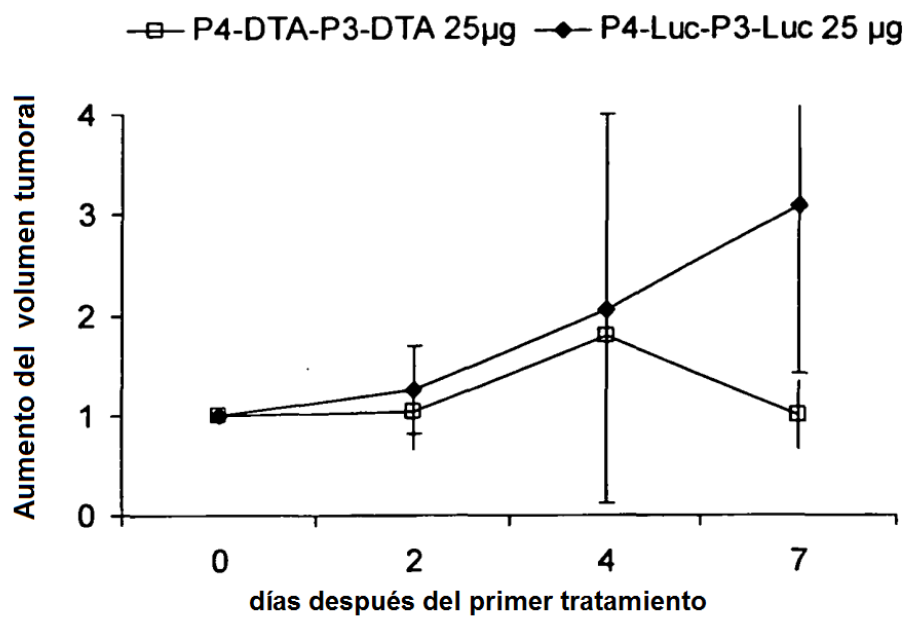


Figura 36

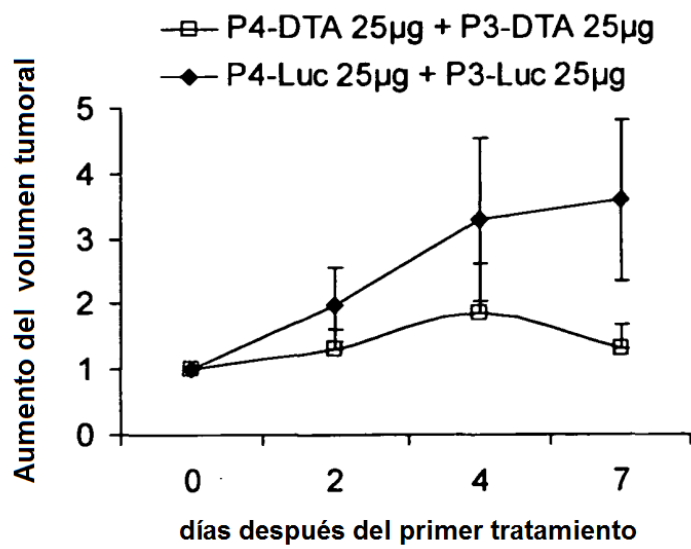


Figura 37



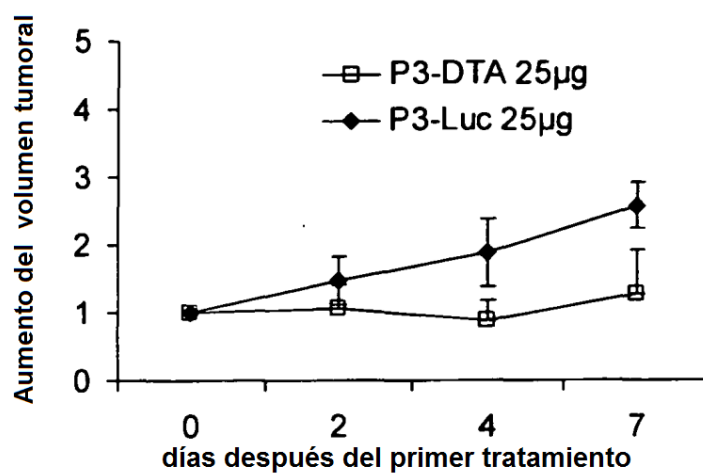


Figura 38

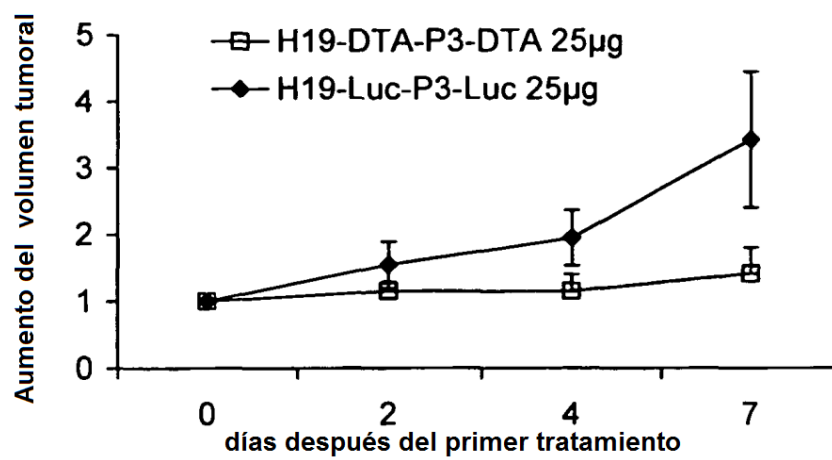
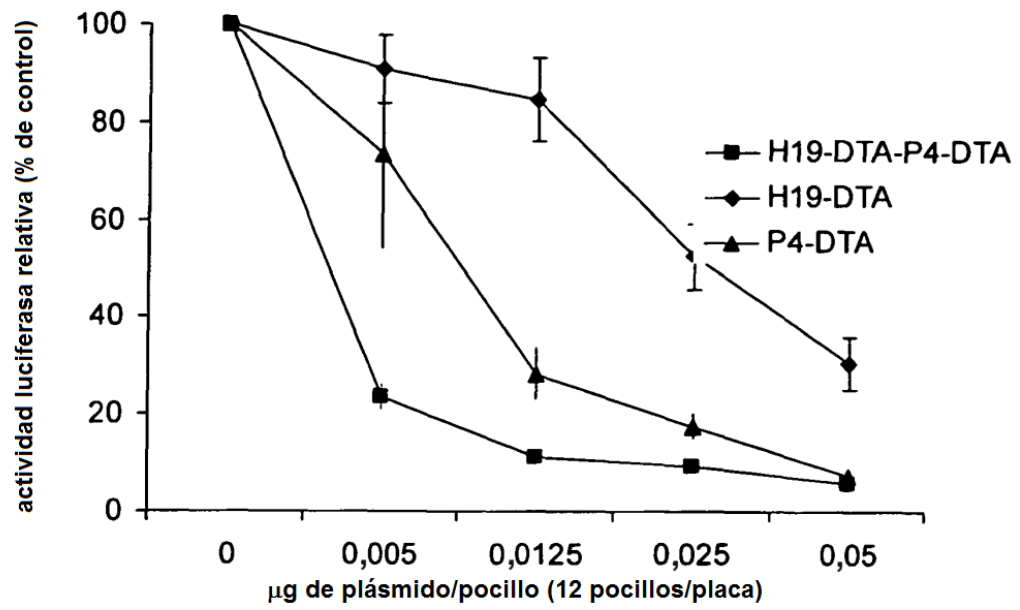
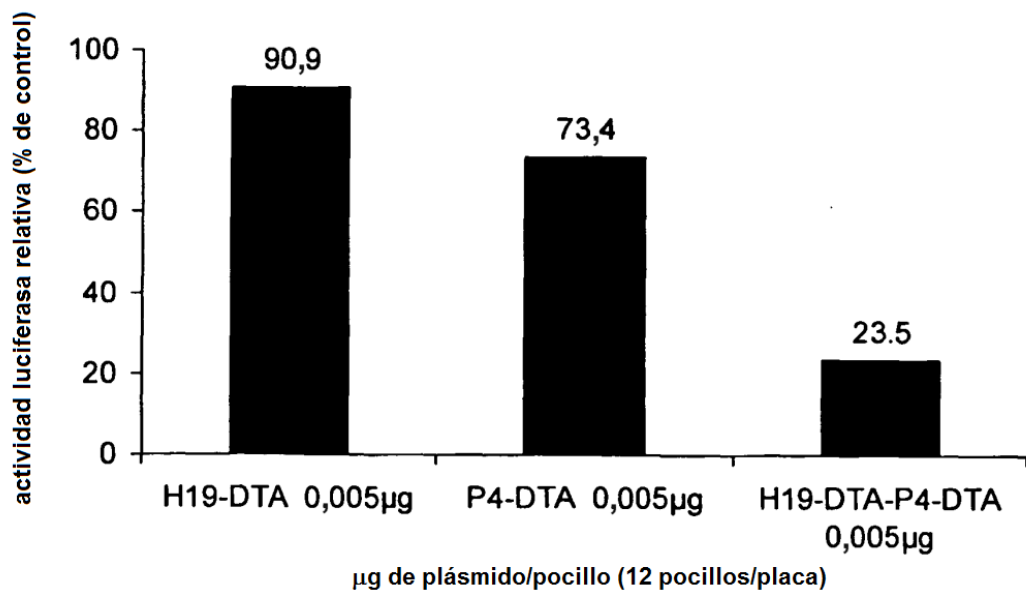


Figura 39



**Figura 40A**



**Figura 40B**