

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 495**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09789284 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2326350**

54 Título: **Compuestos para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano**

30 Prioridad:

**20.01.2009 US 205395 P**  
**08.09.2008 US 95300 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.01.2014**

73 Titular/es:

**PSMA DEVELOPMENT COMPANY, L.L.C.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, New York 10591, US**

72 Inventor/es:

**MA, DANGSHE;**  
**OLSON, WILLIAM C.;**  
**MORRIS, STEPHEN y**  
**ISRAEL, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 438 495 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**

Compuestos para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119 de la solicitud provisional de los Estados Unidos de América 61/095.300, presentada el 8 de septiembre de 2008, y la solicitud provisional de los Estados Unidos de América 61/205.395, presentada el 20 de enero de 2009.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer de próstata es la neoplasia más habitual y la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres en los Estados Unidos de América (Jemal A, et al., CA Cancer J Clin 2005; 55:10-30). El cáncer de próstata localizado se trata típicamente con cirugía o radiación, y la enfermedad recurrente se puede controlar temporalmente con ablación de andrógenos (Klein EA, et al., Urol Clin North Am 2003; 30:315-30). Sin embargo, casi todos los carcinomas de próstata se hacen eventualmente refractarios a hormonas, y después progresan rápidamente (Denmeade SR, et al., Nat Rev Cancer 2002;2:389-96). Se ha demostrado que el cáncer de próstata refractario a hormonas o dependiente de andrógenos es muy resistente a la quimioterapia convencional. Con la excepción de  
15 cuidados paliativos, la única quimioterapia aprobada es docetaxel en combinación con prednisona, que ofrece un beneficio de supervivencia modesto (2,4 meses) (Gulley J, et al., Am J Ther. 2004; 351:1513-20; Petrylak DP, et al., New Engl J Med 2004; 351:1513-20).

20 M. D GALSKEY ET AL: JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 26, nº 13, 2008 (2008-05-01) describen los resultados de un ensayo clínico llevado a cabo sobre el inmunoc conjugado MLN2704 en pacientes con cáncer de próstata metastásico progresivo resistente a la castración. MLN2704 comprende J591, un anticuerpo monoclonal desinmunizado dirigido hacia un dominio externo de PSMA, y el fármaco análogo de maytansina maytansoide-1 (DM1).

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere, al menos en parte, al descubrimiento sorprendente de que conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs) que comprenden un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA, conjugado con un derivado de dolastatina 10, en particular auristatinas tales como MMAE (también denominada aquí como monometilauristatina E o monometilauristatin norefedrina) o MMAF (también denominada aquí como monometilauristatina F o monometilauristatin fenilalanina), se pueden usar para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, y para tratar cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, descrito aquí; por lo tanto, son métodos para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. También se describen aquí métodos para tratar un sujeto con un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. En una realización de estos últimos métodos, los métodos implican En una realización de los últimos métodos, los métodos implican exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. En otra realización de los últimos métodos, los métodos implican retrasar o inhibir la progresión del cáncer. En todavía otra realización de los últimos métodos, los métodos implican incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de los sujetos que no se han tratado con ADC de PSMA y que tienen  
30 cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado después de una terapia previa con taxano. En todavía otra realización de los últimos métodos, los métodos implican hacer disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs), en comparación con un nivel de línea base. En una realización adicional de los últimos métodos, los métodos implican hacer disminuir o estabilizar un nivel sérico de PSA, en comparación con un nivel de línea base de PSA.

45 Por lo tanto, en un aspecto, se describe un método para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, que comprende poner en contacto las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, con un conjugado de anticuerpo-fármaco en una cantidad eficaz para exterminar las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) conjugado con monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y en el que la secuencia de PSMA es la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1.

50 En otro aspecto, también se describe un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, que comprende administrar al sujeto que tiene un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, un conjugado de anticuerpo-fármaco en una cantidad eficaz para tratar el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) conjugado con monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y en el que la secuencia de PSMA es la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1. En una realización, el método implica exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. En otra realización, el método implica retrasar o inhibir la progresión del cáncer. En todavía otra realización, el método implica incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de sujetos que no han sido tratados con el ADC de PSMA y que tienen  
55

cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano. En todavía otra realización, el método implica hacer disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs) en comparación con un nivel de línea base. En una realización adicional, el método implica hacer disminuir o estabilizar un nivel sérico de PSA en comparación con un nivel de línea base de PSA.

5 En todavía otro aspecto, también se proporciona un método para tratar un sujeto que tiene cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano, que comprende administrar una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo-fármaco, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) conjugado a monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y en el que la secuencia de PSMA es la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1. En una realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco de PSMA (también denominado aquí como "ADC de PSMA" o "ADC") consiste esencialmente en un anticuerpo monoclonal humano contra PSMA conjugado a monometilaurastatin norefedrina (MMAE) vía un ligador de valina-citulina. En una realización, el método implica exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. En otra realización, el método implica retrasar o inhibir la progresión del cáncer. En todavía otra realización, el método implica incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de los sujetos que no se han tratado con el ADC de PSMA y que tienen cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano. En todavía otra realización, el método implica hacer disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs) en comparación con un nivel de línea base. En una realización adicional, el método implica hacer disminuir o estabilizar un nivel sérico de PSA en comparación con un nivel de línea base de PSA.

20 En una realización de los métodos proporcionados, la cantidad eficaz del ADC es suficiente para 1) retrasar o inhibir la progresión del cáncer, 2) incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de sujetos que no han sido tratados con ADC de PSMA y que tienen cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano, 3) disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs) en comparación con un nivel de línea base y/o 4) disminuir o estabilizar un nivel sérico de antígeno específico de la próstata (PSA) en comparación con un nivel de línea base de PSA.

25 En una realización, el exterminio de las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, o el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se demuestra mediante cambios en la imagen radiográfica en la carga tumoral en comparación con una imagen radiográfica inicial en el sujeto antes de la administración del ADC de PSMA. En una realización, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 10%. En otra realización, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 20%. En todavía otra realización, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 30%. En todavía otra realización, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 40%. En una realización adicional, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 50%. En todavía una realización adicional, el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos 60%.

30 En otra realización de los métodos proporcionados, el exterminio de las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, o el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se demuestra mediante un cambio en al menos un biomarcador para metástasis ósea y metabolismo óseo, en comparación con un valor de línea base antes de la administración del ADC de PSMA. En una realización, el biomarcador es N-telopéptido, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, calcitonina, calcio, pirdinolina o desoxipirdinolina.

35 En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el tratamiento con el ADC de PSMA da como resultado una mayor supervivencia para el sujeto, en el que la supervivencia aumenta en comparación con el tiempo medio de supervivencia de sujetos con cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, no tratado con ADC de PSMA. En una realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en cuatro semanas. En otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en seis semanas. En todavía otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en dos meses. En todavía otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en cuatro meses. En una realización adicional, la supervivencia en el sujeto aumenta en seis meses. En otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en ocho meses. En todavía otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en diez meses. En todavía otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en doce meses. En todavía otra realización, la supervivencia en el sujeto aumenta en catorce meses.

40 En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el tratamiento con el ADC de PSMA da como resultado una mejora en la calidad de vida del sujeto en comparación con la calidad de vida del sujeto antes del tratamiento con el ADC de PSMA.

45 En una realización adicional de los métodos proporcionados, las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, son resistentes a docetaxel o paclitaxel. En todavía una realización adicional de los métodos proporcionados, el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, es resistente a docetaxel o paclitaxel.

50 En otra realización de los métodos proporcionados, las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, son células de cáncer de próstata o células de cáncer no de próstata. En una realización, las células de cáncer no de próstata son células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer hepático,

células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma.

5 En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, es cáncer de próstata o cáncer no de próstata. En una realización, el cáncer no de próstata es cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma.

10 En una realización adicional de los métodos proporcionados, las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, son de un tumor. En todavía una realización adicional de los métodos proporcionados, el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, es un tumor. En una realización, el volumen del tumor es al menos  $100 \text{ mm}^3$  antes del inicio del método que usa ADC de PSMA. En otra realización, el volumen del tumor es al menos  $200 \text{ mm}^3$ . En todavía otra realización, el volumen del tumor es al menos  $300 \text{ mm}^3$ . En una realización adicional, el volumen del tumor es al menos  $400 \text{ mm}^3$ . En todavía una realización adicional, el volumen del tumor es al menos  $500 \text{ mm}^3$ . En todavía otra realización, el volumen del tumor es al menos  $600 \text{ mm}^3$ . En aún otra realización, el volumen del tumor es al menos  $700 \text{ mm}^3$ . En una realización adicional, el volumen del tumor es al menos  $800 \text{ mm}^3$ . En todavía una realización adicional, el volumen del tumor es al menos  $900 \text{ mm}^3$ . En otra realización, el volumen del tumor es al menos  $1000 \text{ mm}^3$ . En todavía otra realización, el volumen del tumor es al menos  $1200 \text{ mm}^3$ . En todavía otra realización, el volumen del tumor es al menos  $1400 \text{ mm}^3$ . En aún una realización adicional, el volumen del tumor es al menos  $1600 \text{ mm}^3$ .

20 En otra realización de los métodos proporcionados, el tratamiento o contacto con el ADC de PSMA da como resultado una reducción del volumen tumoral en al menos 10% en comparación con el volumen tumoral antes del tratamiento o contacto con el ADC de PSMA. En todavía otra realización, el volumen del tumor se reduce en al menos 20%. En aún otra realización, el volumen del tumor se reduce en al menos 30%. En una realización adicional, el volumen del tumor se reduce en al menos 40%. En todavía una realización adicional, el volumen del tumor se reduce en al menos 50%. En aún una realización adicional, el volumen del tumor se reduce en al menos 60%. En otra realización, el volumen del tumor se reduce en al menos 70%. En todavía otra realización, el volumen del tumor se reduce en al menos 80%. En todavía otra realización, el volumen del tumor se reduce en al menos 90%. En una realización adicional, el volumen del tumor se reduce en al menos 95%. En aún una realización adicional, el tumor se erradica.

30 En una realización, el tumor tiene una longitud de al menos 5 mm antes del inicio del método que usa ADC de PSMA. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 6 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 7 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 8 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 9 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 10 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 11 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 12 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 13 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 14 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 15 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 16 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 17 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 18 mm. En aún una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 19 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 20 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 21 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 22 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 23 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 24 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 25 mm. En aún una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 30 mm.

45 En otra realización de los métodos proporcionados, el tratamiento o contacto con el ADC de PSMA da como resultado una reducción de la longitud del tumor en al menos 10% en comparación con la longitud del tumor antes del tratamiento o contacto con el ADC de PSMA. En todavía otra realización, la longitud del tumor se reduce en al menos 20%. En todavía otra realización, la longitud del tumor se reduce en al menos 30%. En una realización adicional, la longitud del tumor se reduce en al menos 40%. En todavía una realización adicional, la longitud del tumor se reduce en al menos 50%. En aún una realización adicional, la longitud del tumor se reduce en al menos 60%. En otra realización, la longitud del tumor se reduce en al menos 70%. En todavía otra realización, la longitud del tumor se reduce en al menos 80%. En todavía otra realización, la longitud del tumor se reduce en al menos 90%. En una realización adicional, la longitud del tumor se reduce en al menos 95%. En aún una realización adicional, la longitud del tumor se reduce en al menos 99%.

60 En una realización adicional de los métodos proporcionados, la administración del ADC de PSMA a un sujeto da como resultado la ganancia de peso corporal en el sujeto (en comparación con el peso del sujeto antes de la administración del ADC de PSMA al sujeto). La ganancia en el peso corporal puede resultar de una única administración del ADC de PSMA o de un curso de tratamiento con el ADC de PSMA (es decir, más de una administración). En una realización, la ganancia es al menos una ganancia de 5% de peso corporal. En otra realización, la ganancia es al menos una ganancia de 10%. En todavía otra realización, la ganancia es al menos una

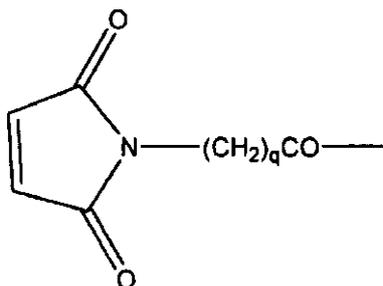
ganancia de 15%. En todavía una realización adicional, la ganancia es al menos una ganancia de 20%. En todavía otra realización, la ganancia es al menos una ganancia de 25%. En una realización adicional, la ganancia es al menos una ganancia de 30%. En otra realización, la ganancia es una ganancia de 5% en peso corporal. En otra realización, la ganancia es una ganancia de 10%. En todavía otra realización, la ganancia es una ganancia de 15%. En todavía una realización adicional, la ganancia es una ganancia de 20%. En todavía otra realización, la ganancia a una ganancia de 25%. En una realización adicional, la ganancia es una ganancia de 30%.

En una realización de los métodos proporcionados, las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, son de una metástasis. En otra realización de los métodos proporcionados, el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, es metastásico.

En otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se conjuga a al menos 2 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina. En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se conjuga a al menos 3 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina. En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se conjuga a al menos 4 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina.

En una realización adicional de los métodos proporcionados, la monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina se conjuga al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno con un compuesto de la fórmula  $-A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-$  en la que, A es una unidad de acilo carboxílico; Y es un aminoácido; Z es un aminoácido; X y W son cada uno un espaciador autoinmolativo; n es un número entero de 0 a 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En una realización, A es



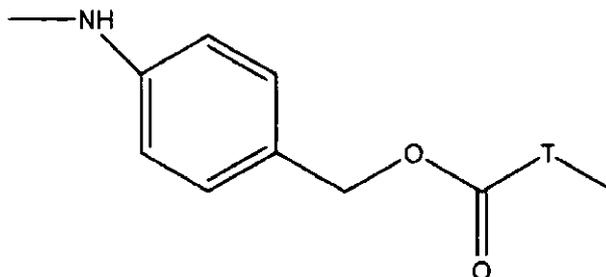
en la que q es 1-10. En otra realización, A es 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo, m-succinimidobenzoilo, 4-(p-succinimidofenil)-butirilo, 4-(2-acetamido)benzoilo, 3-tiopropionilo, 4-(1-tioetil)-benzoilo, 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoilo o maleimida caproilo. En todavía otra realización, A es maleimida caproilo.

En otra realización, Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina. En todavía otra realización, Y es valina.

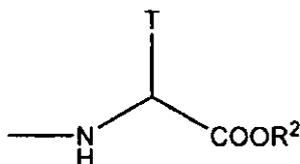
En una realización adicional, Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con grupos tosilo o nitro, histidina, o nitina, o nitina protegida con acetilo o formilo, o citrulina. En aún una realización adicional, Z es citrulina.

En una realización,  $Y_m-Z_m$  es valina-citrulina. En otra realización,  $Y_m-Z_m$  es una secuencia proteínica que es escindible selectivamente por una proteasa.

En todavía otra realización, X es un compuesto que tiene la fórmula



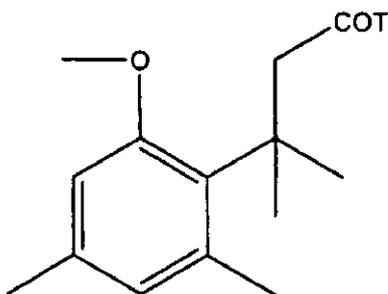
en la que T es O, N, o S. En todavía otra realización, X es un compuesto que tiene la fórmula  $-HN-R^1-COT$ , en la que  $R^1$  es alquilo de  $C_1-C_5$ , T es O, N o S. En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula



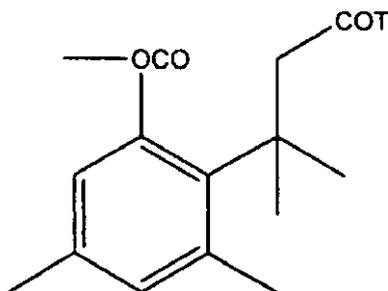
en la que T es O, N, o S, R<sup>2</sup> es H o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. En aún una realización adicional, X es p-aminobencilcarbamoiloxi. En todavía una realización adicional, X es alcohol p-aminobencílico. En otra realización, X es carbamato de p-aminobencilo. En todavía otra realización, X es p-aminobenciloxycarbonilo. En todavía otra realización, X es ácido  $\gamma$ -aminobutírico; ácido  $\alpha,\alpha$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico o ácido  $\beta,\beta$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico.

5

En una realización, W es



o



10 en la que T es O, S o N.

En otra realización, m y n son 0.

En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefedrina. En otra realización de los métodos proporcionados, el conjugado de anticuerpo-fármaco es carbamato de AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin norefedrina. En otra realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina. En otra realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco es carbamato de AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin fenilalanina. En una realización adicional, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-monometilauristatin fenilalanina. En todavía una realización adicional, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefedrina. En otra realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco es carbamato de AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin norefedrina. En aún una realización adicional, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina. En aún una realización adicional, el conjugado de anticuerpo-fármaco es carbamato de AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin fenilalanina. En otra realización, el conjugado de anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-monometilauristatin fenilalanina.

20

25

30

En una realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un dominio extracelular de PSMA. En otra realización, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo conformacional de PSMA. En todavía otra realización, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno se une a células vivas. En una realización

adicional, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno no requiere la lisis celular para unirse a PSMA. En todavía una realización adicional, el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno se une a células de la neovasculatura de un tumor.

5 En otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno inhibe competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA, en el que el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, 10 Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste 20 en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32.

En todavía otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, 25 Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y d) una región variable de cadena ligera codificada 30 por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32.

En una realización, el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20. En otra realización, el segundo anticuerpo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 14, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 16. En 50 todavía otra realización, el segundo anticuerpo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 9, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 18, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 20. 55 60

En una realización adicional de los métodos proporcionados, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido

nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 90% idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20. En otra realización, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 95% idéntica. En todavía otra realización, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 97% idéntica. En todavía otra realización, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 98% idéntica. En una realización adicional, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 99% idéntica.

En otra realización de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20, y sus fragmentos de unión a antígeno. En todavía otra realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 14, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 16, y sus fragmentos de unión a antígeno. En todavía otra realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 9, o (c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 18, y d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 20, y sus fragmentos de unión a antígeno.

En todavía una realización adicional de los métodos proporcionados, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno es AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

En todavía una realización adicional de los métodos proporcionados, el anticuerpo humano es una IgG1 que comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o su fragmento de unión a antígeno, que se une específicamente a PSMA, conjugado a un derivado de dolastatina 10, para uso en un método para tratar un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. Preferiblemente, dicho método implica exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. En otra realización, el método implica retrasar o inhibir la progresión del cáncer. En todavía otra realización, el método implica incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de sujetos que no han sido tratados con el ADC de PSMA y que tienen cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano. En todavía otra realización, el método implica hacer disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs) en comparación con un nivel de línea base. En una realización adicional, el método implica hacer disminuir o estabilizar un nivel sérico de PSA en comparación con un nivel de línea base de

PSA. También se prefiere que las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, se exterminen mediante el conjugado. Preferiblemente, el PSMA tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1. Preferiblemente, el conjugado es para tratar cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano. El derivado de dolastatina 10 puede ser una auristatina, y es preferiblemente MMAE (también denominada aquí como monometilauristatina E o monometilauristatin norefedrina) o MMAF (también denominada aquí como monometilauristatina F o monometilauristatin fenilalanina). En realizaciones preferidas de este aspecto adicional, el conjugado puede tener cualquiera de las características del conjugado empleado en otros aspectos de la invención definidos aquí. Además, el método implicado en este aspecto adicional, puede implicar la administración de una cantidad eficaz del conjugado, como se define con referencia a otros aspectos definidos aquí. También puede tener cualquiera de las características de cualquiera de los métodos para tratar un sujeto que se describen aquí.

#### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 presenta un esquema que muestra la localización subcelular de PSMA en próstata normal frente al cáncer de próstata. PSMA es una glucoproteína transmembránica de tipo II, de 750 restos, que está muy expresada en células de cáncer de próstata y tiene expresión limitada en tejidos no prostáticos normales. En la próstata normal, PSMA se expresa predominantemente como una variante de ajuste citoplásmica (PSM'), que es retenida en el citoplasma. En cáncer de próstata, PSMA se expresa como un homodímero asociado no covalentemente, anclado a la membrana.

La Fig. 2 presenta un esquema de un número de opciones de tratamiento de cáncer de próstata. La quimioterapia aprobada, docetaxel (Taxotere) en combinación con prednisona, para el cáncer de próstata avanzado proporciona un incremento modesto en la supervivencia (2-3 meses), con efectos secundarios significativos.

La Fig. 3 presenta un esquema que muestra la terapia dirigida por el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).

La Fig. 4 proporciona las estructuras químicas de tres ejemplos de ligadores farmacéuticos que se pueden conjugar a un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA y forma un conjugado de anticuerpo-fármaco.

La Fig. 5 demuestra la citotoxicidad potente y específica de ADC de PSMA para células de cáncer de próstata que expresan PSMA. Células positivas a PSMA y negativas a PSMA se expusieron a ADC de PSMA en microplacas de 96 pocillos a diversas concentraciones. Después de 96 horas, se evaluó la supervivencia celular en porcentaje (en comparación con células en el medio), usando Alamar Blue fluorescente.

La Fig. 6 presenta una tabla que demuestra la citotoxicidad potente y específica de ADC de PSMA contra células de cáncer de próstata que expresan PSMA.

La Fig. 7 muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo en ratones atímicos tratados con ADC de PSMA frente a un control. Los ratones atímicos que poseen tumores de cáncer de próstata humano se distribuyeron al azar en el día 11 en dos grupos, control con vehículo PBS (diamantes en negrita,  $n = 15$ ,  $108,9 \text{ mm}^3$ ) y ADC de PSMA (triángulos en negrita,  $n = 15$ ,  $108,7 \text{ mm}^3$ ), según el volumen tumoral. Los animales recibieron inyecciones intravenosas de PBS o de ADC de PSMA a  $6 \text{ mg/kg}$  en los días 12, 15, 18, 22, 25 y 29. El volumen tumoral medio se representó gráficamente para el grupo de control de vehículo PBS hasta que el primer animal se sacrificó en el día 33 debido a la limitación del tamaño tumoral ( $>2000 \text{ mm}^3$ ).

La Fig. 8 muestra el efecto del tratamiento con ADC de PSMA sobre el volumen tumoral con un tratamiento con ADC de PSMA inicial y con un segundo tratamiento con ADC de PSMA. Se hicieron crecer nuevamente tumores de cuatro ratones del grupo de tratamiento con ADC de PSMA, y se trataron con ADC de PSMA a la misma dosis de  $6 \text{ mg/kg}$ . ADC de PSMA redujo eficazmente el volumen tumoral hasta  $< 100 \text{ mm}^3$  desde un gran tumor de  $894 \text{ mm}^3$ . Las líneas punteadas indican el tratamiento inicial con ADC de PSMA (6 dosis, dos veces por semana), y las líneas continuas muestran el segundo tratamiento con ADC de PSMA (13 dosificaciones semanales).

La Fig. 9 demuestra los efectos en ratones atímicos que tienen un tamaño tumoral de  $\sim 500 \text{ mm}^3$  y que se trataron con 12 dosis de docetaxel administrado intraperitonealmente (IP) a  $12 \text{ mg/kg}$  semanalmente como se indica por las líneas discontinuas. El tumor respondió inicialmente a docetaxel, y después reapareció. Partiendo en el día 100 con un volumen tumoral de  $800 \text{ mm}^3$ , se administró intravenosamente (IV) ADC de PSMA a  $6 \text{ mg/kg}$  durante 12 dosis adicionales semanalmente (líneas continuas). ADC de PSMA redujo el volumen tumoral desde  $800 \text{ mm}^3$  hasta  $50 \text{ mm}^3$ .

La Fig. 10 muestra un esquema de distribución al azar para el ensayo de la eficacia de ADC de PSMA tras el fallo del tratamiento con docetaxel. En la primera distribución al azar, a los animales se les asignó al grupo de control de vehículo o al grupo de tratamiento con docetaxel. Si el volumen tumoral superó  $400 \text{ mm}^3$  en el grupo tratado con docetaxel, los animales se distribuyeron al azar (la segunda distribución al azar) a una

relación 1:1 en dos subgrupos: tratamiento continuado con docetaxel o tratamiento con ADC de PSMA. Los volúmenes tumorales de los animales se midieron a lo largo del tiempo.

5 La Fig. 11 muestra el volumen tumoral a lo largo del tiempo en ratones atímicos tratados con docetaxel frente al control. Los ratones atímicos que poseen tumores de cáncer de próstata humano se distribuyeron al azar en el día 14 según el volumen tumoral en dos grupos, control de vehículo (diamantes en negro,  $n = 10$ ) y docetaxel (círculos negros,  $n = 50$ ). Los animales recibieron inyecciones intravenosas de PBS o de docetaxel a 2 mg/kg/IV semanalmente. El volumen tumoral medio de los dos grupos se representó gráficamente hasta que se inició la segunda distribución al azar. El tratamiento con docetaxel redujo el crecimiento tumoral en comparación con el control en al menos hacia el día 21 ( $p = 0,025$ ) y posterior.

10 La Fig. 12 muestra la comparación del volumen tumoral en dos subgrupos tras el fracaso del tratamiento inicial con docetaxel: (1) tratamiento continuado con docetaxel, triángulo negro, (2) tratamiento con ADC de PSMA, 6 mg/kg, cuadrados negros. Puesto que los ratones se asignaron a diferentes grupos en tiempos diferentes, el tiempo de tratamiento (días tras la segunda distribución al azar) se alineó al día 0 (inicio de ADC de PSMA o continuación de docetaxel tras la segunda distribución al azar).

15 La Fig. 13 muestra un esquema del diseño de un estudio *in vivo*.

20 La Fig. 14 muestra el volumen tumoral de cada animal. Cuando el volumen tumoral de un animal en el grupo tratado con docetaxel superó  $400 \text{ mm}^3$ , el animal se distribuyó al azar en una relación 1:1 en dos subgrupos: 1) cambiado a tratamiento con ADC de PSMA a 6 mg/kg/IV semanalmente (cuadrados negros: media:  $515 \pm 103 \text{ mm}^3$ , intervalo  $410\text{-}727 \text{ mm}^3$ ), y 2) tratamiento continuado con docetaxel a 2 mg/kg (triángulos negros, media:  $495 \pm 80 \text{ mm}^3$ , intervalo:  $401\text{-}650 \text{ mm}^3$ ). Se muestra el tamaño tumoral de cada animal y el tiempo de la distribución al azar. Los volúmenes tumorales en la segunda distribución al azar no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos ( $p = 0,518$ , prueba de la *t*).

25 La Fig. 15 muestra el tamaño tumoral para cada animal individual en dos grupos tras la segunda distribución al azar. Los volúmenes tumorales de los animales con tratamiento con ADC de PSMA (panel A) y con tratamiento continuado con docetaxel (panel B) se representaron gráficamente como una función del tiempo tras la segunda distribución al azar (día 0). Los tumores se encogieron cuando se inició el tratamiento con ADC de PSMA (panel A). Sin embargo, incluso con el tratamiento continuado con docetaxel, los tumores continuaron creciendo excepto en un animal (panel B).

30 La Fig. 16 muestra una comparación de los volúmenes tumorales medios en animales que reciben tratamiento con ADC de PSMA (cuadrados negros) y en animales que reciben tratamiento continuado con docetaxel (cuadrados negros). El volumen tumoral medio se comparó como una función del tiempo tras la segunda distribución al azar (día 0). Los tamaños tumorales de los dos grupos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,007$ ).

35 La Fig. 17 muestra una comparación de la supervivencia de los animales a lo largo del tiempo tras la segunda distribución al azar para animales que reciben el tratamiento con ADC de PSMA (línea continua) y animales que reciben tratamiento continuado con docetaxel (línea discontinua). En el día 157 tras la segunda distribución al azar, todos los 18 animales en el grupo de tratamiento con ADC de PSMA todavía estaban vivos. Sin embargo, 16 de 18 animales en el grupo de tratamiento continuado con docetaxel se sacrificaron debido a sus grandes tumores ( $> 2.000 \text{ mm}^3$ ), con una supervivencia media de 45 días. ADC de PSMA aumentó significativamente la supervivencia global ( $p < 0,0001$ ).

40 La Fig. 18 muestra una comparación de los pesos corporales medios tras la segunda distribución al azar en animales que reciben tratamiento con ADC de PSMA (cuadrados negros) y animales que reciben tratamiento continuado con docetaxel (triángulos negros). Globalmente, los animales ganaron peso en el grupo de tratamiento con ADC de PSMA, mientras que los animales perdieron peso en el grupo de tratamiento continuado con docetaxel. El cambio en el peso corporal fue significativamente diferente ( $p < 0,001$ ) entre estos dos grupos.

#### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere, en parte, al hallazgo sorprendente de que conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs) que comprenden un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA, conjugado a un derivado de dolastatina 10, en particular auristatinas tales como MMAE (también denominada aquí como monometilauristatina E o monometilauristatin norefedrina) o MMAF (también denominada aquí como monometilauristatina F o monometilauristatin fenilalanina), se pueden usar para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano. Como se describe posteriormente más abajo, se encontró inesperadamente que células cancerosas que expresan PSMA, que se habían hecho resistentes a los efectos de un agente anticanceroso que actúa destruyendo la red microtubular en células, fueron sensibles a los efectos de un segundo agente anticanceroso que también selecciona como diana a los microtúbulos. Específicamente descrita aquí, la auristatina, MMAE, un inhibidor potente de tubulina, en forma de un conjugado de anticuerpo-fármaco, cuando se suministra a tumores de próstata que expresan PSMA que se habían hecho resistentes a docetaxel, fue capaz de

exterminar células cancerosas resistentes a docetaxel de manera que se disminuyó significativamente el volumen tumoral.

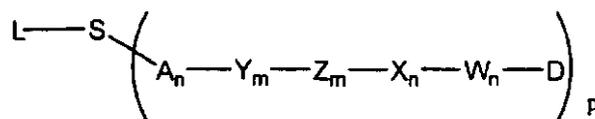
Como se usa aquí, "células cancerosas que expresan PSMA" pretende referirse a células cancerosas que expresan PSMA (por ejemplo, PSMA humano). PSMA es una glucoproteína de membrana de tipo II de 100 kD expresada en tejidos de próstata (Horoszewicz et al., 1987, Anticancer Res. 7:927-935; patente U.S. n° 5.162.504). PSMA se caracterizó como una proteína transmembránica de tipo II que tiene identidad de secuencia con el receptor de transferrina (Israeli et al., 1994, Cancer Res. 54:1807-1811) y con actividad de NAALADasa (Carter et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:749-753). De forma más importante, PSMA se expresa en cantidades crecientes en cáncer de próstata, y también se detectan niveles elevados de PSMA en los sueros de estos pacientes (Horoszewicz et al., 1987; Rochon et al., 1994, Prostate 25:219-223; Murphy et al., 1995, Prostate 26:164-168; y Murphy et al., 1995, Anticancer Res. 15:1473-1479). La expresión de PSMA en próstata cancerosa es aproximadamente 10 veces mayor que aquella en próstata normal. La expresión en próstata normal es aproximadamente 10 veces mayor que aquella en el cerebro, y es 50 a 100 veces mayor que aquella del hígado o riñón. En la mayoría de tejidos normales, no se observa expresión de PSMA. La expresión de PSMA aumenta con la progresión de la enfermedad, haciéndose la más elevada en enfermedad metastásica, refractaria a hormonas. Además, PSMA se expresa también abundantemente en la neovasculatura de una variedad de tumores no prostáticos, incluyendo tumores de vejiga, mama, colon, páncreas, sarcoma, melanoma, renal, hígado, pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico), y riñón, pero no en la vasculatura normal. Por lo tanto, las células cancerosas que expresan PSMA incluyen, por ejemplo, células de cáncer de próstata así como células endoteliales de la neovasculatura de un número de cánceres no prostáticos.

"Células cancerosas resistentes a taxano" se refiere a células cancerosas de un cáncer que se ha tratado con un taxano pero que se ha hecho resistente al tratamiento con el taxano (es decir, el tratamiento posterior con el taxano no ralentizaría o detendría la progresión del cáncer, y/o ya no proporcionaría un beneficio significativo a un sujeto con el cáncer). Un "sujeto con un cáncer resistente a taxano" es aquel que ha recibido tratamiento previo con un taxano pero ya no experimenta un beneficio significativo del tratamiento posterior con el taxano (por ejemplo, ya no experimenta una reducción significativa en el número de células cancerosas, en el volumen tumoral, en la longitud del tumor, en el número de metástasis y/o en otros marcadores de la progresión de la enfermedad, y/o ya no experimenta una mejora en la calidad de vida y/o aumento de la supervivencia en comparación con el tiempo de supervivencia esperado sin tratamiento adicional con el taxano).

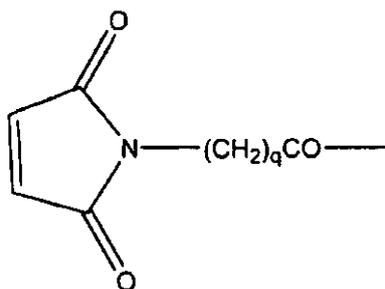
Por lo tanto, en una realización, el ADC de PSMA se administra a un sujeto con cáncer de próstata progresivo, metastásico, refractario a hormonas, resistente a taxano tras la quimioterapia previa con taxano. En otra realización, tal sujeto es un ser humano.

Como se usa aquí, "taxanos" son agentes contra el cáncer que interfieren con o interrumpen la estabilidad, formación y/o función de los microtúbulos. Tales agentes incluyen paclitaxel y docetaxel así como sus derivados, en los que los derivados funcionan contra los microtúbulos mediante el mismo modo de acción que los taxanos de los que derivan.

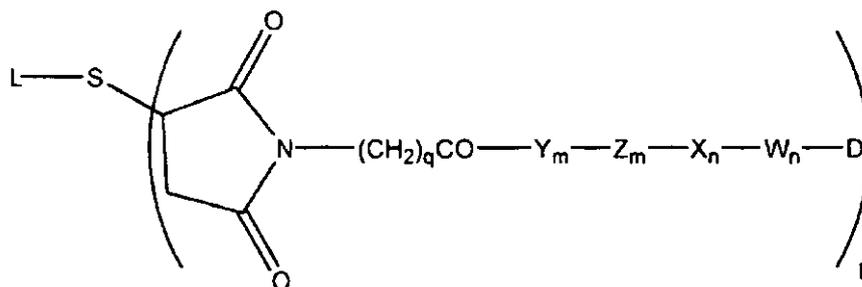
El ADC puede comprender un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno conjugado a la auristatina MMAE o MMAF. Las auristatinas son moléculas pentapeptídicas sintéticas que están estructuralmente relacionadas con dolastatina 10, un producto natural derivado de un animal marino. MMAE y otras auristatinas actúan inhibiendo la polimerización de tubulinas, evitando de ese modo la formación del husillo mitótico. Cuando el ciclo celular se detiene, se dispara la muerte celular apoptótica. En algunas realizaciones, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se puede conjugar a MMAE o a MMAF con un compuesto de la siguiente fórmula: (Fórmula 1):  $-A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-$ , en la que A es una unidad de acilo carboxílico; Y es un aminoácido; Z es un aminoácido; X y W son cada uno un espaciador autoinmolativo; n es un número entero de 0 a 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas realizaciones, el ADC está representado por la fórmula (Fórmula 2):  $L-\{A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-D\}_p$ , en la que L es un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une a PSMA, D es MMAE o MMAF, y p es un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Los otros componentes son como se describe anteriormente. En una realización, la unidad carboxílica "A<sub>n</sub>" está enlazada al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno vía un átomo de azufre derivado del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno:



En una realización, A es

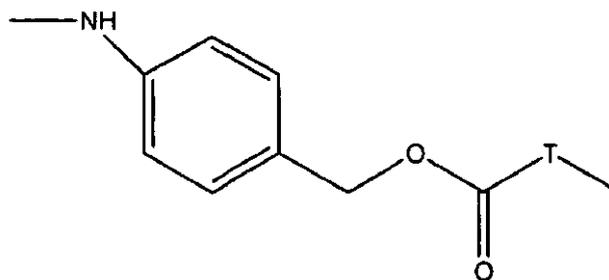


en la que q es 1-10. Por lo tanto, en una realización, el conjugado es:

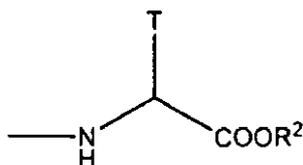


en el que L, Y, Z, X, W, D, n, m, q y p son como se definen previamente.

- 5 En otra realización, A es 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo, m-succinimidobenzoílo, 4-(p-succinimidofenil)-butirilo, 4-(2-acetamido)benzoílo, 3-tiopropionilo, 4-(1-tioetil)-benzoílo, 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoílo o maleimida caproílo. En una realización adicional, A es maleimida caproílo. Los ejemplos representativos de diversas unidades de acilo carboxílico y métodos para su síntesis y unión se describen en la patente US nº 6.214.345.
- 10 En otra realización, Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina. En todavía otra realización, Y es valina. En una realización adicional, Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con grupos tosilo o nitro, histidina, o nitina, o nitina protegida con acetilo o formilo, o citrulina. En todavía una realización adicional, Z es citrulina. En una realización, Y<sub>m</sub>-Z<sub>m</sub> es valina-citrulina. En otra realización, Y<sub>m</sub>-Z<sub>m</sub> es una secuencia proteínica que es escindible selectivamente por una proteasa.
- 15 En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula



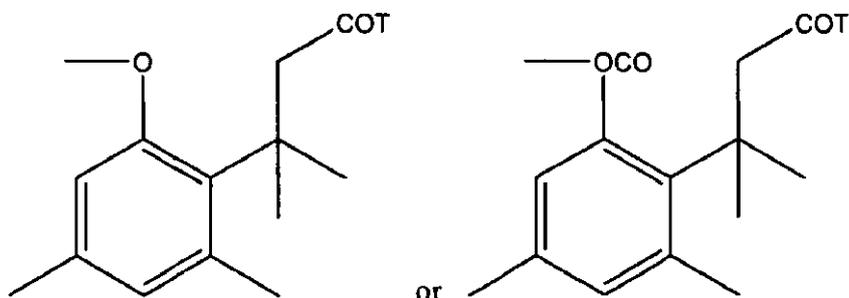
en la que T es O, N, o S. En otra realización, X es un compuesto que tiene la fórmula -HN-R<sup>1</sup>-COT en la que R<sup>1</sup> es alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, T es O, N o S. En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula



- 20 en la que T es O, N, o S, R<sup>2</sup> es H o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>. En una realización, X es p-aminobencilcarbamoiloxi. En otra realización, X es alcohol p-aminobencílico. En una realización adicional, X es carbamato de p-aminobencilo. En aún

una realización adicional, X es p-aminobenciloxycarbonilo. En otra realización, X es ácido  $\gamma$ -aminobutírico; ácido  $\alpha,\alpha$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico o ácido  $\beta,\beta$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico.

En algunas realizaciones, W es



5 en la que T es O, S o N.

En una realización, el compuesto de Fórmula 1 es maleimidocaproilo. Maleimidocaproilo se ha usado para la conjugación de dos auristatinas específicas a un mAb anti-CD30 (AC10) (Doronina, Svetlana et al. "Novel Linkers for Monoclonal Antibody-Mediated Delivery of Anticancer Agents", AACR, Anaheim, CA, Abstract No. 1421, 16-20 de abril de 2005). Maleimidocaproilo reacciona con grupos tiol para formar un tioéter.

10 MMAE o MMAF se pueden conjugar a un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno usando métodos conocidos por los expertos normales en la técnica (por ejemplo., véase, Niemeyer, CM, Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods, Humana Press, 2004) o como se describen aquí. En algunas realizaciones, más de una molécula de MMAE o MMAF se conjuga al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno. En otras realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 moléculas de MMAE o MMAF se conjugan al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno. En todavía otras realizaciones, al menos 2, 3, 4 ó 5 moléculas de MMAE o MMAF se conjugan al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno. En realizaciones adicionales, 2, 3, 4 ó 5 moléculas de MMAE o MMAF se conjugan al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno.

Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno de los ADCs son cualquier anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a PSMA. En una realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a PSMA (por ejemplo, se une específicamente a un dominio extracelular de PSMA, se une específicamente a un epítipo conformacional de PSMA, etc.), y puede inhibir competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA, en el que el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13. Por lo tanto, el segundo anticuerpo, incluye cualquiera de los anticuerpos producidos por los hibridomas o codificados por los plásmidos mostrados más abajo en la Tabla 1. Estos hibridomas y plásmidos se depositaron según, y en satisfacción de, los requisitos del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de Procedimiento de Patentes en la American Type Culture Collection ("ATCC") como una Autoridad de Depósito Internacional y se les dio las Designaciones de Depósito de Patente mostradas anteriormente en la Tabla 1.

Tabla 1

| Anticuerpo | Hibridoma/Plásmido | Designación de Depósito de Patente | Fecha de presentación |
|------------|--------------------|------------------------------------|-----------------------|
| PSMA 3.7   | PSMA 3.7           | PTA-3257                           | 5 de abril de 2001    |
| PSMA 3.9   | PSMA 3.9           | PTA-3258                           | 5 de abril de 2001    |
| PSMA 3.11  | PSMA 3.11          | PTA-3269                           | 10 de abril de 2001   |

ES 2 438 495 T3

| Anticuerpo      | Hibridoma/Plásmido                          | Designación de Depósito de Patente | Fecha de presentación  |
|-----------------|---|------------------------------------|------------------------|
| PSMA 5.4        | PSMA 5.4                                    | PTA-3268                           | 10 de abril de 2001    |
| PSMA 7.1        | PSMA 7.1                                    | PTA-3292                           | 18 de abril de 2001    |
| PSMA 7.3        | PSMA 7.3                                    | PTA-3293                           | 18 de abril de 2001    |
| PSMA 10.3       | PSMA 10.3                                   | PTA-3347                           | 1 de mayo de 2001      |
|                 | PSMA 10.3 HC en pcDNA (SEC ID NO: 7)        | PTA-4413                           | 29 de mayo de 2002     |
|                 | PSMA 10.3 Kappa en pcDNA (SEC ID NO: 13)    | PTA-4414                           | 29 de mayo de 2002     |
| PSMA 1.8.3      | PSMA 1.8.3                                  | PTA-3906                           | 5 de diciembre de 2001 |
| PSMA A3.1.3     | PSMA A3.1.3                                 | PTA-3904                           | 5 de diciembre de 2001 |
| PSMA A3.3.1     | PSMA A3.3.1                                 | PTA-3905                           | 5 de diciembre de 2001 |
| Abgenix 4.248.2 | Abgenix 4.248.2                             | PTA-4427                           | 4 de junio de 2002     |
| Abgenix 4.360.3 | Abgenix 4.360.3                             | PTA-4428                           | 4 de junio de 2002     |
| Abgenix 4.7.1   | Abgenix 4.7.1                               | PTA-4429                           | 4 de junio de 2002     |
| Abgenix 4.4.1   | Abgenix 4.4.1                               | PTA-4556                           | 18 de julio de 2002    |
| Abgenix 4.177.3 | Abgenix 4.177.3                             | PTA-4557                           | 18 de julio de 2002    |
| Abgenix 4.16.1  | Abgenix 4.16.1                              | PTA-4357                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.22.3  | Abgenix 4.22.3                              | PTA-4358                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.28.3  | Abgenix 4.28.3                              | PTA-4359                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.40.2  | Abgenix 4.40.2                              | PTA-4360                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.48.3  | Abgenix 4.48.3                              | PTA-4361                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.49.1  | Abgenix 4.49.1                              | PTA-4362                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.209.3 | Abgenix 4.209.3                             | PTA-4365                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.219.3 | Abgenix 4.219.3                             | PTA-4366                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.288.1 | Abgenix 4.288.1                             | PTA-4367                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.333.1 | Abgenix 4.333.1                             | PTA-4368                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.54.1  | Abgenix 4.54.1                              | PTA-4363                           | 16 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.153.1 | Abgenix 4.153.1                             | PTA-4388                           | 23 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.232.3 | Abgenix 4.232.3                             | PTA-4389                           | 23 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.292.3 | Abgenix 4.292.3                             | PTA-4390                           | 23 de mayo de 2002     |
| Abgenix 4.304.1 | Abgenix 4.304.1                             | PTA-4391                           | 23 de mayo de 2002     |
| AB-PG1-XG1-006  | AB-PG1-XG1-006 cadena pesada (SEC ID NO: 2) | PTA-4403                           | 29 de mayo de 2002     |
|                 | AB-PG1-XG1-006 cadena ligera (SEC ID NO: 8) | PTA-4404                           |                        |
| AB-PG1-XG1-026  | AB-PG1-XG1-026 cadena pesada (SEC ID NO: 3) | PTA-4405                           | 29 de mayo de 2002     |

| Anticuerpo     | Hibridoma/Plásmido  | Designación de Depósito de Patente | Fecha de presentación |
|----------------|---|------------------------------------|-----------------------|
|                | AB-PG1-XG1-026 cadena ligera (SEC ID NO: 9)   | PTA-4406                           |                       |
| AB-PG1-XG1-051 | AB-PG1-XG1-051 cadena pesada (SEC ID NO: 4)<br>AB-PG1-XG1-051 cadena ligera (SEC ID NO: 10) | PTA-4407<br>PTA-4408               | 29 de mayo de 2002    |
| AB-PG1-XG1-069 | AB-PG1-XG1-069 cadena pesada (SEC ID NO: 5)<br>AB-PG1-XG1-069 cadena ligera (SEC ID NO: 11) | PTA-4409<br>PTA-4410               | 29 de mayo de 2002    |
| AB-PG1-XG1-077 | AB-PG1-XG1-077 cadena pesada (SEC ID NO: 6)<br>AB-PG1-XG1-077 cadena ligera (SEC ID NO: 12) | PTA-4411<br>PTA-4412               | 29 de mayo de 2002    |

Para determinar la inhibición competitiva, se puede emplear una variedad de ensayos conocidos por un experto normal en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de competición cruzada para determinar si un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno inhibe competitivamente la unión a PSMA por otro anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno. Estos incluyen métodos a base de células que emplean citometría de flujo o análisis de unión en fase sólida. También se pueden usar otros ensayos que evalúan la capacidad de los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno para competir de forma cruzada por las moléculas de PSMA que no están expresadas en la superficie de las células, en fase sólida o en fase de disolución.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno inhiben competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA en al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99%. La inhibición se puede evaluar a diversas relaciones molares o relaciones másicas; por ejemplo, los experimentos de unión competitiva se pueden llevar a cabo con un exceso molar 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces o más de un primer anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno sobre un segundo anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno.

En otra realización el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, 4.248.2, 4.360.3, 4.7.1, 4.4.1, 4.177.3, 4.16.1, 4.22.3, 4.28.3, 4.40.2, 4.48.3, 4.49.1, 4.209.3, 4.219.3, 4.288.1, 4.333.1, 4.54.1, 4.153.1, 4.232.3, 4.292.3, 4.304.1, 4.78.1, y 4.152.1, PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, por lo tanto, incluyen aquellos que se unen específicamente a un epítipo en PSMA definido por los anticuerpos producidos por los hibridomas o codificados por los plásmidos proporcionados anteriormente en la Tabla 1.

Para determinar el epítipo, se pueden usar métodos de cartografiado de epítopos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar fragmentos (péptidos) del antígeno PSMA (por ejemplo, péptidos sintéticos) que se unen al anticuerpo para determinar si un anticuerpo candidato o su fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo. Para epítopos lineales, se sintetizan péptidos solapantes de una longitud definida (por ejemplo, 8 o más aminoácidos). Los péptidos pueden estar separados por 1 aminoácido, de manera que se prepara una serie de péptidos que cubren cada fragmento de 8 aminoácidos de la secuencia proteica de PSMA. Se pueden preparar unos pocos péptidos usando separaciones más grandes, por ejemplo 2 ó 3 aminoácidos. Además, se pueden sintetizar péptidos más largos (por ejemplo 9-, 10- u 11-meros). La unión de los péptidos a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se puede determinar usando metodologías estándar, incluyendo ensayos de resonancia de

plasmones de superficie (BIAcore) y ELISA. Para el examen de epítomos conformacionales, se pueden usar fragmentos de PSMA más grandes. Se han descrito y se pueden usar otros métodos que usan espectrometría de masas para definir epítomos conformacionales (véase, por ejemplo, Baerga-Ortiz et al., *Protein Science* 11:1300-1308, 2002 y referencias citadas allí). Todavía otros métodos para la determinación de los epítomos se proporcionan en trabajos de referencia de laboratorio estándar, tales como Unidad 6.8 ("Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitopes") y Unidad 9.8 ("Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries") de *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., eds., John Wiley & Sons. Los epítomos se pueden confirmar introduciendo mutaciones de punto o supresiones en un epítomo conocido, y ensayando entonces la unión con uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para determinar qué mutaciones reducen la unión de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

En realizaciones particulares, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los cuales se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son aquellos producidos por hibridomas denominados aquí como PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, y Abgenix 4.152.1, respectivamente. En otras realizaciones, los anticuerpos son aquellos codificados por los plásmidos enumerados en la Tabla 1. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos son aquellos que comprenden una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la cadena pesada de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en las secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la cadena ligera de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13.

Como se usa aquí, los nombres de los hibridomas o plásmidos depositados se pueden usar de forma intercambiable con los nombres de los anticuerpos. Será claro para el experto normal en la técnica cuándo el nombre pretende referirse al anticuerpo o cuándo se refiere a los plásmidos o hibridomas que codifican o producen los anticuerpos, respectivamente. Adicionalmente, los nombres de los anticuerpos pueden ser una forma abreviada del nombre mostrado en la Tabla 1. Por ejemplo, el anticuerpo AB-PG1-XG1-006 se puede denominar AB-PG1-XG1-006, PG1-XG1-006, XG1-006, 006, etc. En otro ejemplo, el nombre del anticuerpo PSMA 4.232.3 se puede denominar PSMA 4.232.3, 4.232.1, 4.232, etc. Se pretende que todas las variaciones en el nombre del anticuerpo se refieran al mismo anticuerpo y no a uno diferente.

Los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los cuales se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, incluyen aquellos codificados por conjuntos particulares de secuencias de cadena pesada y ligera. En una realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-006) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 2 y 8. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-026) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 3 y 9. En todavía otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-051) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 4 y 10. En todavía otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-069) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 5 y 11. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-077) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 6 y 12. En todavía otra realización, el anticuerpo (PSMA 10.3) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 7 y 13. En otras realizaciones, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los cuales se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, incluyen una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32. En una realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-006) incluye una secuencia variable inmunoglobulínica codificada por moléculas de ácido nucleico que comprenden la región o regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico expuestas como SEC ID NOs: 14 y 16. De forma similar, el anticuerpo puede ser uno que incluye una secuencia variable inmunoglobulínica que comprende las secuencias de aminoácido expuestas como SEC ID NOs: 15 y 17. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-026) incluye una secuencia variable inmunoglobulínica codificada por moléculas de ácido nucleico que comprenden la región o regiones codificantes de secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 18 y 20 o incluye una secuencia variable inmunoglobulínica que comprende las secuencias de aminoácido expuestas como SEC ID NOs 19 y 21. En todavía otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-051) incluye una secuencia variable inmunoglobulínica codificada por las moléculas de ácido nucleico que comprenden la región o regiones codificantes de secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 22 y 24 o incluye una secuencia variable inmunoglobulínica que comprende las secuencias de aminoácido expuestas como SEC ID NOs: 23 y 25. En todavía otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-069) incluye una

secuencia variable inmunoglobulínica codificada por las moléculas de ácido nucleico que comprenden la región o regiones codificantes de secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 26 y 28 o incluye una secuencia variable inmunoglobulínica que comprende las secuencias de aminoácido expuestas como SEC ID NOs: 27 y 29. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-077) incluye una secuencia variable inmunoglobulínica codificada por las moléculas de ácido nucleico que comprenden la región o regiones codificantes de secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 30 y 32 o incluye una secuencia variable inmunoglobulínica que comprende las secuencias de aminoácido expuestas como SEC ID NOs: 31 y 33. En otras realizaciones, el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido expuestas como: SEC ID NOs: 15, 19, 23, 27 y 31, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácido expuestas como: SEC ID NOs: 17, 21, 25, 29 y 33.

Como se usa aquí, una "región codificante" se refiere a una región de una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia polipeptídica. Su uso aquí es consistente con el significado reconocido conocido en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son aquellos que son codificados por moléculas de ácido nucleico que son muy homólogas a los ácidos nucleicos anteriores. La molécula de ácido nucleico homóloga puede comprender, en algunas realizaciones, una secuencia nucleotídica que es al menos alrededor de 90% idéntica a la secuencia nucleotídica proporcionada aquí. En otras realizaciones, la secuencia nucleotídica es al menos alrededor de 95% idéntica, al menos alrededor de 97% idéntica, al menos alrededor de 98% idéntica, o al menos alrededor de 99% idéntica a una secuencia nucleotídica proporcionada aquí. La homología se puede calcular usando diversas herramientas de software públicamente disponibles, bien conocidas por el experto normal en la técnica. Las herramientas ejemplares incluyen el sistema BLAST disponible de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en los National Institutes of Health.

Otro método para identificar secuencias nucleotídicas muy homólogas es vía hibridación de ácidos nucleicos. De este modo, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, incluyen anticuerpos que tienen una propiedad de unión a PSMA y/u otras propiedades funcionales descritas aquí, que son codificados por moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones muy restrictivas a las moléculas de ácido nucleico anteriores. La identificación de secuencias relacionadas también se puede lograr usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras técnicas de amplificación adecuadas para clonar secuencias de ácidos nucleicos relacionadas. Los cebadores de la PCR se pueden seleccionar para amplificar porciones de una secuencia de ácido nucleico de interés, tal como una CDR.

La expresión "condiciones de restricción elevada", como se usa aquí, se refiere a parámetros con los que está familiarizada la técnica. Los parámetros de hibridación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en referencias que compilan tales métodos, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Un ejemplo de condiciones de restricción elevada es la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5X SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de seroalbúmina bovina, 2,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7), 0,5% de SDS, 2 mM de EDTA). SSC es 0,15 M de cloruro de sodio/0,015 M de citrato de sodio, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetraacético. Tras la hibridación, una membrana sobre la que se transfiere el ácido nucleico se lava, por ejemplo, en 2X SSC a temperatura ambiente, y después a 0,1-0,5X SSC/0,1X SDS a temperaturas de hasta 68°C.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, C<sub>L</sub>. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones del marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDRs y cuatro frecuencias, dispuestas desde el término amino hacia el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedante, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa aquí, se refiere a una o más porciones de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (es decir, PSMA). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados en la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub>; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab

enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V<sub>H</sub> y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un único brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546) que consiste en un dominio V<sub>H</sub>; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Las CDRs, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, contribuyen a la especificidad del anticuerpo. Debido a que estas regiones CDR, y en particular la región CDR3, confieren especificidad a antígeno en el anticuerpo, estas regiones se pueden incorporar en otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para conferir la especificidad a antígeno idéntica sobre aquel anticuerpo o péptido. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V y V<sub>H</sub>, están codificados por genes distintos, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que se obtengan como una única cadena proteica en la que las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios también pretenden estar englobados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando procedimientos convencionales, tales como procedimientos de fragmentación proteolítica, como se describen en J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), así como mediante otras técnicas conocidas por aquellos con pericia en la técnica. Los fragmentos se seleccionan en busca de la utilidad de la misma manera como se hace con los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos, o sus fragmentos de unión a antígeno, de los ADCs están, en algunas realizaciones, aislados. "Aislados", como se usa aquí, pretende referirse a un anticuerpo (o su fragmento de unión a antígeno) que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno) que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PSMA está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos no relacionados con PSMA). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de PSMA puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de PSMA). Por ejemplo, se han encontrado homólogos de PSMA en otras especies, tales como el cerdo (número de acceso de GenBank 077564 (aminoácido) y rata (números de acceso de GenBank U75973 (mRNA) y AAC53423 (aminoácido)). En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados aquí se unen específicamente tanto a PSMA humano como a un homólogo de PSMA procedente de otra especie. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen específicamente a PSMA humano pero no reaccionan de forma cruzada con homólogos de PSMA procedentes de otras especies.

Además, un anticuerpo aislado (o su fragmento de unión a antígeno) puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas. La expresión "sustancialmente puro" significa que un anticuerpo (o su fragmento de unión a antígeno) está esencialmente libre de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para su uso pretendido. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno sustancialmente puros se pueden producir mediante técnicas bien conocidas en la técnica. Debido a que un anticuerpo aislado (o su fragmento de unión a antígeno) se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el anticuerpo (o su fragmento de unión a antígeno) puede comprender solamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El anticuerpo (o su fragmento de unión a antígeno) está no obstante aislado, por cuanto se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociado en sistemas vivos, es decir, aislado de otras proteínas.

Como se usa aquí, "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado, en este caso PSMA (por ejemplo, PSMA humano). Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína), que es un antígeno distinto de PSMA, una isoforma o variante de PSMA, o un antígeno estrechamente relacionado.

El anticuerpo engloba diversos isotipos de anticuerpo, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE. Como se usa aquí, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que es codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa, o pueden incluir sólo un fragmento de unión a antígeno tal como el dominio constante y/o variable del anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE, o podría consistir en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y un fragmento Fv.

Los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son, en algunas realizaciones, monoclonales. Los anticuerpos se pueden producir mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica. La producción de anticuerpos monoclonales se puede efectuar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular. El proceso de producción de anticuerpos monoclonales implica obtener células somáticas inmunitarias con el potencial para producir anticuerpo, en particular linfocitos B, que se han inmunizado previamente con el antígeno de interés ya sea *in vivo* o *in vitro* y que son adecuados para la fusión con una estirpe de mieloma de células B.

Los linfocitos de mamífero típicamente se inmunizan mediante inmunización *in vivo* del animal (por ejemplo, un

ratón) con la proteína o polipéptido deseado. Tales inmunizaciones se repiten según sea necesario a intervalos de hasta varias semanas para obtener un título suficiente de anticuerpos. Una vez inmunizados, los animales se pueden usar como una fuente de linfocitos productores de anticuerpos. Tras la última revacunación de antígeno, los animales se sacrifican y se retiran las células del bazo. Los linfocitos de ratón dan un mayor porcentaje de fusiones estables con las estirpes de mieloma de ratón descritas aquí. Por ejemplo, de los ratones BALB/c. Sin embargo, otras razas de ratón, conejo, hámster, ovejas y rana también se pueden usar como hospedantes para preparar células productoras de anticuerpos. Véase Goding (en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., p. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986). En particular, se pueden usar razas de ratón que tienen genes de inmunoglobulinas humanas insertados en el genoma (y que no pueden producir inmunoglobulinas de ratón). Los ejemplos incluyen las razas de ratón HuMAb producidas por Medarex/GenPharm International, y las razas Xenomouse producidas por Abgenix. Tales ratones producen moléculas inmunoglobulínicas completamente humanas en respuesta a la inmunización. En algunas realizaciones, por lo tanto, los ADCs comprenden un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a PSMA.

Aquellas células productoras de anticuerpos que están en la etapa de plasmablasto en división se fusionan preferentemente. Las células somáticas se pueden obtener a partir de los ganglios linfáticos, bazos y sangre periférica de animales sensibilizados con el antígeno, y las células linfáticas de elección dependen en gran medida de su utilidad empírica en el sistema de fusión particular. Los linfocitos que segregan anticuerpos se fusionan entonces con células de mieloma de células B (de ratón) o células transformadas, que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciendo de ese modo una estirpe celular inmortal que segrega inmunoglobulina. Las células fusionadas resultantes, o hibridomas, se cultivan, y las colonias resultantes se seleccionan en busca de la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Las colonias productoras de tales anticuerpos se clonan, y se hacen crecer *in vivo* o *in vitro* para producir grandes cantidades de anticuerpo. En Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975), se expone una descripción de la base teórica y metodología práctica de la fusión.

Como alternativa, las células somáticas humanas capaces de producir anticuerpo, específicamente linfocitos B, son adecuadas para la fusión con estirpes celulares de mieloma. Aunque se pueden usar linfocitos B de bazos, amígdalas o ganglios linfáticos de un individuo a los que se les ha realizado una biopsia, también se pueden usar linfocitos B de sangre periférica más fácilmente accesibles. Los linfocitos pueden derivar de pacientes con carcinomas de próstata diagnosticados u otro cáncer que expresa PSMA. Además, las células B humanas se pueden immortalizar directamente mediante el virus de Epstein-Barr (Cole et al., 1995, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96). En principio, aunque se pueden usar procedimientos de hibridación de células somáticas, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, tales como la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Las estirpes celulares de mieloma adecuadas para uso en procedimientos de fusión productores de hibridomas pueden ser no productoras de anticuerpos, pueden tener una elevada eficiencia de fusión, y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que apoyan el crecimiento de los hibridomas deseados. Los ejemplos de tales estirpes celulares de mieloma que se pueden usar para la producción de estirpes celulares fusionadas incluyen P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4.1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todas derivadas de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210 derivadas de ratas, y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todas derivadas de seres humanos (Goding, en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., p. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press, 1986; Campbell, en *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, eds. p. 75-83, Ámsterdam, Elsevier, 1984).

La fusión con células de mieloma de mamífero u otras parejas de fusión capaces de replicarse indefinidamente en el cultivo celular se efectúa mediante técnicas estándar y bien conocidas, por ejemplo usando polietilenglicol ("PEG") u otros agentes de fusión (véase Milstein y Kohler, *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976)).

En otras realizaciones, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son anticuerpos recombinantes. La expresión "anticuerpo recombinante", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulinas de otras especies, anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedante, anticuerpos aislados de una librería combinatoria recombinante de anticuerpos, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el ajuste de secuencias génicas de inmunoglobulinas a otras secuencias de ADN.

En todavía otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos o humanizados. Como se usa aquí, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que combina las regiones variables o hipervariables murinas con la región constante humana o regiones de armazón constantes y variables. Como se usa aquí, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que retiene sólo las CDRs de unión a antígeno del anticuerpo progenitor en asociación con regiones de armazón humanas (véase Waldmann, 1991, *Science* 252:1657). Se espera que tales anticuerpos quiméricos o humanizados que retienen la especificidad de unión del anticuerpo murino tengan inmunogenicidad reducida cuando se administran *in vivo* como se proporciona aquí.

Según una realización alternativa, los anticuerpos monoclonales de los ADCs pueden estar en forma de un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico. La expresión “anticuerpo biespecífico” pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido, o complejo proteico o peptídico, que tiene dos especificidades de unión diferentes que se une a o interacciona con (a) un antígeno de la superficie celular y (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora. La expresión “anticuerpo multiespecífico” pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido, o complejo proteico o peptídico, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes que se une a o interacciona con (a) un antígeno de la superficie celular, (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora, y (c) al menos algún otro componente. En consecuencia, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos, y otros anticuerpos multiespecíficos que están dirigidos a PSMA o a receptores de Fc en células efectoras. La expresión “anticuerpos biespecíficos” incluye además dianticuerpos. Los dianticuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes, en los que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una única cadena polipeptídica, pero que usan un ligador que es tan corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poijak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Un anticuerpo biespecífico puede estar formado de una región de unión a antígeno específica para PSMA y una región de unión a antígeno específica para una célula efectora que tiene actividad tumoricida o inhibidora de tumores. Las dos regiones de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico están enlazadas químicamente o se pueden expresar mediante una célula manipulada genéticamente mediante ingeniería para producir el anticuerpo biespecífico. (Véase generalmente Fanger et al., 1995 Drug News & Perspec. 8(3):133-137). Las células efectoras adecuadas que tienen actividad tumoricida incluyen, pero no se limitan a, células T citotóxicas (principalmente células CD8<sup>+</sup>), células asesinas naturales, etc. Una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico se puede administrar a un sujeto con cáncer, y el anticuerpo biespecífico extermina y/o inhibe la proliferación de las células cancerosas tras la localización en sitios de tumores primarios o metastásicos que poseen PSMA.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son anticuerpos humanos. La expresión “anticuerpo humano”, como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias inmunoglobulínicas de la estirpe de células germinales humanas. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias inmunoglobulínicas de la estirpe de células germinales humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o específica del sitio *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, como se usa aquí, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la estirpe de células germinales de otra especie mamífera, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas (denominados aquí como “anticuerpos humanizados”). Los anticuerpos humanos dirigidos contra PSMA se pueden generar usando ratones transgénicos que poseen partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema del ratón. Algunos ejemplos de los cuales se describen aquí en otra parte.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de los loci de las cadenas pesada y ligera inmunoglobulínicas humanas. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y referencias citadas allí. Estos animales se han modificado genéticamente de manera que hay una supresión funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican además para contener todo o una porción del locus del gen inmunoglobulínico de la estirpe de células germinales humano, de manera que la inmunización de estos animales da como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos frente al antígeno de interés. Tras la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales se pueden preparar según técnicas de hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tienen secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, y por lo tanto no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) cuando se administren a seres humanos. En general, pero sin pretender ser limitantes, los ratones tienen 6-16 semanas con la primera inmunización. Por ejemplo, para inmunizar los ratones intraperitonealmente (IP), se puede usar una preparación purificada o enriquecida de antígeno PSMA (por ejemplo, PSMA recombinante o células que expresan PSMA), aunque también son posibles otras rutas de inmunización conocidas por una persona de pericia normal en la técnica. El antígeno PSMA se puede inyectar en combinación con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo, y, en algunas realizaciones, la inyección inicial es seguida de inmunizaciones de recuerdo con antígeno en un adyuvante, tal como adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria se puede monitorizar durante el protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas, por ejemplo, de sangrados retroorbitales. El plasma se puede seleccionar mediante ELISA, y los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti-PSMA se pueden usar para fusiones. Los ratones se pueden revacunar intraperitonealmente con antígeno 3 días antes del sacrificio y de la eliminación del bazo.

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de los ADCs se puede seleccionar, en algunas realizaciones, en busca de la capacidad para unirse a células vivas que expresan PSMA. A fin de demostrar la unión a células vivas que expresan PSMA, se puede usar citometría de flujo. Por ejemplo, estirpes celulares que expresan PSMA (que se hacen crecer en condiciones de crecimiento estándar) o células de cáncer de próstata que expresan PSMA se

pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene 0,1% de Tween 80 y 20% de suero de ratón, y se pueden incubar a 37°C durante 1 hora. Tras el lavado, las células se pueden hacer reaccionar con anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con fluoresceína (si se usaron anticuerpos humanos anti-PSMA) en las mismas condiciones que la tinción con anticuerpos primarios. Las muestras se pueden analizar mediante un instrumento clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), usando propiedades de dispersión de la luz y laterales para reunir células individuales. Se puede usar un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia (además de o en lugar del ensayo de citometría de flujo). Las células se pueden teñir y examinar mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad reducida, dependiendo de la densidad del antígeno. Se concluye que los ADCs, en algunas realizaciones, se unen a células vivas. Los ADCs, en algunas realizaciones, no requieren por lo tanto la lisis celular para unirse a PSMA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden promover la citolisis de células que expresan PSMA. La citolisis se puede mediar por el complemento, o puede estar mediada por células efectoras. En una realización, la citolisis se lleva a cabo en un organismo vivo, tal como un mamífero, y la célula viva es una célula tumoral. Los ejemplos de tumores que se pueden seleccionar como dianas con los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno incluyen cualquier tumor que exprese PSMA (esto incluye tumores con neovasculatura que expresa PSMA), tal como tumores de próstata, de vejiga, de mama, de páncreas, de hígado, de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico), de colon y de riñón, así como melanomas y sarcomas. En una realización, la célula tumoral es una célula tumoral de próstata.

El ensayo de la actividad citolítica *in vitro* mediante ensayo de liberación de cromo puede proporcionar un cribado inicial antes del ensayo de los modelos *in vivo*. Este ensayo se puede llevar a cabo usando ensayos estándar de liberación del cromo. De forma breve, células polimorfonucleares (PMN), u otras células efectoras, procedentes de donantes sanos se pueden purificar mediante centrifugación por densidad Ficoll Hypaque, seguido de la lisis de eritrocitos contaminantes. Las PMNs lavadas se pueden suspender en RPMI suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor, y se pueden mezclar con células que expresan PSMA marcadas con <sup>51</sup>Cr, a diversas relaciones de células efectoras a células tumorales (células efectoras:células tumorales). Las IgGs anti-PSMA purificadas se pueden añadir entonces a diversas concentraciones. La IgG irrelevante se puede usar como un control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 0-120 minutos a 37°C. Las muestras se pueden evaluar para citolisis midiendo la liberación de <sup>51</sup>Cr en el sobrenadante del cultivo. Los anticuerpos monoclonales anti-PSMA y/o los ADCs se pueden ensayar también en combinaciones entre sí para determinar si la citolisis es potenciada con múltiples anticuerpos monoclonales y/o ADCs. Los anticuerpos que se unen a PSMA y/o ADCs también se pueden ensayar en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones) para determinar su eficacia mediante la citolisis y exterminando células cancerosas que expresan PSMA, por ejemplo células de tumor prostático.

Los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, se pueden seleccionar, por ejemplo, basándose en los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:

- 1) unión a células vivas que expresan PSMA;
- 2) elevada afinidad de unión a PSMA;
- 3) unión a un único epítipo en PSMA (es decir, un epítipo no reconocido por un anticuerpo previamente producido);
- 4) opsonización de células que expresan PSMA;
- 5) mediación de la inhibición del crecimiento, fagocitosis y/o exterminio de células que expresan PSMA en presencia de células efectoras;
- 6) modulación (inhibición o potenciación) de las actividades de NAALADasa, folato hidrolasa, dipeptidil peptidasa IV y/o  $\gamma$ -glutamil hidrolasa;
- 7) inhibición del crecimiento, detención del ciclo celular y/o citotoxicidad en ausencia de células efectoras;
- 8) internalización de PSMA;
- 9) unión a un epítipo conformacional en PSMA;
- 10) reactividad cruzada mínima con células o tejidos que no expresan PSMA; y
- 11) unión preferente a formas dímeras de PSMA en vez de a formas monómeras de PSMA.

Los anticuerpos de los ADCs, o a partir de los que derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, pueden satisfacer uno o más, y posiblemente todos, estos criterios.

En una realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un epítipo conformacional, tal como un epítipo conformacional en el dominio extracelular de PSMA. Para determinar si un anticuerpo anti-PSMA o su

fragmento de unión a antígeno se une a epítomos conformacionales, cada anticuerpo se puede evaluar en ensayos usando proteína nativa (por ejemplo, inmunoprecipitación no desnaturizante, análisis de citometría de flujo de la unión a la superficie celular) y proteína desnaturizada (por ejemplo, transferencia Western, inmunoprecipitación de proteínas desnaturizadas). Una comparación de los resultados indicará si el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un epítomo conformacional. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que se unen a proteína nativa pero no a proteína desnaturizada son, en algunas realizaciones, aquellos que se unen a epítomos conformacionales. Se concluye que los ADCs, en algunas realizaciones, se unen a epítomos conformacionales de PSMA.

En otra realización, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une a un epítomo específico de dímero en PSMA (es decir, un epítomo conformacional, específico de dímero, único para la estructura cuaternaria de PSMA dímero). Generalmente, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno que se unen a un epítomo específico de dímero se unen preferentemente al dímero de PSMA en vez de al monómero de PSMA. Para determinar si un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une preferentemente (es decir, selectiva y/o específicamente) a un dímero de PSMA, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se puede evaluar en ensayos (por ejemplo, inmunoprecipitación seguida de transferencia Western) usando proteína de PSMA dímera nativa y proteína de PSMA monómera disociada. Una comparación de los resultados indicará si el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une preferentemente al dímero. En algunas realizaciones, los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se unen al dímero de PSMA pero no a la proteína de PSMA monómera. Se concluye que los ADCs, en algunas realizaciones, se unen a un epítomo específico de dímero en PSMA.

Los ADCs proporcionados incluyen aquellos que se unen selectivamente a multímeros de PSMA. Como se usa aquí, particularmente con respecto a la unión de multímeros de PSMA por los ADCs, "se une selectivamente" significa que un anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de los ADCs se une preferentemente a un multímero de la proteína de PSMA (por ejemplo, con mayor avidéz, mayor afinidad de unión) en vez de a un monómero de la proteína de PSMA. En algunas realizaciones, los ADCs de la invención se unen a un multímero de la proteína de PSMA con una avidéz y/o afinidad de unión que es 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 70 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 500 veces, 1000 veces o más que la exhibida por el ADC para un monómero de la proteína de PSMA. En algunas realizaciones, el ADC se puede unir selectivamente a un multímero de la proteína de PSMA, y no a un monómero de la proteína de PSMA, es decir, se une exclusivamente a un multímero de la proteína de PSMA. En algunas realizaciones, el ADC se une selectivamente a un dímero de la proteína de PSMA.

Un multímero de la proteína de PSMA, como se usa aquí, es un complejo proteico de al menos dos proteínas de PSMA o sus fragmentos. Los multímeros de la proteína de PSMA pueden estar compuestos de diversas combinaciones de proteínas de PSMA de longitud completa (por ejemplo, SEC ID NO: 1), PSMA soluble recombinante (rsPSMA, por ejemplo, aminoácidos 44-750 de SEC ID NO: 1) y fragmentos de los anteriores que forman multímeros (es decir, que retienen el dominio proteico requerido para formar dímeros y/o multímeros de mayor orden de PSMA). En algunas realizaciones, al menos una de las proteínas de PSMA que forma el multímero es un polipéptido de PSMA recombinante soluble (rsPSMA). Los multímeros de una proteína de PSMA pueden ser dímeros, tales como los formados a partir de proteína de PSMA recombinante soluble. En una realización, el dímero es un homodímero de rsPSMA. Se cree que los multímeros de la proteína de PSMA citados aquí asumen una conformación nativa, y pueden tener tal conformación. Las proteínas de PSMA, en ciertas realizaciones, están unidas juntas de forma no covalente para formar el multímero de la proteína de PSMA. Se ha descubierto que la proteína de PSMA se asocia de forma no covalente para formar dímeros en condiciones no desnaturizantes. Los multímeros de la proteína de PSMA pueden retener las actividades de PSMA. La actividad de PSMA puede ser una actividad enzimática, tal como actividad de folato hidrolasa, actividad de NAALADasa, actividad de dipeptidil peptidasa IV o actividad de  $\gamma$ -glutamil hidrolasa. Los métodos para ensayar la actividad de PSMA de los multímeros son bien conocidos en la técnica (revisado por O'Keefe et al. en: Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics, L.W.K. Chung, W.B. Isaacs y J.W. Simons (eds.) Humana Press, Totowa, NJ, 2000, p. 307-326).

El anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de los ADCs se puede unir a y se puede internalizar con PSMA expresado en células. El mecanismo mediante el cual el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se internaliza con PSMA no es crítico para la práctica de los métodos proporcionados aquí. Por ejemplo, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede inducir internalización de PSMA. Como alternativa, la internalización del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno puede ser el resultado de internalización normal del PSMA. Se concluye que el ADC se puede internalizar con PSMA expresado en células.

Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno, y por lo tanto los ADCs, se pueden unir específicamente, en algunas realizaciones, a PSMA de la superficie celular y/o a rsPSMA con afinidad subnanomolar. Las afinidades de unión pueden ser alrededor de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos, alrededor de  $1 \times 10^{-10}$  M, o alrededor de  $1 \times 10^{-11}$  M o menos. En una realización, la afinidad de unión es menor que alrededor de  $5 \times 10^{-10}$  M.

Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno pueden modular, en algunas realizaciones, al menos una actividad enzimática de PSMA. La actividad se puede seleccionar del grupo que consiste en actividad de dipeptidasa ácida enlazada en  $\alpha$  N-acetilada (NAALADasa), actividad de folato hidrolasa, actividad de dipeptidil peptidasa IV,

actividad de  $\gamma$ -glutamil hidrolasa, y sus combinaciones, *in vitro* o *in vivo*. La modulación puede ser potenciación o inhibición de al menos una actividad enzimática de PSMA.

Los niveles tisulares de la actividad de NAALADasa se pueden determinar solubilizando en detergente y homogeneizando tejidos, peletizando el material insoluble mediante centrifugación, y midiendo la actividad de NAALADasa en el sobrenadante que queda. Igualmente, la actividad de NAALADasa en fluidos corporales se puede medir peletizando en primer lugar el material celular mediante centrifugación y llevando a cabo un ensayo enzimático típico para actividad de NAALADasa en el sobrenadante. Los ensayos enzimáticos de NAALADasa se han descrito por Frieden, 1959, J. Biol. Chem., 234:2891. En este ensayo, el producto de reacción de la enzima NAALADasa es ácido glutámico. Éste deriva de la escisión de N-acetilaspártilglutamato catalizada por enzimas para producir ácido N-acetilaspártico y ácido glutámico. El ácido glutámico, en una etapa que requiere  $\text{NAD(P)}^+$ , produce 2-oxoglutarato más  $\text{NAD(P)H}$  en una reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa. El transcurso de la reacción se puede medir fácil y convenientemente mediante el cambio de absorbancia a 340 nm debido a la conversión de  $\text{NAD(P)}^+$  en  $\text{NAD(P)H}$ .

La actividad de folato hidrolasa de PSMA se puede medir realizando ensayos enzimáticos como se describe por Heston y otros (por ejemplo, Clin. Cancer Res. 2(9): 1445-51,1996; Urology 49(3A Suppl):104-12,1997). Las folato hidrolasas tales como PSMA eliminan los glutamatos enlazados mediante gamma a partir de folatos poliglutamados. La actividad de folato hidrolasa se puede medir usando sustratos tales como metotrexato tri-gamma glutamato (MTXGlu3), metotrexato di-gamma glutamato (MTXGlu2) o pteroilpentaglutamato (PteGlu5), por ejemplo usando electroforesis capilar (véase Clin. Cancer Res. 2(9):1445-51, 1996). Las incubaciones en el tiempo de PSMA con sustratos poliglutamados se puede seguir mediante separación y detección de los productos de la hidrólisis.

Como se menciona anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que los ADCs proporcionados exterminan células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, y se pueden usar para tratar cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. Por lo tanto, se proporcionan métodos en los que se administra un ADC a un sujeto con un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. Las células cancerosas del cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, en algunas realizaciones, pueden ser células de un tumor (por ejemplo, tumor maligno primario) o células de una o más metástasis.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados dan como resultado el retraso o la inhibición de la progresión del cáncer en el sujeto. Como se usa aquí, "retraso o inhibición de la progresión del cáncer" pretende referirse a cualquier ralentización o detención de la progresión del cáncer en el sujeto. Una ralentización o detención de la progresión del cáncer incluye una reducción o estabilización en el número de células cancerosas, el número de tumores, y/o el número de metástasis en un sujeto. Una ralentización o detención también pretende incluir una reducción o estabilización en el tamaño (por ejemplo, longitud o volumen) de tumores y/o tamaño de las metástasis en un sujeto. Los métodos para evaluar la progresión de cáncer en un sujeto serán manifiestos para una persona de pericia normal en la técnica. Además, en algunas realizaciones, el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se puede demostrar mediante un cambio en al menos un biomarcador para metástasis ósea o metabolismo óseo en comparación con un valor de línea base antes del tratamiento con el ADC en el sujeto. En algunas realizaciones, el biomarcador es N-telopéptido, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, calcitonina, calcio, piridinilina o desoxipiridinilina. En realizaciones adicionales, el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se demuestra mediante cambios en la imagen radiográfica en la carga tumoral en comparación con una imagen radiográfica de línea base en el sujeto antes del tratamiento con ADC. Los métodos para evaluar cambios radiográficos incluyen, por ejemplo, barrido óseo, barrido con tomografía axial computerizada (CT), y formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI). Otros métodos serán bien conocidos por los expertos normales en la técnica. En algunas realizaciones, el retraso o la inhibición de la progresión se evidencia por un cambio en la imagen radiográfica de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% o más.

El tratamiento con los ADCs proporcionados también puede dar como resultado el incremento en la supervivencia de los sujetos con un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. En algunas realizaciones, la supervivencia de tal sujeto aumenta en 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28 o 32 semanas o más, en comparación con la supervivencia media de los sujetos con el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, a los que no se les administra el ADC. En otras realizaciones, la supervivencia aumenta 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28 o 32 semanas o más, en comparación con el tiempo de supervivencia esperado para el sujeto antes del tratamiento con el ADC. En otras realizaciones de cualquiera de las anteriores, la supervivencia del sujeto aumenta en 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 24 meses o más según cualquier comparación. En una realización, el sujeto tratado con un ADC es aquel que tiene cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano, y el incremento en la supervivencia del sujeto es como se compara con la supervivencia media de los sujetos que tienen cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras la terapia previa con taxano, y no ha sido tratado con el ADC. En otra realización, el sujeto tratado con un ADC es aquel que tiene cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras la terapia previa con taxano, y el incremento en la supervivencia del sujeto es como se compara con el tiempo de supervivencia esperado para el sujeto antes del tratamiento con el ADC.

En otras realizaciones, el tratamiento con un ADC como se proporciona da como resultado un incremento en la calidad de vida para el sujeto en comparación con la calidad de vida experimentada por el sujeto antes del

tratamiento con el ADC. Como se usa aquí, “un incremento en la calidad de vida” se refiere a cualquier mejora en el confort del sujeto, nivel de energía y/o capacidad para funcionar en una actividad como resultado de la administración de un ADC como se proporciona aquí.

5 En todavía otras realizaciones, el tratamiento con un ADC puede dar como resultado una disminución en el nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs), en comparación con un nivel de línea base. En otras realizaciones, el tratamiento con un ADC puede dar como resultado una disminución o estabilización (ningún incremento o disminución significativo) en un nivel sérico de antígeno específico de la próstata (PSA) en comparación con un nivel de línea base de PSA. Los métodos para evaluar el nivel circulante de CTCs o el nivel sérico de PSA son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

10 También fue sorprendente descubrir que en sujetos con un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, se puede lograr una reducción en el volumen tumoral incluso para tumores muy grandes con la administración de un ADC. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sujeto tiene un tumor con un volumen tumoral que es al menos 100 mm<sup>3</sup>, 200 mm<sup>3</sup>, 300 mm<sup>3</sup>, 400 mm<sup>3</sup>, 500 mm<sup>3</sup>, 600 mm<sup>3</sup>, 700 mm<sup>3</sup>, 800 mm<sup>3</sup>, 900 mm<sup>3</sup>, 1000 mm<sup>3</sup>, 1100 mm<sup>3</sup>, 1200 mm<sup>3</sup>, 1300 mm<sup>3</sup>, 1400 mm<sup>3</sup>, 1500 mm<sup>3</sup>, 1600 mm<sup>3</sup>, 1700 mm<sup>3</sup>, 1800 mm<sup>3</sup>, 1900 mm<sup>3</sup> o 2000 mm<sup>3</sup>. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un volumen tumoral que es mayor que 700 mm<sup>3</sup>. En otras realizaciones, el sujeto tiene un tumor con una longitud de al menos 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, 15 mm, 16 mm, 17 mm, 18 mm, 19 mm, 20 mm, 21 mm, 22 mm, 23 mm, 24 mm, 25 mm o 30 mm o más. En otras realizaciones, el volumen o longitud tumoral se reducen en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% o 99% como resultado del tratamiento con un ADC como se proporciona aquí. En una realización adicional, el tumor se erradica. Las técnicas para determinar la presencia de un tumor y para medir su tamaño son bien conocidas por aquellos de pericia normal en la técnica.

Los ADCs se pueden usar en diversos métodos *in vitro* e *in vivo* para efectuar los puntos finales terapéuticos mencionados anteriormente. Los métodos proporcionados se pueden usar para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, *in vitro* o *in vivo*. También se proporcionan métodos para tratar cualquier cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. Tal cáncer es, por ejemplo, cáncer de próstata. Tal cáncer también puede ser, por ejemplo, un cáncer en el que se expresa PSMA en las células de la neovasculatura tumoral. Una lista ejemplar de tales cánceres se proporciona aquí en otra parte.

En algunas realizaciones, dos o más ADCs diferentes se usan en combinación. En otra realización, uno o más anticuerpos anti-PSMA no conjugados, o sus fragmentos de unión a antígeno, se pueden combinar con uno o más ADCs en una sola terapia para lograr el efecto terapéutico deseado. Como ilustración, un anticuerpo anti-PSMA no conjugado que media el exterminio altamente eficaz de células diana en presencia de células efectoras, y/o que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA, se puede usar con uno o más ADCs. En aún otra realización, los ADCs se pueden combinar con uno o más agentes antitumorales adicionales, tales como corticosteroides, tales como prednisona o hidrocortisona; agentes inmunoestimulantes; inmunomoduladores, o cualquier combinación de los mismos.

Los agentes antitumorales incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos y agentes que actúan sobre la neovasculatura tumoral. Los agentes citotóxicos incluyen radionúclidos citotóxicos, toxinas químicas y toxinas proteicas. El radionúclido citotóxico o isótopo radioterapéutico puede ser un isótopo que emite partículas alfa, tal como <sup>225</sup>Ac, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>212</sup>Pb, <sup>224</sup>Ra o <sup>223</sup>Ra. Como alternativa, el radionúclido citotóxico puede ser un isótopo que emite partículas beta, tales como <sup>186</sup>Rh, <sup>188</sup>Rh, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>131</sup>I, <sup>67</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>153</sup>Sm o <sup>166</sup>Ho. Además, el radionúclido citotóxico puede emitir electrones Auger y electrones de baja energía, e incluye los isótopos <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I o <sup>77</sup>Br.

Las toxinas químicas o agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen miembros de la familia de moléculas de enodíinos, tales como calicheamicina y esperamicina. Las toxinas químicas también se pueden escoger del grupo que consiste en metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Otros agentes antineoplásicos incluyen dolastatinas (patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.034.065 y 6.239.104) y sus derivados. Las dolastatinas y sus derivados incluyen dolastatina 10 (dolavalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-dolafenina) y los derivados auristatina PHE (dolavalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-éster metílico) (Pettit, G.R. et al., *Anticancer Drug Des.* 13(4):243-277, 1998; Woyke, T. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12):3580-3584, 2001), y aurastatina E y similares. Las toxinas también incluyen lectinas venenosas, toxinas vegetales tales como ricina, abrina, modeccina, botulina y toxinas de la difteria. Otros agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica.

Los agentes que actúan sobre la vasculatura tumoral incluyen agentes de unión a tubulina tales como combrestatina A4 (Griggs et al., *Lancet Oncol.* 2:82, 2001), angiostatina y endostatina (revisado en Rosen, *Oncologist* 5:20, 2000) y proteína 10 inducible por interferón (patente U.S. n<sup>o</sup> 5.994.292). También se contempla un número de otros agentes antiangiogénicos, e incluyen: 2ME2, angiostatina, angiozima, anti-VEGF RhuMAb, apra (CT-2584), avicina, benefina, BMS275291, carboxiamidotriazol, CC4047, CC5013, CC7085, CDC801, CGP-41251 (PKC 412), CM101, profármaco de combrestatina A-4, EMD 121974, endostatina, flavopiridol, genisteína (GCP), extracto de té verde, IM-862, ImmTher, interferón alfa, interleucina-12, Iressa (ZD1839), Marimastat, Metastat (Col-3), Neovastat, octreotida, paclitaxel, penicilamina, fotofrina, fotopoint, PI-88, prinomastat (AG-3340), PTK787 (ZK22584), RO317453,

solimastat, esqualamina, SU 101, SU 5416, SU-6668, suradista (FCE 26644), suramin (metaret), tetratiomolibdato, talidomida, TNP-470 y vitaxina. Agentes antiangiogénicos adicionales se describen por Kerbel, J. Clin. Oncol. 19(18s):45s-51s, 2001.

5 Los ADCs se pueden administrar con uno o más agentes inmunoestimulantes para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria, tales como IL-2 y oligonucleótidos inmunoestimulantes (por ejemplo, aquellos que contienen los motivos de CpG). Los agentes inmunoestimulantes pueden estimular, en algunas realizaciones, brazos específicos del sistema inmunitario, tales como células asesinas naturales (NK) que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los agentes inmunoestimulantes incluyen interleucina-2,  $\alpha$ -interferón,  $\gamma$ -interferón, factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), oligonucleótidos inmunoestimulantes, o una combinación de los mismos. Los  
10 inmunomoduladores incluyen citocinas, quimiocinas, adyuvantes, o una combinación de los mismos. Las quimiocinas útiles incrementando las respuestas inmunitarias incluyen, pero no se limitan a, SLC, ELC, MIP3 $\alpha$ , MIP3 $\beta$ , IP-10, MIG, y sus combinaciones.

15 El otro agente terapéutico también puede ser una vacuna. En algunas realizaciones, la vacuna inmuniza a un sujeto frente a PSMA. Tales vacunas, en algunas realizaciones, incluyen antígeno, tales como dímeros de PSMA, con, opcionalmente, uno o más adyuvantes para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria. Se conocen bien en la técnica adyuvantes de muchos tipos. Los ejemplos específicos de adyuvantes incluyen monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham); saponinas que incluyen QS21 (SmithKline Beecham); oligonucleótidos inmunoestimulantes (por ejemplo, oligonucleótidos CpG descritos por Kreig et al., Nature 374:546-9, 1995); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; montanida; vitamina E y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites vegetales  
20 tales como escualeno y/o tocoferol, Quil A, Ribi Detox, CRL-1005, L-121, y sus combinaciones. También se contemplan formulaciones, tales como las descritas en la Solicitud U.S. Serie nº 10/976352, para uso como vacunas en los métodos proporcionados aquí.

25 Las vacunas pueden incluir, en algunas realizaciones, uno o más de los multímeros de la proteína de PSMA aislados descritos aquí, tales como el dímero de la proteína de PSMA. En algunas realizaciones, una composición de multímeros de la proteína de PSMA contiene al menos alrededor de 10% de multímero de la proteína de PSMA (de la cantidad total de proteína de PSMA en la composición). En otras realizaciones, la composición de multímeros de la proteína de PSMA contiene al menos alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 99,5% de multímero de la proteína de PSMA. En una realización, la composición de multímeros de la proteína de PSMA contiene multímero de la proteína de PSMA sustancialmente puro, sin sustancialmente ningún monómero de la proteína de PSMA. Se entiende que la lista de porcentajes específicos incluye como referencia todos los porcentajes no nombrados entre los porcentajes citados.  
30

35 Las citocinas también se pueden usar en protocolos de vacunación como resultado de sus propiedades reguladoras de linfocitos. Muchas citocinas útiles para tales fines serán conocidos por una persona de pericia normal en la técnica, incluyendo interleucina-2 (IL-2); IL-4; IL-5; IL-12, que se ha demostrado que potencian los efectos protectores de las vacunas (véase, *por ejemplo* Science 268:1432-1434, 1995); GM-CSF; IL-15; IL-18; sus combinaciones, y similares. De este modo, las citocinas se pueden administrar conjuntamente con antígeno, quimiocinas y/o adyuvantes para incrementar una respuesta inmunitaria.

40 Los otros agentes terapéuticos se pueden usar en los métodos proporcionados en forma no conjugada o en forma conjugada, tal como conjugados a un anticuerpo anti-PSMA o su fragmento de unión a antígeno. El acoplamiento de una o más moléculas de toxina al anticuerpo anti-PSMA o a su fragmento de unión a antígeno puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión de coordinación y complejación.

45 La unión covalente se puede lograr mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas formadoras de puentes externas. Muchos agentes bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas proteicas a otras proteínas, péptidos o funciones amínicas, etc. Por ejemplo, la bibliografía está repleta de agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos, y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de los diversos agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino más bien es ejemplar de los agentes de acoplamiento más habituales.

50 En algunas realizaciones, se contempla que se pueda desear derivatizar en primer lugar el anticuerpo, y después añadir el agente terapéutico al producto derivatizado. Los agentes de reticulación adecuados para uso de esta manera incluyen, por ejemplo, SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), y SMPT, 4-succinimidil-oxicarbonil-metil-(2-piridilditio)tolueno.

55 Además, las toxinas proteicas se pueden fusionar al anticuerpo anti-PSMA o a su fragmento de unión a antígeno mediante métodos genéricos para formar una proteína de fusión inmunotóxica híbrida. Las proteínas de fusión pueden incluir secuencias peptídicas adicionales, tales como espaciadores peptídicos que unen operativamente, por ejemplo, el anticuerpo anti-PSMA y la toxina, en tanto que tales secuencias adicionales no afecten apreciablemente a la selección de dianas o a las actividades tóxicas de la proteína de fusión. Las proteínas se pueden unir mediante un ligador o espaciador peptídico, tal como un péptido espaciador de glicina-serina, o una bisagra

peptídica, como es bien conocido en la técnica. De este modo, por ejemplo, el término C de un anticuerpo anti-PSMA o su fragmento de unión a antígeno se puede fusionar al término N de la molécula de la toxina proteica para formar una inmunotoxina que retiene las propiedades de unión del anticuerpo anti-PSMA. Otros montajes de fusión serán conocidos por un experto de pericia normal en la técnica. Para expresar la inmunotoxina de fusión, se inserta el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión según métodos estándar, para la expresión estable de la proteína de fusión, tal como en células de mamífero, tales como células CHO. La proteína de fusión se puede aislar y purificar de las células o del sobrenadante de cultivo usando metodología estándar, tal como una columna de afinidad de PSMA.

Los radionúclidos se acoplan típicamente a un anticuerpo o a su fragmento de unión a antígeno mediante quelación. Por ejemplo, en el caso de radionúclidos metálicos, habitualmente se usa un quelador bifuncional para enlazar el isótopo al anticuerpo o a otra proteína de interés. Típicamente, el quelador se une en primer lugar al anticuerpo, y el conjugado de quelador-anticuerpo se pone en contacto con el radioisótopo metálico. Para este fin, se han desarrollado distintos queladores bifuncionales, incluyendo la serie de aminoácidos de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) descrita en las patentes U.S. 5.124.471, 5.286.850 y 5.434.287. Como otro ejemplo, los agentes quelantes bifuncionales a base de ácido hidroxámico se describen en la patente U.S. 5.756.825. Otro ejemplo es el agente quelante denominado p-SCN-Bz-HEHA (ácido 1,4,7,10,13,16-hexaazaciclooctadecano-N,N',N'',N''',N''''-hexaacético) (Deal et al., J. Med. Chem. 42:2988, 1999), que es un quelador eficaz de radiometales tales como <sup>225</sup>Ac. Aun otro ejemplo es DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético), que es un agente quelante bifuncional (véase McDevitt et al., Science 294:1537-1540, 2001) que se puede usar en un método de dos etapas para el marcaje seguido de la conjugación.

Otros agentes terapéuticos también incluyen virus selectivos para la replicación. Los virus competentes para la replicación, tales como el mutante dl1520 de adenovirus que selecciona la ruta de p53, ONYX-015, extermina selectivamente a células tumorales (Biederer, C. et al., J. Mol. Med. 80(3):163-175, 2002). En algunas realizaciones, este virus se puede conjugar a anticuerpos anti-PSMA o a sus fragmentos de unión a antígeno.

Los métodos proporcionados pueden comprender además el uso de otras modalidades de tratamiento terapéutico. Tales otros tratamientos incluyen cirugía, radiación, criocirugía, termoterapia, tratamiento hormonal, quimioterapia, vacunas y otras inmunoterapias.

Los ADCs de la invención, tal como a través de su anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno, se pueden enlazar a un marcador. Los marcadores incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores activos de resonancia magnética nuclear, marcadores luminiscentes o marcadores cromóforos.

Las composiciones proporcionadas pueden incluir un vehículo, excipiente o estabilizante fisiológica o farmacéuticamente aceptable, mezclado con el ADC. En algunas realizaciones, cuando una composición comprende dos o más ADCs diferentes, cada uno de los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno de los ADCs se une a un epitopo conformacional diferente de PSMA.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, se pueden combinar con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un ADC con al menos un agente antitumoral, inmunomodulador, agente inmunoestimulante u otra terapia convencional. El otro agente se puede conjugar a o se puede formar como una molécula de fusión recombinante con un anticuerpo anti-PSMA o su fragmento de unión a antígeno para dirigir directamente el agente hacia células que expresan PSMA. En otra realización, el otro agente terapéutico puede estar no conjugado. Los agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar o se pueden poner en contacto con células que expresan PSMA a través de la coadministración. "Coadministrar", como se usa aquí, se refiere a administrar simultáneamente dos o más agentes terapéuticos como una mezcla en una única composición, o secuencialmente, y suficientemente próxima en el tiempo de manera que los compuestos pueden ejercer un efecto aditivo o incluso sinérgico. En todavía otras realizaciones, un agente terapéutico adicional se puede administrar antes, durante o después de la administración de uno o más ADCs o sus composiciones.

Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" incluye cualquiera y todas las sales, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. En algunas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo se puede revestir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Cuando se administran, las composiciones farmacéuticas se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Tales preparaciones pueden contener de forma habitual sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos, tales como agentes potenciadores inmunitarios suplementarios que

incluyen adyuvantes, quimiocinas y citocinas. Cuando se usan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables se pueden usar convenientemente para preparar sus sales farmacéuticamente aceptables, y no se excluyen del alcance de la invención.

5 Una sal retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor, y no imparte efectos toxicológicos indeseados (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similar, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácido mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalino-  
10 térreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similar, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

15 Un ADC se puede combinar, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes, que son adecuados para la administración a un ser humano. El término "vehículo" representa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser comezclados de manera tal que no hay interacción que alterase sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponantes adecuados, incluyendo: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; y parabenos.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden estar presentes convenientemente en forma de dosis unitaria, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

30 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa o no acuosa de los compuestos, que es, en algunas realizaciones, isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación se puede formular según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean como disolvente o medio de suspensión aceites fijos estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se pueden usar en la preparación de inyectables. Las formulaciones de vehículos adecuadas para la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc., se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.  
35  
40

45 Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliortoésteres, y poliácido láctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

50 Las sustancias terapéuticas de la invención se pueden administrar mediante cualquier vía convencional, incluyendo inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo (por ejemplo, el ADC en disolución salina infundida durante 90 minutos). La administración puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intratumoral, o transdérmica. Cuando se usan terapéuticamente compuestos que contienen anticuerpos, las vías de administración incluyen la intravenosa y mediante aerosol pulmonar. Las técnicas para preparar sistemas de suministro de aerosol que contienen anticuerpos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente, tales sistemas deberían utilizar componentes que no alterarán significativamente las propiedades biológicas de los anticuerpos, tales como la capacidad de unión al paratopo (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, p. 1694-1712). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles de anticuerpos sin recurrir a experimentación innecesaria.  
55

Las composiciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una “cantidad eficaz” es aquella cantidad de cualquiera de los ADCs proporcionados aquí que solos, o junto con dosis adicionales y/u otros agentes terapéuticos, produce la respuesta deseada. Esto puede implicar cualquiera de los puntos finales terapéuticos mencionados aquí. En una realización, esto implica solamente ralentizar la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque en algunas realizaciones implica detener la progresión de la enfermedad permanentemente. En otras realizaciones, implica erradicar la enfermedad completamente. El punto final terapéutico deseado se puede monitorizar mediante métodos habituales conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. Una cantidad que es eficaz puede ser la cantidad de un ADC solo que produce el punto final terapéutico deseado. Una cantidad que es eficaz es también una cantidad de un ADC en combinación con otro agente que produce el resultado deseado.

Tales cantidades dependerán, por supuesto, del cáncer particular que se esté tratando, de la gravedad del cáncer, de los parámetros del paciente individual, incluyendo la edad, estado físico, tamaño y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la vía específica de administración, y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del practicante de la salud. Estos factores son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica, y se pueden abordar con experimentación no más allá de la habitual. Generalmente se prefiere que se use una dosis máxima de los componentes individuales o sus combinaciones, esto es, la dosis segura más elevada según el juicio del médico. Se entenderá por los expertos de pericia normal en la técnica, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis menor o dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o por virtualmente cualesquiera otras razones.

Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos pueden ser estériles, y contienen una cantidad eficaz de un ADC, solo o en combinación con otro agente, para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente. La respuesta se puede medir, por ejemplo, determinando los efectos fisiológicos de la composición de ADC, tal como una reducción en el volumen tumoral, una reducción en el tamaño o número de metástasis, un incremento en la supervivencia, una mejora en la calidad de vida y/o una reducción de los síntomas del cáncer, etc. Otros ensayos serán conocidos por aquel de pericia normal en la técnica, y se pueden emplear para medir el nivel de la respuesta.

Las dosis de los ADCs administradas a un sujeto se pueden escoger según diferentes parámetros, en particular según el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear mayores dosis (o dosis eficazmente mayores mediante una vía de suministro diferente, más localizada) hasta el grado en que lo permita la tolerancia del paciente.

En general, las dosis pueden oscilar desde alrededor de 10 µg/kg hasta alrededor de 100.000 µg/kg. En algunas realizaciones, las dosis pueden oscilar desde alrededor de 0,1 mg/kg hasta alrededor de 20 mg/kg. En todavía otras realizaciones, las dosis oscilan desde alrededor de 0,1 mg/kg hasta 5 mg/kg, 0,1 mg/kg hasta 10 mg/kg o 0,1 mg/kg hasta 15 mg/kg. En todavía otras realizaciones, las dosis oscilan desde alrededor de 1 mg/kg hasta 5 mg/kg, 5 mg/kg hasta 10 mg/kg, 10 mg/kg hasta 15 mg/kg o 15 mg/kg hasta 20 mg/kg. En realizaciones adicionales, la dosis es alrededor de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 17 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg o 30 mg/kg. En una realización adicional, la dosis es alrededor de 0,4 mg/kg, 0,7 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,8 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,9 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg o 4,0 mg/kg. En una realización adicional, la dosis es alrededor de 0,6 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,2 mg/kg o 1,5 mg/kg. En otra realización, la dosis es alrededor de 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg o 6 mg/kg. Basándose en la composición, la dosis se puede suministrar de forma continua, tal como mediante bomba continua, o a intervalos periódicos. En algunas realizaciones, cuando el ADC se administra intravenosamente, la dosis está entre 0,1 y 20 mg/kg, o cualquier valor entre ellos. Los intervalos de tiempo deseados de múltiples dosis de una composición particular se pueden determinar sin experimentación innecesaria mediante un experto en la técnica. Otros protocolos para la administración de las composiciones proporcionadas serán conocidos por aquel de pericia normal en la técnica, en los que la cantidad de dosis, el programa de administración, el sitio o sitios de administración, el modo de administración, y similar, varían a partir de lo anterior. En algunas realizaciones, a los sujetos se les administra el ADC con un régimen de dosis de q4d x 3 o q4d x 6. En una realización, la dosis se administra intravenosamente. En otra realización, el régimen de dosis es una dosis intravenosa individual.

La administración de un ADC o de una composición que comprende un ADC a mamíferos distintos de seres humanos, por ejemplo, para fines de ensayo o fines terapéuticos veterinarios, etc., se lleva a cabo en sustancialmente las mismas condiciones como se describe anteriormente.

Las composiciones de la presente invención tienen utilidades terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo *in vivo*, para tratar una variedad de cánceres como se proporciona aquí. Como se usa aquí, el término “sujeto” pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen, por ejemplo, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ratones y ratas. Los sujetos incluyen un paciente humano que tiene un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano. El sujeto, en una realización, tiene cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que se ha tratado con taxano pero que ha progresado. En otra realización, el sujeto es aquel que satisface los criterios de entrada como se definen en los Ejemplos más abajo (por ejemplo, Ejemplos 5, 7 y 9).

El uso de los métodos proporcionados tiene un número de beneficios. Puesto que los ADCs se dirigen preferentemente hacia PSMA, por ejemplo en células de cáncer de próstata, se puede prescindir de otro tejido. Como resultado, el tratamiento con tales agentes biológicos es más seguro, particularmente para pacientes más ancianos. Se espera que el tratamiento según la presente invención sea particularmente eficaz, en algunas realizaciones, debido a que puede dirigir niveles elevados de ADCs a la médula ósea y a los ganglios linfáticos, donde pueden predominar las metástasis de cáncer, tales como metástasis de cáncer de próstata. El tratamiento según la presente invención se puede monitorizar eficazmente con parámetros clínicos tales como antígeno específico de la próstata sérico y/o rasgos patológicos de un cáncer de paciente, incluyendo etapa, puntuación de Gleason, invasión extracapsular, seminal, vesicular o perineural, márgenes positivos, ganglios linfáticos implicados, etc. Como alternativa, estos parámetros se pueden usar para indicar cuándo tal tratamiento se debería emplear.

Las composiciones para uso en los métodos proporcionados aquí pueden estar en forma liofilizada, o se pueden proporcionar en un medio acuoso.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Citotoxicidad potente y específica para células de cáncer de próstata que expresan PSMA**

Células positivas a PSMA y negativas a PSMA se expusieron a ADC de PSMA en microplacas de 96 pocillos a diversas concentraciones. Después de 96 horas, se evaluó el porcentaje de supervivencia celular (en comparación con células en medio) usando Alamar Blue fluorescente (Fig. 5).

La Fig. 6 presenta una tabla que muestra citotoxicidad a estirpes celulares de cáncer de próstata que expresan PSMA tras la exposición a ADC de PSMA.

#### **Ejemplo 2: ADC de PSMA es eficaz para tratar tumores grandes y para tratar tumores resistentes a docetaxel**

Se evaluó la eficacia terapéutica *in vivo* de ADC de PSMA en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de cáncer de próstata humano. Se implantaron subcutáneamente a ratones atímicos machos, de 6-8 semanas, obtenidos de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA), 5 millones de células C4-2 (proporcionadas por Warren D.W. Heston de The Cleveland Clinic, Cleveland, OH). C4-2 es una estirpe celular de cáncer de próstata humana independiente de andrógenos. En el día 11, se midió el tamaño tumoral de cada ratón, en longitud y anchura en milímetros, usando un calibre (Mitutoyo, Aurora, IL). El volumen tumoral se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = [(\text{Longitud}) \times (\text{Anchura})^2]/2$$

Los animales con un volumen tumoral entre 80-140 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar según el volumen tumoral en dos grupos para el tratamiento con tampón de PBS (control de vehículo, n = 15) o ADC de PSMA (n = 15). El tamaño tumoral medio fue 108,9 y 108,7 mm<sup>3</sup>, con un valor p de 0,452 (prueba de la t de Student) para los grupos de PBS y de ADC de PSMA, respectivamente, en la distribución al azar. Todos los animales recibieron entonces inyecciones intravenosas de PBS o de ADC de PSMA (Progenics, Tarrytown, NY, lote toxicológico P10306) a 6 mg/kg en la vena de la cola en un volumen de 0,1 ml en el día 12 al 29, dos veces por semana durante tres semanas. Los tamaños tumorales se midieron dos veces por semana o semanalmente durante 100 días tras la implantación del tumor, y el volumen tumoral medio para los dos grupos se representó gráficamente a lo largo del tiempo tras la implantación del tumor (Fig. 7).

Se observó reducción del tamaño tumoral en los animales tratados con ADC de PSMA. El primer animal se sacrificó en el día 33 en el grupo de control de vehículo debido al gran tamaño del tumor (>2000 mm<sup>3</sup>); el tamaño tumoral medio para el grupo de vehículo y para el grupo tratado con ADC de PSMA fueron 925,7 mm<sup>3</sup> y 92,5 mm<sup>3</sup> (p = 0,00005, prueba de la t de Student), respectivamente. El experimento se siguió durante 100 días, y todos los ratones se sacrificaron excepto 4 animales en el grupo tratado con ADC de PSMA.

Entre los 15 animales en el grupo tratado con ADC de PSMA con un tamaño tumoral medio de 72,5 mm<sup>3</sup> en el día 75 como se muestra en la Fig. 7, hubo 4 ratones (ratón #8, 11, 12 y 14) con tumores que comenzaron a crecer en el día 75 (Fig. 8). En el día 99, el tamaño tumoral medio fue 688,7 mm<sup>3</sup> (893,8, 445,3, 666,7, 749,0 mm<sup>3</sup>) para los 4 ratones. Los animales se trataron nuevamente con ADC de PSMA a 6 mg/kg a partir del día 99, una vez a la semana durante 13 semanas. La Fig. 8 muestra el volumen tumoral a lo largo de 180 días para los 4 ratones. Las líneas discontinuas indican el tratamiento inicial con ADC de PSMA, y las líneas continuas indican el segundo tratamiento con ADC de PSMA. La reducción del tamaño tumoral se observó inmediatamente en los 4 ratones después del segundo tratamiento con ADC de PSMA, y el volumen tumoral continuó contrayéndose mientras se seguía dosificando. En el día 180, el volumen tumoral se redujo a <100 mm<sup>3</sup>, con un volumen medio de 50 mm<sup>3</sup>.

Estos resultados muestran que ADC de PSMA es eficaz para tratar tumores de tamaño grande (~900 mm<sup>3</sup>), y también se puede usar para tratar tumores recidivantes usando el mismo nivel de dosis de un tratamiento inicial con ADC de PSMA.

5 Un ratón que no se incluyó en el experimento de ADC de PSMA descrito anteriormente tuvo un tamaño tumoral de ~500 mm<sup>3</sup> en el día 21. Se le dieron 12 dosis de docetaxel, IP, a 12 mg/kg semanalmente. Como se muestra en la Fig. 3 y en la Tabla 2, el animal respondió inicialmente al tratamiento con docetaxel, el volumen tumoral se redujo hasta ~300 mm<sup>3</sup> en el día 60, pero después progresó hasta ~800 mm<sup>3</sup> en el día 100. El tratamiento de docetaxel se detuvo, y se administró IV ADC de PSMA a 6 mg/kg durante 12 dosis adicionales, semanalmente. El volumen tumoral se redujo drásticamente de 800 mm<sup>3</sup> a ~50 mm<sup>3</sup> en el día 180 cuando se administró ADC de PSMA. ADC de PSMA puede tratar tumores en los el tratamiento de docetaxel fracasó.

10 Tabla 2. Medida del tumor a lo largo del tiempo en un animal tratado con 12 dosis de 12 mg/kg de docetaxel seguido de 12 dosis de 6 mg/kg de ADC de PSMA. El tumor respondió inicialmente al tratamiento con docetaxel, y después recayó. El tratamiento se cambió a ADC de PSMA, y entonces se observó una reducción significativa del volumen tumoral.

| Días tras la implantación del tumor | Tumor         |              |                            |
|-------------------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
|                                     | Longitud (mm) | Anchura (mm) | Volumen (mm <sup>3</sup> ) |
| 21                                  | 12,22         | 9,22         | 519,4                      |
| 26                                  | 13,07         | 9,27         | 561,6                      |
| 28                                  | 12,61         | 9,11         | 523,3                      |
| 39                                  | 12,06         | 9,14         | 503,7                      |
| 47                                  | 10,89         | 7,80         | 331,3                      |
| 49                                  | 11,17         | 7,67         | 328,6                      |
| 56                                  | 11,10         | 8,26         | 378,7                      |
| 61                                  | 11,16         | 7,44         | 308,9                      |
| 63                                  | 10,59         | 7,84         | 325,5                      |
| 67                                  | 11,67         | 7,46         | 324,7                      |
| 70                                  | 12,48         | 8,12         | 411,4                      |
| 77                                  | 13,30         | 9,77         | 634,8                      |
| 84                                  | 13,77         | 10,39        | 743,3                      |
| 91                                  | 14,09         | 10,08        | 715,8                      |
| 95                                  | 14,70         | 10,30        | 779,8                      |
| 99                                  | 14,51         | 10,67        | 826,0                      |
| 103                                 | 13,62         | 10,40        | 736,6                      |
| 106                                 | 14,13         | 10,14        | 726,4                      |
| 110                                 | 12,70         | 8,42         | 450,2                      |
| 113                                 | 9,61          | 7,96         | 304,5                      |
| 119                                 | 8,78          | 6,77         | 201,2                      |
| 126                                 | 8,67          | 6,33         | 173,7                      |
| 134                                 | 7,12          | 6,46         | 148,6                      |
| 141                                 | 6,20          | 5,70         | 100,7                      |
| 148                                 | 6,46          | 5,32         | 91,4                       |
| 154                                 | 5,65          | 4,78         | 64,5                       |
| 162                                 | 5,60          | 4,30         | 51,8                       |

| Días tras la implantación del tumor | Tumor         |              |                            |
|-------------------------------------|---------------|--------------|----------------------------|
|                                     | Longitud (mm) | Anchura (mm) | Volumen (mm <sup>3</sup> ) |
| 167                                 | 5,70          | 4,00         | 45,6                       |
| 173                                 | 5,50          | 3,80         | 39,7                       |
| 180                                 | 5,60          | 4,15         | 48,2                       |

### Ejemplo 3: ADC de PSMA es eficaz para tratar tumores en animales en los que el tratamiento de docetaxel fracasó

Se diseñó un experimento (Fig. 10) para evaluar la eficacia de ADC de PSMA tras el fracaso del tratamiento con docetaxel. A ratones atímicos machos, 6-8 semanas, obtenidos de Charles River Laboratories, Inc., se les implantó subcutáneamente 5 millones de células C4-2. En el día 14, los animales que tienen un volumen tumoral entre 100-200 mm<sup>3</sup> se distribuyeron al azar (distribución al azar #1) en dos brazos de tratamiento: (1) control de vehículo (tampón de PBS, n = 10); (2) docetaxel a 2 mg/kg/IV semanalmente (n = 50) según el volumen tumoral. El volumen tumoral medio fue 138,0 y 138,1 mm<sup>3</sup> para los grupos de control de vehículo y de tratamiento con docetaxel, respectivamente, en el momento de la distribución al azar.

Todos los animales recibieron entonces inyecciones intravenosas de PBS o docetaxel (Sigma, St. Louis, MO) a 2 mg/kg vía la vena de la cola en un volumen de 0,1 ml. Los tamaños tumorales se midieron dos veces por semana tras la implantación del tumor, y se representó el volumen tumoral medio para los dos grupos antes de que se iniciase la segunda distribución al azar (Fig. 11). En conjunto, el tratamiento con docetaxel redujo el crecimiento tumoral en comparación con el control.

Cuando el volumen tumoral de un animal en el grupo de tratamiento con docetaxel superó 400 mm<sup>3</sup>, este animal se distribuyó al azar, a una relación 1:1, en uno de los dos subgrupos de tratamiento: un grupo continuó recibiendo docetaxel a 2 mg/kg, y el segundo grupo se cambió al tratamiento con ADC de PSMA a 6 mg/kg/IV semanalmente. Los animales se distribuyeron al azar en estos dos subgrupos de tratamiento continuamente a lo largo del período de 28 días hasta 70 días tras la implantación del tumor. Al final del día 70, hubo 28 ratones cuyo volumen tumoral había superado 400 mm<sup>3</sup>, con 14 ratones distribuidos al azar en el subgrupo de tratamiento con ADC de PSMA (volumen tumoral medio de 695 mm<sup>3</sup> y 14 ratones distribuidos al azar en el subgrupo de tratamiento con docetaxel continuado (volumen tumoral medio de 642 mm<sup>3</sup> con un valor p de 0,28 (prueba de la t de Student)).

El efecto del tratamiento con ADC de PSMA sobre el crecimiento tumoral tras el fracaso de docetaxel se evaluó comparando la reducción tumoral tras la segunda distribución al azar. Los volúmenes tumorales de los animales en los dos subgrupos se representaron gráficamente (Fig. 12). Los resultados muestran que los tumores crecieron continuamente mientras se encontraban en el tratamiento con docetaxel. Sin embargo, el volumen tumoral se redujo significativamente cuando se inició el tratamiento con ADC de PSMA. Por lo tanto, ADC de PSMA es eficaz tratando animales con tumores en los que fracasó el tratamiento con docetaxel.

### Ejemplo 4: Diseño de estudio *in vivo*

El diseño de estudio se muestra en la Fig. 13. A ratones atímicos machos, 6-8 semanas, obtenidos de Charles River Laboratories, Inc., se les implantó subcutáneamente Matrigel en el lado derecho de cada ratón con 5 millones de células C4-2 (estirpe celular de cáncer de próstata humana independiente de andrógeno). En el día 14, se midió el tamaño tumoral en longitud y anchura en mm (milímetro). El volumen se calculó usando la fórmula: volumen (mm<sup>3</sup>) = [(longitud) x (anchura)<sup>2</sup>]/2. Los animales se distribuyeron al azar en dos grupos con volumen tumoral similar (aproximadamente 138 mm<sup>3</sup>): control de vehículo y docetaxel a 2 mg/kg. A los animales se les dosificó semanalmente a través de la vena de la cola.

Cuando el volumen tumoral de un animal en el grupo de tratamiento con docetaxel superó 400 mm<sup>3</sup>, este animal se distribuyó al azar, a una relación 1:1, en uno de los dos subgrupos de tratamiento: un grupo continuó recibiendo docetaxel a 2 mg/kg semanalmente (n = 18), y el segundo grupo se cambió a tratamiento con ADC de PSMA a 6 mg/kg/IV semanalmente (n = 18). Los ratones cuyos tumores respondieron duraderamente a docetaxel ( $\leq 400$  mm<sup>3</sup>) continuaron recibiendo docetaxel a 2 mg/kg/IV semanalmente. Los efectos del tratamiento se evaluaron midiendo el volumen tumoral y la supervivencia global. También se midió el peso corporal del animal. Los animales con tamaño tumoral  $\geq 2000$  mm<sup>3</sup> se sacrificaron.

Los volúmenes tumorales medios fueron  $515 \pm 103$  mm<sup>3</sup> y  $495 \pm 80$  mm<sup>3</sup> para los grupos de ADC de PSMA y de tratamiento con docetaxel continuado, respectivamente, en la segunda distribución al azar (p = 0,518) (Fig. 14). Al final del experimento, la tasa de supervivencia fue 100% para animales en el grupo de tratamiento con ADC de PSMA (Fig. 17); 94% de estos ratones tuvieron tamaños tumorales  $< 100$  mm<sup>3</sup> (Fig. 16). Por el contrario, la tasa de supervivencia fue 11% en el grupo de tratamiento con docetaxel continuado. Por lo tanto, el tratamiento con ADC de

PSMA contrajo significativamente los tumores e incrementó la supervivencia global de los animales en comparación con el tratamiento continuado con docetaxel ( $p < 0,0001$ ). ADC de PSMA fue generalmente bien tolerado en el animal (Fig. 18). ADC de PSMA demostró una potente actividad antitumoral frente a tumores de próstata grandes que habían progresado tras el tratamiento con docetaxel. El tratamiento con ADC de PSMA prolongó significativamente la supervivencia.

**Ejemplo 5: Un estudio de aumento de escala de fase 1 de ADC de PSMA en sujetos con cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración**

Se inició un estudio de fase 1 de aumento de escala de la dosis, de etiqueta abierta de ADC de PSMA IV en sujetos con cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que había progresado tras la terapia previa con taxano. Los sujetos recibirán 0,4 mg/kg, 0,7 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,8 mg/kg o 2,9 mg/kg mediante infusión IV durante 90 minutos a velocidad constante de ADC de PSMA en disolución salina (a las semanas 0, 3, 6 y 9). Los sujetos adicionales que satisfagan los criterios de inclusión/exclusión del estudio entrarán en la cohorte de dosis máxima tolerada (MTD) hasta que esté llena por los criterios más abajo. La duración máxima del tratamiento para cada sujeto será de 12 semanas.

La toxicidad limitante de la dosis (DLT) se define como cualquier grado de toxicidad  $\geq 3$  según el National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, Versión 3.0), así como toxicidad alérgica/inmunológica de grado 2 (excepto fiebre aislada) para la cual no se pueda excluir una relación causal con el fármaco del estudio. En este estudio, DLT se determinará tras la primera dosis de cada cohorte. Se empleará un esquema de aumento de dosis, basado en la DLT. Una vez que se determina una MTD o se observa que la cohorte con dosis más elevada es segura, se tratarán sujetos adicionales. Estos sujetos se escogerán usando los mismos criterios de inclusión/exclusión empleados para el estudio. Si dos o más sujetos en la cohorte de dosis más baja experimentan una DLT, se enrolará una cohorte a 0,2 mg/kg de ADC de PSMA.

Se obtendrán imágenes radiológicas en el cribado y en la semana 12. Se obtendrán muestras de sangre (5 ml) para concentraciones de fármaco antes del inicio de la infusión y a los 90 minutos y 4, 6, 24, 48, 96, 168, 336 y 504 horas tras el inicio de la infusión en las semanas 0 y 6. Las concentraciones séricas del fármaco del estudio (ADC) y anticuerpo total (PSMA-mAb + ADC) se medirán mediante un método de ELISA completamente validado, y las concentraciones séricas de toxina libre (MMAE) se medirán mediante un método de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC/MS/MS) completamente validado. La inmunogenicidad se evaluará mediante un método de ELISA completamente validado para los puntos de tiempo del día 1 (predosis) y semana 12.

A todos los sujetos que completaron el estudio de 12 semanas, y que, en opinión del investigador, probablemente se beneficien del tratamiento continuado con ADC de PSMA, se les ofrecerá el enrolamiento en un estudio de extensión.

Diagnóstico y los criterios de inclusión:

1. Hombres, edad  $\geq 18$  años (o edad adulta mínima según se determina por las autoridades normativas locales)
2. Estado de 0 ó 1 del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)
3. Confirmación histológica de cáncer de próstata
4. Un diagnóstico de cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, basado en pruebas de enfermedad metastásica en barrido óseo, barrido mediante CT, o MRI en cualquier momento tras el diagnóstico inicial de cáncer de próstata
5. Terapia previa de carencia de andrógenos que consiste en orquiectomía o agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), con o sin un antiandrógeno y un nivel de emasculación de testosterona sérica ( $< 50$  ng/ml)
6. Terapia previa con taxano
7. Requisitos de laboratorio:
  - Recuento de glóbulos blancos (WBC)  $\geq 3000/\text{mm}^3$
  - Recuento de neutrófilos absoluto (ANC)  $\geq 1000/\text{mm}^3$
  - Plaquetas (Plt)  $\geq 100.000 \text{ mm}^3$
  - Hemoglobina (Hgb)  $\geq 10$  g/dl
  - Bilirrubina total  $\leq 2,0$  mg/dl

- Alanina transferasa sérica/aspartato transaminasa sérica (ALT/AST)  $\leq 2$  x el límite superior de normal
- Creatinina sérica  $\leq 2,0$  mg/dl y velocidad de filtración glomerular (GFR) calculada de  $> 60$  ml/min.

Criterios de exclusión:

- 5 Neoplasia maligna primaria no prostática, excepto para cáncer de piel no melanómico o carcinoma de células transicionales papilares de grado bajo de la vejiga en los cinco años previos
- Enfermedad cardíaca clínicamente significativa (Clase III/IV de la New York Heart Association) o enfermedad pulmonar debilitante grave
3. Terapia de radiación o quimioterapia citotóxica en las cuatro semanas previas
4. Enfermedad metastásica del sistema nervioso central (SNC) o epidural activa
- 10 5. Una infección que requiera tratamiento con antibióticos en siete días antes del cribado, y/o tratamiento con antibióticos iniciado hasta el momento de la primera dosis
6. Neuropatía periférica de grado 2 o superior con cualquier asociación con terapia con taxano al comienzo del estudio
7. Cualquier tratamiento previo con cualquier otra terapia dirigida a PSMA
- 15 8. Los sujetos no pueden haber participado en ningún otro estudio de investigación dentro de los 30 días
9. Terapia previa con mAbs o proteínas de fusión Ig de investigación o aprobadas
10. Sujetos con QTc  $\geq 500$  ms
11. Peso  $>225$  libras (102,06 kilos)

#### Ejemplo 6: Diseño de estudio clínico de dos etapas

20 Un ensayo clínico de aumento de escala, de etiqueta abierta, de fase 1, incluirá hombres con cáncer de próstata progresivo, refractario a hormonas, y que tuvieron terapia previa con fármacos quimioterapéuticos taxánicos. El estudio investigará la duración del beneficio clínico derivado del tratamiento con ADC de PSMA a la vez que también evaluará la seguridad y tolerabilidad de los fármacos bajo investigación. El período inicial de 12 semanas evaluará hasta cinco dosis intravenosas de ADC de PSMA, administradas individualmente a intervalos de tres semanas. El estudio incluirá evaluaciones de farmacodinámica, cambios radiográficos en la carga tumoral, y cambios en los valores de antígeno específico de la próstata (PSA) y de células tumorales circulantes (CTC), en comparación con una línea base.

Tras el período de 12 semanas, a los pacientes se les ofrecerá, a juicio del médico, la opción de continuar el tratamiento durante 39 semanas adicionales con la misma dosis de ADC de PSMA como se administra en su cohorte inicial. Los sujetos cualificados recibirán hasta 13 dosis adicionales de ADC de PSMA a intervalos de tres semanas.

#### Ejemplo 7: Un estudio de aumento de la dosis de fase 1 de ADC de PSMA en sujetos con cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración

35 Se inició un estudio de fase 1 de aumento de la dosis, de etiqueta abierta, de ADC de PSMA IV en sujetos con cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que había progresado tras terapia previa con taxano. Los sujetos recibieron 0,4 mg/kg; 0,7 mg/kg, 1,1 mg/kg o 1,8 mg/kg o recibirán 2,4 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg o 4,0 mg/kg mediante infusión IV a velocidad constante de ADC de PSMA en disolución salina administrada a lo largo de aproximadamente 90 minutos (a las semanas 0, 3, 6 y 9). Los sujetos adicionales que satisfacen los criterios de inclusión/exclusión del estudio entrarán en la cohorte de dosis máxima tolerada (MTD) hasta que esté llena por los criterios más abajo. La duración máxima del tratamiento para cada sujeto fue/será 12 semanas.

La toxicidad limitante de la dosis (DLT) se puede definir como cualquier grado de toxicidad  $\geq 3$  según National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, Versión 3.0), con la siguiente excepción: un recuento absoluto de neutrófilos (ANC)  $<500$  mm<sup>3</sup> determinado ocho días tras la primera infusión de ADC de PSMA. En esta circunstancia, una DLT se puede definir como un recuento de neutrófilos  $<500$  mm<sup>3</sup> encontrado tanto en los días 8 y 15 del estudio tras la primera infusión de ADC de PSMA. Una DLT también se puede definir como toxicidad alérgica/inmunológica de grado  $\geq 2$  (excepto fiebre aislada) para la que no se puede excluir una relación causal con el fármaco de estudio. En este estudio, DLT se determinó/determinará tras la primera dosis de cada cohorte. Se empleó/empleará un esquema de aumento de escala, basado en la DLT. Una vez que se determina una MTD o la cohorte de dosis más alta es segura, se tratarán sujetos adicionales. Estos sujetos se

escogerán usando los mismos criterios de inclusión/exclusión empleados para el estudio. Si dos o más sujetos en la cohorte de dosis más baja experimentan una DLT, una cohorte se enrolará a 0,2 mg/kg de ADC de PSMA.

La formación de imágenes radiológicas se obtuvo/obtendrá antes de la infusión y en siete días antes de la visita de la semana 12. Se obtuvieron/obtendrán muestras de sangre (5 ml) para las concentraciones de fármaco en los puntos de tiempo designados en las semanas 0, 3, 6, 9 y 12 (en la semana 12, la toma de muestras está en el día 85 ± un día del estudio). En la semana 0, se recogieron/recogen muestras antes del inicio de la infusión, inmediatamente al final de la infusión, y a las cuatro y seis horas tras la infusión. Las muestras recogidas a las 24, 48, 96, 168, 336 y 504 horas tras el inicio de la infusión se pueden recoger en ± dos horas del punto de tiempo designado. A las semanas 3, 6 y 9 sólo se recogieron/recogen muestras de predosis. Las concentraciones séricas de fármaco del estudio (ADC) y de anticuerpo total (PSMA-mAb + ADC) se midieron/medirán mediante un método de ELISA completamente validado, y las concentraciones séricas de toxina libre (MMAE) se midieron/medirán mediante un método de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC/MS/MS) completamente validado. La inmunogenicidad se evaluó/evaluará mediante un método de ELISA completamente validado para los puntos de tiempo de día 1 (predosis) y semana 12.

A todos los sujetos que han completado el estudio de 12 semanas, y que, en opinión del investigador, probablemente se beneficiarán del tratamiento continuado con ADC de PSMA, se les ofrecerá enrolarse en un estudio de extensión.

Diagnóstico y los criterios de inclusión:

1. Hombres, edad  $\geq 18$  años (o edad adulta mínima según se determina por las autoridades normativas locales)

2. Estado de 0 ó 1 del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

3. Confirmación histológica de cáncer de próstata

4. Un diagnóstico de cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, basado en pruebas de enfermedad metastásica en barrido óseo, barrido mediante CT, o MRI en cualquier momento tras el diagnóstico inicial de cáncer de próstata

5. Terapia previa de carencia de andrógenos que consiste en orquiectomía o agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), con o sin un antiandrógeno y un nivel de emasculación de testosterona sérica ( $< 50$  ng/ml)

6. Terapia previa con taxano

7. Requisitos de laboratorio:

- Recuento de glóbulos blancos (WBC)  $\geq 3000/\text{mm}^3$
- Recuento de neutrófilos absoluto (ANC)  $\geq 1000/\text{mm}^3$
- Plaquetas (Plt)  $\geq 100.000 \text{ mm}^3$
- Hemoglobina (Hgb)  $\geq 9,0 \text{ g/dl}$
- Bilirrubina total  $\leq 2,0 \text{ mg/dl}$
- Alanina transferasa sérica/aspartato transaminasa sérica (ALT/AST)  $\leq 2 \times$  el límite superior de normal (ULN)
- Creatinina sérica  $\leq 2,0 \text{ mg/dl}$  y velocidad de filtración glomerular (GFR) calculada de  $> 60 \text{ ml/min}$ .

Criterios de exclusión:

1. Neoplasia maligna primaria no prostática, excepto para cáncer de piel no melanómico o carcinoma de células transicionales papilares de grado bajo de la vejiga en los cinco años previos

2. Enfermedad cardíaca clínicamente significativa (Clase III/IV de la New York Heart Association) o enfermedad pulmonar debilitante grave

3. Terapia de radiación o quimioterapia citotóxica en las seis semanas previas

4. Enfermedad metastásica del sistema nervioso central (SNC) o epidural activa

5. Pruebas de una infección que requiera terapia con antibióticos en curso

6. Neuropatía periférica de grado 2 o superior con cualquier asociación con terapia con taxano al comienzo del estudio
7. Cualquier tratamiento previo con cualquier otra terapia dirigida a PSMA
8. Los sujetos no pueden haber participado en ningún otro estudio de investigación dentro de los 30 días
- 5 9. Terapia previa con mAbs o proteínas de fusión Ig de investigación o aprobadas
10. Sujetos con QTc  $\geq$  500 ms
11. Historia de pancreatitis o procedimientos quirúrgicos en el páncreas
12. Historia de abuso de drogas y/o alcohol
- 10 13. Cualquier estado médico que en opinión del investigador pueda interferir con una participación del sujeto en o con el cumplimiento con el estudio

#### **Ejemplo 8: Diseño de estudio clínico de dos etapas**

Un ensayo clínico de aumento de dosis, de etiqueta abierta, de fase 1, incluyó hombres con cáncer de próstata progresivo, refractario a hormonas, y que se sometió a terapia previa con fármacos quimioterapéuticos taxánicos. El estudio investiga la duración del beneficio clínico derivado del tratamiento con ADC de PSMA, y evalúa la seguridad y tolerabilidad del fármaco bajo investigación. Se administró ADC de PSMA a intervalos de tres semanas durante un período de 12 semanas para la evaluación de al menos cuatro dosis intravenosas de ADC de PSMA. El estudio incluye evaluaciones de farmacodinámica, cambios radiográficos en la carga tumoral, y cambios en los valores de antígeno específico de la próstata (PSA) y de células tumorales circulantes (CTC), en comparación con una línea base.

Tras el período de 12 semanas, a los pacientes se les ofrecerá, a juicio del médico, la opción de continuar el tratamiento durante 39 semanas adicionales con la misma dosis de ADC de PSMA según se administra en su cohorte inicial. Los sujetos cualificados recibirán hasta 13 dosis adicionales de ADC de PSMA a intervalos de tres semanas.

#### **Ejemplo 9: Régimen de dosificación y modo de administración de ADC de PSMA**

Se inició un estudio de fase 1 de aumento de escala, de etiqueta abierta, de ADC de PSMA administrado IV en sujetos con cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que había progresado tras la terapia previa con taxano. Se administrarán infusiones intravenosas (IV) de ADC de PSMA a los sujetos en cuatro ciclos. En las cohortes 1-8, se administrarán infusiones IV de ADC de PSMA una vez al comienzo de un ciclo (duración 3 semanas o Q3W; semanas 1, 4, 7 y 10) durante un total de 4 dosis (4 ciclos) como ocho grupos de tratamiento enrolados progresivamente: 0,4 mg/kg, 0,7 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,8 mg/kg, 2,4 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg o 4,0 mg/kg. En las cohortes 9-12, se administrarán infusiones IV de ADC de PSMA a sujetos una vez cada semana durante las primeras tres semanas de un ciclo de cuatro semanas durante un total de 12 dosis (4 ciclos o 4QW con una dosis durante la semana 1, 2 y 3 en el ciclo 1; semanas 5, 6 y 7 en el ciclo 2; semanas 9, 10 y 11 en el ciclo 3; y semanas 13, 14 y 15 en el ciclo 4; no se administrarán dosis durante las semanas 4, 8, 12 y 16 en los ciclos 1, 2, 3 y 4, respectivamente) como cuatro grupos de tratamiento enrolados progresivamente: 0,6 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,2 mg/kg y 1,5 mg/kg. Para todos los tratamientos, se administrará ADC de PSMA en disolución salina durante aproximadamente 90 minutos. Los sujetos adicionales que satisfagan los criterios de inclusión/exclusión del estudio entrarán en la MTD para cada régimen de dosificación hasta que esté lleno según los criterios más abajo. La duración máxima del tratamiento para los sujetos en las cohortes 1-8 será 13 semanas, y para los sujetos en las cohortes 9-12, 17 semanas.

La toxicidad limitante de la dosis (DLT) se definirá como cualquier grado de toxicidad  $\geq$  3 según National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, Versión 3.0), con la siguiente excepción: un recuento absoluto de neutrófilos (ANC)  $<500 \text{ mm}^3$ . Para todas las cohortes, una DLT se definirá como un recuento de neutrófilos  $<500 \text{ mm}^3$  que persiste con la determinación repetida 3 a 7 días tras la administración de ADC de PSMA final dentro del primer ciclo. Para las cohortes 9-12, un ANC  $<500 \text{ mm}^3$  antes de cualquier dosis en el primer ciclo es una DLT. Una DLT también se define como toxicidad alérgica/inmunológica de grado  $\geq 2$  (excepto fiebre aislada) para la cual no se puede excluir una relación causal del fármaco bajo estudio. En este estudio, DLT se determinará tras el primer ciclo de cada cohorte. Se empleará un esquema de aumento de dosis, basado en la DLT. Las determinaciones de DLT se producirán como una consideración separada para las cohortes 1-8 y 9-12. Una determinación de la DLT para la cohorte 1-8 no influirá en el enrolamiento en las cohortes 9-12. Una vez que se determina una MTD o la cohorte de dosis más elevada es segura, se tratarán sujetos adicionales. Estos sujetos se escogerán usando los mismos criterios de inclusión/exclusión empleados para el estudio.

Para los sujetos en las cohortes 1-8, se obtendrán imágenes radiológicas antes de la infusión y dentro de los siete días antes de la visita de la semana 13. Se obtendrán muestras de sangre (5 ml) para concentraciones de fármaco

en los puntos de tiempo en las semanas 0, 1, 4, 7, 10 y 13 (en la semana 13, la toma de muestra es en el día 85 ± un día del estudio). En la semana 1, las muestras se recogen antes del inicio de la infusión, inmediatamente al final de la infusión, y a las cuatro y seis horas después de la infusión. Las muestras recogidas a las 24, 48, 96, 168, 336 y 504 horas tras el inicio de la infusión se pueden recoger en ± dos horas del punto de tiempo designado. A las semanas 4, 7 y 10, sólo se recogen muestras de predosis. Para los sujetos en las cohortes 9-12, se obtendrán imágenes radiológicas antes de la primera infusión (semana 1) y dentro de los siete días antes de la visita de la semana 17. Se obtendrán muestras de sangre (5 ml) para concentraciones de fármaco en los puntos de tiempo designados: para la semana 1 (ciclo 1) inmediatamente antes del inicio de la infusión, inmediatamente al final de la infusión, y a las cuatro y a las seis horas después de la infusión. Las muestras recogidas a las 24, 48 y 96 horas después del inicio de la infusión se pueden recoger dentro de ± dos horas del punto de tiempo designado. Las muestras recogidas en las semanas 2, 3 y 5 se recogen antes de la infusión. Las muestras también se han de obtener en la semana 4. Las concentraciones séricas de fármaco del estudio (ADC) y de anticuerpo total (PSMA-mAb + ADC) se medirán mediante un método de ELISA completamente validado, y las concentraciones séricas de toxina libre (MMAE) se medirán mediante un método de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC/MS/MS) completamente validado. La inmunogenicidad se evaluará mediante un método de ELISA completamente validado para los puntos de tiempo de día 1 (predosis) y semana 13 para las cohortes 1-8, y el día 1 (predosis) y la semana 17 del estudio para las cohortes 9-12.

A todos los sujetos que han completado el estudio de 12 semanas, y que, en opinión del investigador, probablemente se beneficien del tratamiento continuado con ADC de PSMA, se les ofrecerá enrolarse en un estudio de extensión.

Diagnóstico y los criterios de inclusión:

1. Hombres, edad ≥ 18 años (o edad adulta mínima según se determina por las autoridades normativas locales)

2. Estado de 0 ó 1 del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

3. Confirmación histológica de cáncer de próstata

4. Un diagnóstico de cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, basado en pruebas de enfermedad metastásica en barrido óseo, barrido mediante CT, o MRI en cualquier momento tras el diagnóstico inicial de cáncer de próstata

5. Terapia previa de carencia de andrógenos que consiste en orquiectomía o agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), con o sin un antiandrógeno y un nivel de emasculación de testosterona sérica (< 50 ng/ dl)

6. Terapia previa con taxano

7. Requisitos de laboratorio:

- Recuento de glóbulos blancos (WBC) ≥ 3000/mm<sup>3</sup>

- Recuento de neutrófilos absoluto (ANC) ≥ 1000/mm<sup>3</sup>

- Plaquetas (Plt) ≥ 100.000 mm<sup>3</sup>

- Hemoglobina (Hgb) ≥ 9,0 g/dl

- Bilirrubina total ≤ 2,0 mg/dl

- Alanina transferasa sérica/aspartato transaminasa sérica (ALT/AST) ≤ 2 x el límite superior de normal (ULN)

- Creatinina sérica ≤ 2,0 mg/dl y velocidad de filtración glomerular (GFR) calculada de > 60 ml/min.

Criterios de exclusión:

1. Neoplasia maligna primaria no prostática, excepto para cáncer de piel no melanómico o carcinoma de células transicionales papilares de grado bajo de la vejiga en los cinco años previos

2. Enfermedad cardíaca clínicamente significativa (Clase III/IV de la New York Heart Association) o enfermedad pulmonar debilitante grave

3. Terapia de radiación o quimioterapia citotóxica en las seis semanas previas

4. Enfermedad metastásica del sistema nervioso central (SNC) o epidural activa

- 5. Pruebas de una infección que requiera terapia con antibióticos en curso
- 6. Neuropatía periférica de grado 2 o superior con cualquier asociación con terapia con taxano al comienzo del estudio
- 7. Cualquier tratamiento previo con cualquier otra terapia dirigida a PSMA
- 5 8. Los sujetos no pueden haber participado en ningún otro estudio de investigación dentro de los 30 días
- 9. Terapia previa con mAbs o proteínas de fusión Ig de investigación o aprobadas
- 10. Sujetos con QTc  $\geq$  500 ms
- 11. Historia de pancreatitis o procedimientos quirúrgicos en el páncreas
- 12. Historia de abuso de drogas y/o alcohol
- 10 13. Cualquier estado médico que en opinión del investigador pueda interferir con una participación del sujeto en o con el cumplimiento con el estudio

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> MA, Dangshe
- 15 <120> MÉTODOS PARA EXTERMINAR CÉLULAS CANCEROSAS QUE EXPRESAN PSMA, RESISTENTES A TAXANO
- <130> P0741.70011WO00
- <140> 09789284.8
- <141 > 08/09/2009
- <150> 61/095,300
- 20 <151> 08/09/2008
- <150> 61/205,395
- <151 > 20/01/2009
- <160> 33
- <170> PatentIn version 3.1
- 25 <210> 1
- <211> 750
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 438 495 T3

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe  
20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu  
35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu  
50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile  
65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile



ES 2 438 495 T3

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val  
340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro  
355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly  
370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg  
385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile  
405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr  
420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala  
435 440 445

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val  
450 455 460

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu  
465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser  
485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile  
500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu  
515 520 525

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn  
530 535 540

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu  
545 550 555 560

Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
565 570 575

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val

ES 2 438 495 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     | 580 |     | 585 |     | 590 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Pro | Phe | Asp | Cys | Arg | Asp | Tyr | Ala | Val | Val | Leu | Arg | Lys | Tyr | Ala |  |  |  |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     | 605 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Lys | Ile | Tyr | Ser | Ile | Ser | Met | Lys | His | Pro | Gln | Glu | Met | Lys | Thr |  |  |  |  |
|     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Tyr | Ser | Val | Ser | Phe | Asp | Ser | Leu | Phe | Ser | Ala | Val | Lys | Asn | Phe | Thr |  |  |  |  |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |  |  |  |  |
| Glu | Ile | Ala | Ser | Lys | Phe | Ser | Glu | Arg | Leu | Gln | Asp | Phe | Asp | Lys | Ser |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |  |  |  |  |
| Asn | Pro | Ile | Val | Leu | Arg | Met | Met | Asn | Asp | Gln | Leu | Met | Phe | Leu | Glu |  |  |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Ala | Phe | Ile | Asp | Pro | Leu | Gly | Leu | Pro | Asp | Arg | Pro | Phe | Tyr | Arg |  |  |  |  |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |  |  |  |  |
| His | Val | Ile | Tyr | Ala | Pro | Ser | Ser | His | Asn | Lys | Tyr | Ala | Gly | Glu | Ser |  |  |  |  |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Phe | Pro | Gly | Ile | Tyr | Asp | Ala | Leu | Phe | Asp | Ile | Glu | Ser | Lys | Val | Asp |  |  |  |  |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |  |  |  |  |
| Pro | Ser | Lys | Ala | Trp | Gly | Glu | Val | Lys | Arg | Gln | Ile | Tyr | Val | Ala | Ala |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |  |  |  |  |
| Phe | Thr | Val | Gln | Ala | Ala | Ala | Glu | Thr | Leu | Ser | Glu | Val | Ala |     |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |  |  |  |  |

<210>2

<211> 7570

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400>2

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gacggatcgg | gagatctccc | gatcccctat | ggtcgactct | cagtacaatc | tgctctgatg | 60  |
| ccgcatagtt | aagccagtat | ctgctccctg | cttggtgtgt | ggaggtcgct | gagtagtgcg | 120 |
| cgagcaaaat | ttaagctaca | acaaggcaag | gcttgaccga | caattgcatg | agaatctgc  | 180 |

ES 2 438 495 T3

ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagtlattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccataa gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc aattggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgac aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggaacttc ctacttggca gtacatctac gtattagtea 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactcgc ccattgacg caaatgggcg 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgctactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctaga 900  
 ggtaccaagc ttgatctca ccatggagt gggactgccc tggggcttcc tcggtgctct 960  
 tttaaagagt gtccagtgtc aggtgcaatt ggtggagtct gggggaggcg tgggtccagcc 1020  
 tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc gtctggattc gccttcagta gatatggcat 1080  
 gcaactgggtc cggcaggctc caggcaagg gctggagtgg gtggcagtta tatggtatga 1140  
 tggaaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga ttcaccatct ccagagaaa 1200  
 ttccaagaac acgcagtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggctgtgta 1260  
 ttactgtgag agaggcggtg acttctctca ctactactat tacggtatgg acgtctgggg 1320  
 ccaagggacc acggtcaccg tctctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tottccccct 1380  
 ggcaccctct agcaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga 1440  
 ctacttccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gggcgtgca 1500  
 cacctcccg gctgtcctac agtctcagg actctactcc ctgagcagcg tggtgaccgt 1560  
 gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 1620  
 caccaagggt gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggaggagggg tgtctgctgg 1680  
 aagccaggct cagcgtcctt gcctggagc atcccggcta tgcagtcca gtccagggca 1740  
 gcaaggcagg ccccgctgtc ctcttacc ccaggcctct gccgcccc ctcatgctca 1800  
 gggagagggg cttctggctt tttcccagg ctctgggag gcacaggcta ggtgccctca 1860  
 acccaggccc tgcacacaaa ggggcagggt ctgggctcag acctgccaag agccatatcc 1920  
 gggaggaccc tgcccctgac ctaagcccac cccaaggcc aaactctcca ctccctcagc 1980  
 tcggacacct tctctctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagagccca 2040

ES 2 438 495 T3

aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc 2100  
cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta gagtagcctg catccagggg caggccccag 2160  
ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct tctcagcac ctgaactcct ggggggaccg 2220  
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 2280  
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 2340  
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 2400  
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgct ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 2460  
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 2520  
gcaaagggtg ggaccctggt ggtgcgaggg ccacatggac agaggccggc tcggcccacc 2580  
ctctgccctg agagtgaccg ctgtaccaac ctctgtccct acagggcagc cccgagaacc 2640  
acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac 2700  
ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 2760  
gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct 2820  
ctatagcaag ctccacgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc 2880  
cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg 2940  
taaagtgaaa ttctctgagt ctagagggcc cgtttaaacc cgtgatcag cctegaactgt 3000  
gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg ccctcccc gtgccttct tgaccctgga 3060  
aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag 3120  
taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaaggggg aggattggga 3180  
agacaatagc aggcattgctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac 3240  
cagctggggc tctagggggg atccccacgc gcctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg 3300  
tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc cgcctcttt 3360  
cgctttcttc ccttctttc tcgccacgtt cgcggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 3420  
gggcatcctt ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga 3480  
ttaggggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gcccttgac 3540  
gttgagctc acgttcttta atagtggact ctgtttccaa actggaacaa cactcaaccc 3600  
tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attggttaa 3660  
aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta 3720  
gggtgtggaa agtcccagc ctcccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa 3780  
ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggetcccca gcaggcagaa gtatgcaaag 3840  
catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta actccgcca tcccgccct 3900

ES 2 438 495 T3

aactccgccc agttccgccc attctccgcc coatggctga ctaatTTTTT ttatttatgc 3960  
agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctTTTTTgg 4020  
aggcctaggg ttttgcaaaa agctcccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca 4080  
gcacgtgatg aaaaagcctg aactcaccgc gacgtctgtc gagaagtTtc tgatcgaaaa 4140  
gttcgacagc gtctccgacc tgatgcagct ctcggagggc gaagaatctc gtgctttcag 4200  
cttcgatgta ggagggcgtg gatatgtcct gcgggtaaat agctgcgccg atggttteta 4260  
caaagatcgt tatgtttatc ggcactttgc atcggccgcg ctcccgatc cggaagtgtc 4320  
tgacattggg gaattcagcg agagcctgac ctattgcac tcccgcctg cacagggtgt 4380  
cacgttgcaa gacctgcctg aaaccgaact gcccgctgtt ctgcagccgg tcgaggaggc 4440  
catggatgcg atcgcctgcgg ccgatcttag ccagacgagc gggttcggcc cattcggacc 4500  
gcaaggaatc ggtcaataca ctacatggcg tgatttcata tgcgcgattg ctgatcccca 4560  
tgtgtatcac tggcaaaactg tgatggacga caccgtcagt gcgtccgtcg cgcaggctct 4620  
cgatgagctg atgctttggg ccgaggactg ccccgaaTtc cggcacctcg tgcacgcgga 4680  
tttcggctcc aacaatgtcc tgacggacaa tggccgcata acagcggTca ttgactggag 4740  
cgaggcgatg ttcggggatt cccaatacga ggtcgccaac atcttcttct ggaggccgtg 4800  
gttggttgt atggagcagc agacgogcta cttcgagcgg aggcattccg agcttgcagg 4860  
atcgcgcgg ctccgggctg atatgctccg cattggctct gaccaactct atcagagctt 4920  
ggttgacggc aatttcgatg atgcagcttg ggcgcagggt cgatgcgacg caatcgtccg 4980  
atccggagcc gggactgtcg ggcgtacaca aatcgcccgc agaagcgcgg ccgtctggac 5040  
cgatggctgt gtagaagtac tcgccgatag tggaaaaccga cgcgccagca ctgctccgag 5100  
ggcaaaggaa tagcacgtgc tacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt 5160  
gggcttcgga atcgTTTTcc gggacgcgg ctggatgac ctccagcgcg gggatctcat 5220  
gctggagttc ttgcgccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag 5280  
caatagcatc acaaatTTca caaataaagc atTTTTTTca ctgcattota gttgtggttt 5340  
gtccaaacte atcaatgtat cttatcatgt ctgtataacc togacctota gctagagctt 5400  
ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460  
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggT gcctaatgag tgagctaact 5520  
cacattaatt gcgtTgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5580  
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag agcggtttg cgtattgggc gctctccgc 5640  
ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggT cgttcggctg cggcgagcgg taccagctca 5700  
ctcaaaggcg gtaatacggT tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760

ES 2 438 495 T3

agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5820  
 taggetccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5880  
 cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940  
 tgttccgacc ctgcegctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000  
 gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct 6060  
 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120  
 tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180  
 gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggctaacta 6240  
 cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300  
 aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 6360  
 tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420  
 ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag 6480  
 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat 6540  
 ctaaagtata tatgagtaaa cttggctctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600  
 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcctc catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 6660  
 aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc 6720  
 acgctcacog gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 6780  
 aagtgtcct gcaactttat ccgctccat ccagctctatt aattggtgcc ggaagctag 6840  
 agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900  
 ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960  
 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020  
 tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatgggt atggcagcac tgcataatc 7080  
 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140  
 attctgagaa tagtgtatgc ggogaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 7200  
 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg 7260  
 aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc 7320  
 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aacaggaag 7380  
 gcaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440  
 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatcacatatt 7500  
 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 7560  
 acctgacgtc 7570

ES 2 438 495 T3

<211> 7597

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Plásmido

<400> 3

```

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggteget gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata      300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc      360
ccgcccatt gagtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt      540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccacocca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg      780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca      840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctaga      900
ggtaccaagc ttggatctca ccatggggtc aaccgccatc ctaccatgg agttggggct      960
gcgctggggt ctctcgttg ctcttttaag aggtgtccag tgtcaggtgc agctgggtgga     1020
gtctggggga ggcgtggtcc agcctgggag gtccttgaga ctctcctgtg cagcgtctgg     1080
attcaccttc agtaactatg tcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga     1140
gtgggtggca attatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg     1200
ccgattcaoc atctccagag acaattocaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct     1260
gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcgggtgga tataactgga actacgagta     1320
ccactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagcctc     1380
caccaagggc ccatcggctc tccccctggc accctctagc aagagcacct ctggggggcac     1440

```

ES 2 438 495 T3

agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa 1500  
 ctcagycgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact 1560  
 ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat 1620  
 ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc 1680  
 agcacaggga gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcac 1740  
 ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga 1800  
 ggctctgcc cgccccactc atgctcaggg agagggctct ctggcttttt ccccaggctc 1860  
 tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg 1920  
 ggctcagacc tgccaagagc catatccggg aggaccctgc ccctgacctc agcccacccc 1980  
 aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctctcccag attccagtaa 2040  
 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt 2100  
 gcccaggtaa gccagcccag gcctgcacct ccagctcaag gggggacagg tgccctagag 2160  
 tagcctgcat ccagggacag gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttc 2220  
 tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 2280  
 acctcatga tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa 2340  
 gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 2400  
 aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 2460  
 caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 2520  
 gccccatcg agaaaacct ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca 2580  
 catggacaga ggccggctcg gcccacctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc 2640  
 tgtccctaca gggcagccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga 2700  
 gatgaccaag aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat 2760  
 cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt 2820  
 gctggactcc gacggctcct tcttctctc tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg 2880  
 gcagcagggg aacqcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 2940  
 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgagaattc ctcgagtcta gagggcccgt 3000  
 ttaaaccgcg tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgcc 3060  
 ctccccctg ccttcttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa 3120  
 tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg 3180  
 gcaggacagc aagggggagg attggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg 3240  
 ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct agggggatc cccacgcgcc 3300

ES 2 438 495 T3

ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 3360  
 tgccagcgcc ctagcgcgcg ctcccttcgc tttcttcctt tcctttctcg ccacgttcgc 3420  
 cggctttccc cgtaagctc taaatcgggg catcccttta gggttccgat ttagtgcttt 3480  
 acggcacctc gacccccaaa aacttgatta ggggatgggt tcacgtagtg ggccatcgcc 3540  
 ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 3600  
 gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctccgtctat tcttttgatt tataagggat 3660  
 tttggggatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 3720  
 ttaattctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagggctc ccagggcagg 3780  
 cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg 3840  
 ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcctctcaat tagtcagcaa ccatagtccc 3900  
 gccctaact ccgcccctcc cggccctaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccc 3960  
 tggctgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt 4020  
 ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc 4080  
 ttgtatatcc attttcggat ctgatcagca cgtgatgaaa aagcctgaac tcaccgcgac 4140  
 gtctgtcgag aagtttctga tcgaaaagt cgcagcgcgc tccgacctga tgcagctctc 4200  
 ggaggggcga gaatctcgtg ctttcagctt cgatgtagga gggcgtggat atgtctcgcg 4260  
 ggtaaatagc tcgcccgatg gtttctacaa agatcgttat gtttatcggc actttgcctc 4320  
 ggccgcgcgc ccgattccgg aagtcttga cattggggaa ttcagcgaga gcctgacct 4380  
 ttgatctccc cgcctgcac aggggtgcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc 4440  
 cgctgttctg cagccggtcg cggaggccat ggatgcgac gctgcggccg atcttagcca 4500  
 gacgagcggg ttcggcccat tcggaccgca agaatcgggt caatacacta catggcgtga 4560  
 tttcatatgc gcgattgctg atccccatgt gtatcactgg caaactgtga tggacgacac 4620  
 cgtcagtgcg tccgtcgcgc aggcctctca tgagctgatg ctttgggccc aggactgccc 4680  
 cgaagtccgg cacctcgtgc acgcggatct cggctccaac aatgtcctga cggacaatgg 4740  
 ccgcataaca gcggtcattg actggagcga ggcgatgttc ggggattccc aatacgaggt 4800  
 cgccaacatc ttcttctgga ggccgtggtt ggcttgtatg gagcagcaga cgcgctactt 4860  
 cgagcggagg catccggagc ttgcaggatc gccgcggctc cgggcgtata tgctccgcat 4920  
 tggctctgac caactctatc agagcttggg tgacggcaat ttcgatgatg cagcttgggc 4980  
 gcagggtcga tgcgacgcaa tcgtccgatc cggagccggg actgtcgggc gtacacaaat 5040  
 cggccgcaga agcgcggccg tctggaccga tggetgtgta gaagtactcg ccgatagtgg 5100  
 aaaccgacgc cccagcactc gtccgagggc aaaggaatag cacgtgctac gagatttcga 5160

ES 2 438 495 T3

ttocaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttecggaatc gttttccggg acgccggctg 5220  
 gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacccca acttgtttat 5280  
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 5340  
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcacc aatgtatctt atcatgtctg 5400  
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg 5460  
 aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 5520  
 ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgttt 5580  
 ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg 5640  
 cggtttgctg attgggcgct ctccgcttc ctgcctcact gactcgtcgc gctcggctgt 5700  
 tcggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 5760  
 aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 5820  
 aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 5880  
 tcgacgtca agtcagaggt ggogaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 5940  
 ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 6000  
 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag 6060  
 ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 6120  
 ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtcacaac ccggtgaagac acgacttacc 6180  
 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 6240  
 agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 6300  
 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 6360  
 aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattaccg gcagaaaaaa 6420  
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 6480  
 ctacagttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 6540  
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaacct ggtctgacag 6600  
 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacagcagc tgtctatttc gttcatccat 6660  
 agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 6720  
 cagtgctgca atgataccgc gagaccacag ctacccggct ccagatttat cagcaataaa 6780  
 ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 6840  
 gtctattaat tggtgcccgg aagctagagt aagtagttcg ccagtttaata gtttgogcaa 6900  
 cgttggtgcc attgctacag gcacgtgtgt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 6960  
 cagctccggt tcccaacgat caaggcaggt tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc 7020

ES 2 438 495 T3

ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 7080  
 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 7140  
 tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 7200  
 ctcttgcccg gogtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgtc 7260  
 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 7320  
 cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcactcttta ctttcaccag 7380  
 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggaa taagggcgac 7440  
 acgaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 7500  
 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 7560  
 tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtc 7597

<210> 4

<211> 7579

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 4

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata 300  
 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgccatt gacgtcaata atgaogtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc a ttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gectggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatgggag 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840

ES 2 438 495 T3

ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 ggtaccaagc ttggatctca ccatggagtt gggacttagc tgggttttcc tcgttgctct 960  
 ttttaagaggt gtccagtgtc aggtccagct ggtggagctt gggggagggc tgggtccagcc 1020  
 tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc gtctggatto accttcagta gctatggcat 1080  
 gcactgggtc cggcaggctc caggcaaggg gctggactgg gtggcaatta tttggcatga 1140  
 tggaaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa 1200  
 ttccaagaag acgctgtacc tgcaaatgaa cagtttgaga gccgaggaca cggctgtgta 1260  
 ttactgtgcg agagcttggg cctatgacta cggtgactat gaatactact tcggtatgga 1320  
 cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcggc 1380  
 cttccccctg gcaccctcta gcaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct 1440  
 ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag 1500  
 cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt 1560  
 ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia 1620  
 gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtgagagg ccagcacagg gagggaggg 1680  
 gtctgtgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca tcccggctat gcagtcccag 1740  
 tccagggcag caaggcaggc cccgtctgce tcttcaaccg gaggcctctg cccgccccac 1800  
 tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt tccccaggc tctgggcagg cacaggctag 1860  
 gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcaggtgc tgggctcaga cctgccaaga 1920  
 gccatatccg ggaggacct gccctgacc taagcccacc ccaaaggcca aactctccac 1980  
 tccctcagct cggacacct ctctcctccc agattccagt aactcccaat cttctctctg 2040  
 cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgccaggc aagccagccc 2100  
 aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccaggac 2160  
 aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt cctcagcacc tgaactcctg 2220  
 gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 2280  
 acccctgagg tccatgctg ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 2340  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggagagcag 2400  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 2460  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 2520  
 atctccaaag ccaaaggtgg gaccctggtg gtgcgagggc cacatggaca gaggccggct 2580  
 cggccccacc tctgccctga gactgaccgc tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc 2640  
 ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atccccggag gagatgacca agaaccaggc 2700

ES 2 438 495 T3

cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 2760  
 caatgggcag cgggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc 2820  
 cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 2880  
 ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct 2940  
 gtctccgggt aatgagaat tcctcgagtc tagagggccc gtttaaaccg gctgatcagc 3000  
 ctcgactgtg cttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg tgccttctt 3060  
 gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 3120  
 ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga 3180  
 ggattgggaa gacaatagca ggcattgctg ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc 3240  
 ggaaagaacc agctggggct ctagggggta tccccacgcg cctgtagcg gcgcattaag 3300  
 cgcgcggggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc 3360  
 cgctccttcc gcttcttcc cttcctttct cgccagcttc gccggcttcc cccgtcaagc 3420  
 tctaaatcgg ggcattccct tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa 3480  
 aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg cctgataga cggtttttcg 3540  
 ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac 3600  
 actcaaccct atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgggga tttcggccta 3660  
 ttggttaaaa aatgagctga tttacaataa atttaacgag aattaattct gtggaatgtg 3720  
 tgtcagttag ggtgtggaag gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat 3780  
 gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 3840  
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat 3900  
 ccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgcc catggctgac taattttttt 3960  
 tatttatgca gaggccgagg ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 4020  
 cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctcccggga gcttgatat ccattttcgg 4080  
 atctgatcag cacgtgatga aaaagcctga actcaccgag acgtctgtcg agaagtttct 4140  
 gatgaaaag ttcgacagcg tctccgacct gatgcagctc tcggagggcg aagaatctcg 4200  
 tgctttcagc ttcgatgtag gagggcgtgg atatgtctct cgggtaataa gctgcgccga 4260  
 tggtttctac aaagatcgtt atgtttatcg gcactttgca tcggccgcgc tcccgattec 4320  
 ggaagtgctt gacattgggg aattcagcga gagcctgacc tattgcatct ccgcccgtgc 4380  
 acaggggtgc acgttgcaag acctgcctga aaccgaactg ccgctgttc tgcagccggt 4440  
 cgcgagggcc atggatgca tcgctgcggc cgatcttagc cagacgagcg ggttcggccc 4500  
 attcggaccg caaggaatcg gtcaatacac tacatggcgt gatttcatat gcgcgattgc 4560

ES 2 438 495 T3

tgatccccat gtgtatcact ggcaaaactgt gatggacgac accgtcagtg cgtcctgctgc 4620  
 gcaggctctc gatgagctga tgctttgggc cgaggactgc cccgaagtcc ggcacctcgt 4680  
 gcacgcggat ttcggctcca acaatgtcct gacggacaat ggccgcataa cagcggtcac 4740  
 tgactggagc gaggcgatgt tcggggattc ccaatacagag gtcgccaaca tcttcttctg 4800  
 gaggccgtgg ttggcttgta tggagcagca gacgcgctac ttcgagcggg ggcacccgga 4860  
 gcttgacagga tcgccgcggc tccgggogta tatgctcgc attggtcttg accaactcta 4920  
 tcagagcttg gttgacggca atttcgatga tgcagcttgg gcgcagggtc gatgcgacgc 4980  
 aatcgtccga tccggagccg ggactgtcgg gcgtacacaa atcgcccgca gaagcgcggc 5040  
 cgtctggacc gatggctgtg tagaagtact cgccgatagt ggaaaccgac gccccagcac 5100  
 tcgtccgagg gcaaaggaat agcacgtgct acgagatttc gattccaccg ccgccttcta 5160  
 tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg 5220  
 ggatctcatg ctggagttct tcgccacccc caacttgttt attgcagctt ataatggtta 5280  
 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 5340  
 ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgacctctag 5400  
 ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac 5460  
 aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatgagt 5520  
 gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt tccagtcgg gaaacctgtc 5580  
 gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg 5640  
 ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc 5700  
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 5760  
 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctggc 5820  
 gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag 5880  
 gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccoctggaa gctccctcgt 5940  
 gcgctctcct gttccgacce tgcgccttac cggataacctg tccgcctttc tcccttcggg 6000  
 aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 6060  
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gacogctgcg cttatccgg 6120  
 taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac 6180  
 tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg 6240  
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt 6300  
 taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 6360  
 tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 6420

ES 2 438 495 T3

ttgatcttt tctacgggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 6480  
 ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt 6540  
 taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctgac agttaccaat gcttaatcag 6600  
 tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tggttcatcc atagttgctt gactccccgt 6660  
 cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgtg caatgatacc 6720  
 gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 6780  
 cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg 6840  
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac 6900  
 aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 6960  
 atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc 7020  
 tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact 7080  
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 7140  
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat 7200  
 acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc 7260  
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 7320  
 tegtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 7380  
 aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact 7440  
 catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gttattgtc tcatgagcgg 7500  
 atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg 7560  
 aaaagtgcc cctgacgctc 7579

<210> 5

<211> 7558

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 5

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

ES 2 438 495 T3

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360  
ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgceca cttggcagta catcaagtgt 480  
atcatatgcc aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600  
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780  
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
ggtaccaagc ttgatccca ccatggggtc aaccgtcatc ctgcccctcc tcctggctgt 960  
tctccaagga gtctgtgccg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc 1020  
cggggagtct ctgaagatct cctgtaaggg ttctggatac agctttacca gttactggat 1080  
cggtgggtg cgccagatgc cgggaaagg cctggagtgg atggggatca tctatcctgg 1140  
tgactctgat accagataca gcccgctcctt ccaaggccag gtcaccatct cagccgaaa 1200  
gtccatcagc accgcctacc tgcagtggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta 1260  
ttactgtgcg agacggatgg cagcagctgg cccctttgac tactggggcc agggaacct 1320  
ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctag 1380  
caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga 1440  
accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcggtgcaca ccttcccggc 1500  
tgtctacag tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag 1560  
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga 1620  
caagagagtt ggtgagaggc cagcacaggg agggagggtg tctgctggaa gccaggctca 1680  
gcgctcctgc ctggacgcat cccggctatg cagtcccagt ccagggcagc aaggcaggcc 1740  
cgtctgcct cttacccgg aggcctctgc ccgccccact catgctcagg gagagggctct 1800  
tctggctttt tccccaggct ctgggcaggc acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg 1860  
cacacaaagg ggcaggtgct gggctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggacctg 1920  
cccctgacct aagcccacc caaaggccaa actctccact ccctcagctc ggacaccttc 1980  
tctcctcca gattccagta actcccaatc ttctctctgc agagcccaa tcttgtgaca 2040  
aaactcacac atgccaccg tgcccaggta agccagccca ggctcggcc tcagctcaa 2100

ES 2 438 495 T3

ggcgggacag gtgcctaga gtagcctgca tccagggaca ggccccagcc ggggtgtgac 2160  
 acgtccacct ccatctcttc ctgagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc 2220  
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgctgtg 2280  
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggaocggctg 2340  
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtacogtgtg 2400  
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 2460  
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg 2520  
 acccgtgggg tgcgagggcc acatggacag aggcgcgtc ggcccaccct ctgccctgag 2580  
 agtgaccgct gtaccaacct ctgtccctac agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac 2640  
 cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa 2700  
 aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa 2760  
 ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct 2820  
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga 2880  
 ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt 2940  
 cctcagctct agagggcccg tttaaaccog ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg 3000  
 ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttctctg accctggaag gtgccactcc 3060  
 cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcat tgtctgagta ggtgtcattc 3120  
 tattctgggg ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag 3180  
 gcatgctggg gatgcggtgg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc 3240  
 tagggggtat cccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcggtg tgggtggttac 3300  
 gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg ctttcttccc 3360  
 ttctttctc gccacgttcg ccggctttcc cagtcaagct ctaaactcggg gcatcccttt 3420  
 agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaa aaacttgatt agggtgatgg 3480  
 ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggTTTTTcgc cctttgacgt tggagtccac 3540  
 gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctca 3600  
 ttcttttgat ttataaggga ttttggggat ttccggcctat tggttaaaaa atgagctgat 3660  
 ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag 3720  
 tccccaggct ccccaggcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac 3780  
 cagggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca 3840  
 ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgccatc ccgcccctaa ctccgcccag 3900  
 ttccgcccct tctccgccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggcggaggc 3960

ES 2 438 495 T3

cgctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggcct 4020  
 ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatata cattttcggg tctgatcagc acgtgatgaa 4080  
 aaagcctgaa ctcaccgcga cgtctgtcga gaagtttctg atcgaaaagt tcgacagcgt 4140  
 ctccgacctg atgcagctct cggaggggga agaattctct gctttcagct tcgatgtagg 4200  
 agggcgtgga tatgtcctgc gggtaaatag ctgcgccgat ggtttctaca aagatcgtaa 4260  
 tgtttatcgg cactttgcat cggccgcgct cccgattccg gaagtgcctg acattgggga 4320  
 attcagcgag agcctgacct attgcatctc ccgccgtgca cagggtgtca cgttgcaaga 4380  
 cctgcctgaa accgaactgc ccgctgttct gcagccggtc gcggaggcca tggatgcgat 4440  
 cgctgcggcc gatcttagcc agacgagcgg gttcggcca ttcggaccgc aaggaatcgg 4500  
 tcaatacact acatggcgtg atttcatatg cgcgattgct gatcccatg tgtatcactg 4560  
 gcaaactgtg atggacgaca ccgtcagtgc gtccgtcgcg caggctctcg atgagctgat 4620  
 gctttgggcc gaggactgcc ccgaagtccg gcacctcgtg cacgcggatt tcggctcaa 4680  
 caatgtcctg acggacaatg gccgcataac agcggtcatt gactggagcg aggcgatgtt 4740  
 cggggattcc caatacgagg tcgccaacat cttcttctgg aggccgtggg tggcttgtat 4800  
 ggagcagcag acgcgctact tcgagcggag gcatccggag cttgcaggat cgcgcggct 4860  
 ccggcgtat atgctccgca ttggtcttga ccaactctat cagagcttgg ttgacggcaa 4920  
 tttcgatgat gcagcttggg cgcagggtcg atgcgacgca atcgtccgat ccggagccgg 4980  
 gactgtcggg cgtacacaaa tcgcccgcag aagcgcggcc gtctggaccg atggetgtgt 5040  
 agaagtactc gccgatagtg gaaaccgacg ccccagcact cgtccgaggg caaaggaata 5100  
 gcacgtgcta cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg gcttcggaat 5160  
 cgttttccgg gacgcggct ggatgatcct ccagcgcggg gatotcatgc tggagtctt 5220  
 cgcccacccc aacttgitta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 5280  
 aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 5340  
 caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg cgtaatcatg 5400  
 gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc 5460  
 cgggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc 5520  
 gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat 5580  
 cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgtcac 5640  
 tgactcgtcg cgtcggctcg ttcggctcgc gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg 5700  
 aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca 5760  
 gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc 5820

ES 2 438 495 T3

ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc cgacaggact 5880  
 ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct 5940  
 gccgcttacc ggatacctgt cgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg 6000  
 ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 6060  
 cgaaccccc gttcagccc accgctcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa 6120  
 cccgtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 6180  
 gaggtatgta ggcggtgcta cagagtctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 6240  
 aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 6300  
 tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 6360  
 gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc 6420  
 tgacgctcag tggaaacgaa actcagtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 6480  
 gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata 6540  
 tgagtaaact tggctcagca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 6600  
 ctgtctatth cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatac 6660  
 ggagggtta ccatctggcc ccagtctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 6720  
 tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaagggc gagcgcagaa gtggctctgc 6780  
 aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag taagtagttc 6840  
 gccagttaat agtttgccca acgttgtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc 6900  
 gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg tcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 6960  
 ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc ctccggctct ccgatcgttg tcagaagtaa 7020  
 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 7080  
 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata 7140  
 gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca 7200  
 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag 7260  
 gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 7320  
 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 7380  
 aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttc tttttcaata 7440  
 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 7500  
 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgctc 7558

<210> 6

<211> 7576

ES 2 438 495 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

5

<400> 6

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcy atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
 tggagttcgg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcy 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 ggtaccaagc ttggatctca ccatggagtt tgggctgtgc tggattttcc tcgttgctct 960  
 ttttaagaggt gtccagtgtc aggtgcagct ggtggagctc gggggaggcg tggccagcc 1020  
 tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcatta gctatggcat 1080  
 gcactgggtc cgccaggctc caggcaaggg gctggagtggt gtggcagtta tatcatatga 1140  
 tggagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggcoga ttcaccatct ccagagacaa 1200  
 ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gctgaggaca cgctgtgta 1260  
 ttactgtgcy agagtattag tgggagcttt atattattat aactactacg ggatggacgt 1320  
 ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc accaagggcc catcggtctt 1380  
 cccctggca cctctagca agagcacctc tgggggcaca gggccctgg gctgcctggt 1440  
 caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg 1500  
 cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt 1560

ES 2 438 495 T3

gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc 1620  
cagcaacacc aaggtggaca agagagttgg tgagaggcca gcacagggag ggaggggtgc 1680  
tgctggaagc caggctcagc gctcctgcct ggacgcctcc cggctatgca gtcccagctc 1740  
agggcagcaa ggcaggcccc gtctgcctct tcacccggag gcctctgccc gcccactca 1800  
tgctcagggg gagggctctc tggctttttc cccaggtctc gggcaggcac aggctaggtg 1860  
cccctaacc c aggcctgca cacaaagggg caggtgctgg gctcagacct gccaaagacc 1920  
atatccggga ggacctgce cctgacctaa gccacccca aaggccaaac tctccactcc 1980  
ctcagctcgg acacctctc tctctccaga ttccagtaac toccaatctt ctctctgcag 2040  
agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccaggtaag ccagcccagg 2100  
cctcgcctc cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt agcctgcac cagggacagg 2160  
ccccagccgg gtgctgacac gtccacctcc atctcttct cagcacctga actcctgggg 2220  
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 2280  
cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2340  
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 2400  
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2460  
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccate 2520  
tccaaagcca aaggtgggac ccgtgggtg cgagggccac atggacagag gccggctcgg 2580  
cccacctct gccctgagag tgacctgtt accaacctct gtcctacag ggcagccccg 2640  
agaaccacag gtgtacacc tgcacctc cgggaggag atgaccaaga accaggtcag 2700  
cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa 2760  
tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt 2820  
cttctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc 2880  
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc 2940  
tccgggtaaa tgagaattcc tcgagtctag agggcccgtt taaaccgct gatcagcctc 3000  
gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc ctctctgac 3060  
cctggaaggt gccactcca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catogcattg 3120  
tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 3180  
ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcggg 3240  
aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc 3300  
ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggcc tagcggccgc 3360  
tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc caogttcgcc ggctttcccc gtcaagctct 3420

ES 2 438 495 T3

aaatcggggc atccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa 3480  
 acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg ttttctgccc 3540  
 tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact 3600  
 caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttggggattt cggcctattg 3660  
 gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt 3720  
 cagttagggg gtggaaagtc cccaggctcc ccaggcaggc agaagtatgc aaagcatgca 3780  
 tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat 3840  
 gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg ccctaactc cgcccatccc 3900  
 gccctaactc cggcccagtt ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa ttttttttat 3960  
 ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 4020  
 ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca tttctggatc 4080  
 tgatcagcac gtgatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat 4140  
 cgaaaagtcc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc 4200  
 tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgcctcgcg gtaaatagct gcgccgatgg 4260  
 tttctacaaa gatcgttatg tttatcggca ctttgcctcg gccgcgctcc cgattccgga 4320  
 agtgcttgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcattctccc gccgtgcaca 4380  
 ggggtgtcac ttgcaagacc tgctgaaac cgaactgccc gctgttctgc agccggtcgc 4440  
 ggaggccatg gatgcgatcg ctgcggccga tcttagccag acgagcgggt tcggcccatt 4500  
 cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga 4560  
 tccccatgtg tateactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgcgca 4620  
 ggctctcgat gagctgatgc tttgggcccga ggactgcccc gaagtccggc acctcgtgca 4680  
 cgcggatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga 4740  
 ctggagcgag gcgatgttcg gggattocca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag 4800  
 gccgtggttg gcttgtatgg agcagcagac gcgctacttc gagcggaggc atccggagct 4860  
 tgcaggatcg ccgcgctcc gggcgatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca 4920  
 gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcg cagggtcgat gcgacgcaat 4980  
 cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcg tacacaaatc gccgcagaa gcgcggccgt 5040  
 ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtgga aaccgacgcc ccagcactcg 5100  
 tccgagggca aaggaatagc acgtgctacg agatttcgat tccaccgccg ccttctatga 5160  
 aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgcgggctgg atgacctcc agcgcgggga 5220  
 tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 5280

ES 2 438 495 T3

ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg 5340  
 tgglttgtec aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtoga cctctagcta 5400  
 gagcttggcg taatcatggt catagctggt tectgtgtga aattgttatc cgctcacaat 5460  
 tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagtgag 5520  
 ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcaet gcccgctttc cagtcgggaa acctgtctgt 5580  
 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 5640  
 ttccgcttcc tcgctcaetg actcgtctgc ctcggtctgt cggctgcggc gagcggtatc 5700  
 agctcaetca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 5760  
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa aaggccgctg tgcctggcgtt 5820  
 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 5880  
 gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg 5940  
 ctctcctggt ccgacctgc cgtttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag 6000  
 cgtggcgtt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtag tcgttcgctc 6060  
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa 6120  
 ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 6180  
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc 6240  
 taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac 6300  
 ctccgaaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 6360  
 ttttttgggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt 6420  
 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 6480  
 catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatccttcta aattaaat gaagttttaa 6540  
 atcaatctaa agtatatatg agtaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 6600  
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttgg ttcattccata gttgcctgac tccccgctg 6660  
 gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg 6720  
 agaccacgc tcaccgctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggcga 6780  
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaat gttgcccggg 6840  
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg 6900  
 catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 6960  
 aaggcgagtt acatgatccc ccattgtgtg caaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 7020  
 gatcgttctc agaagtaagt tggccgagc gttatcctc atggttatgg cagcactgca 7080  
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac 7140

ES 2 438 495 T3

caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 7200  
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 7260  
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc 7320  
 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 7380  
 aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaa aagggcgaca cggaaatgt gaatactcat 7440  
 actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata 7500  
 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa 7560  
 agtgccacct gacgtc 7576

<210> 7

<211> 7561

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 7

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgc gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcy atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgocca cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccca gctggctaga 900  
 ggtaccgat ctcccatgg agttggggct gagctgggtt ttctcgttg ctcttttaag 960

ES 2 438 495 T3

aggtgtccag tgtcaggagc agctggtgga gtctggggga ggcgtggtcc agcctgggag 1020  
 gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc agtacctatg gcatgcactg 1080  
 ggtcogccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttacatggc atgatggaag 1140  
 taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaactccaa 1200  
 gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg 1260  
 tgcgagagga ggagtgggag caacttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca 1320  
 agggaccacg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc 1380  
 accctctagc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgctgg tcaaggacta 1440  
 cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcggtgcacac 1500  
 cttccccgct gtccacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc 1560  
 ctccagcagc ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac 1620  
 caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacagga gggaggggtg ctgctggaag 1680  
 ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcac cggctatgc agtcccagtc cagggcagca 1740  
 aggcaggccc cgtctgcctc ttcaccggga ggctctgcc cgccccactc atgctcaggg 1800  
 agagggctct ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc 1860  
 caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg 1920  
 aggaccctgc ccctgacctc agccccccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg 1980  
 gacaccttct ctctccagc attccagtaa ctcccaatct tctctctgca gagccccaat 2040  
 cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgcct 2100  
 ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg 2160  
 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg gggaccgtea 2220  
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctccggac ccctgaggtc 2280  
 acatgcgtgg tggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 2340  
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg 2400  
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 2460  
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccc gccccatcg agaaaacct ctccaagcc 2520  
 aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gcccaccctc 2580  
 tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca 2640  
 ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg 2700  
 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc 2760  
 ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctc 2820

ES 2 438 495 T3

tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt 2880  
 gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa 2940  
 atgactogag tctagagggc cegttaaac ccgctgatca gcctogactg tgccttctag 3000  
 ttgccageca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac 3060  
 tcccactgtc ctttccaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 3120  
 ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 3180  
 caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg 3240  
 ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt 3300  
 tacgcgagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg cccgctcctt tcgctttctt 3360  
 cccttcttt ctgcccagct tcgccggctt tccccgtaa gctctaaatc ggggcatccc 3420  
 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggtgta 3480  
 tggttcaagt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga cgttgagtc 3540  
 caogttcttt aatagtggac tcttgtcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgtt 3600  
 ctattctttt gattataag ggatttggg gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct 3660  
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgga 3720  
 aagccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaage atgcatctca attagtcagc 3780  
 aaccagggtg gaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgaaa gcatgcatct 3840  
 caattagtc gcaaccatag tccccccct aactccgcc atccccccc taactcogcc 3900  
 cagttccgcc cattctcgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 3960  
 ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 4020  
 cttttgaaa aagctcccg gagcttgat atccattttc ggatctgatc agcacgtgat 4080  
 gaaaaagcct gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgatcgaag agttcgacag 4140  
 cgtctccgac ctgatgcagc tctcggaggg cgaagaatct cgtgctttca gttcagatg 4200  
 aggagggcgt ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatggtttct acaaagatcg 4260  
 ttatgtttat cggcactttg catcggccgc gctcccgatt ccggaagtgc ttgacattgg 4320  
 ggaattcagc gagagcctga cctattgcat ctcccgcgt gcacaggtg tcacgttgca 4380  
 agacctgct gaaaccgaac tgcccgtgt tctgcagccg gtcgaggagg ccatggatgc 4440  
 gatcgtgcg gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaat 4500  
 cgtcaatac actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca 4560  
 ctggcaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc tcgatgagct 4620  
 gatgctttgg gccgaggact gccccgaagt ccggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc 4680

ES 2 438 495 T3

caacaatgtc ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga gcgaggcgat 4740  
gttcggggat tcccaatacag aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggcttg 4800  
tatggagcag cagacgcgct acttcgagcg gaggcattccg gagcttgacg gatcgccgcg 4860  
gctccgggog tatatgctcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg 4920  
caatttcgat gatgcagctt gggcgcaggg tcgatgcgac gcaatcgtcc gatccggagc 4980  
cgggactgtc gggcgtacac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg 5040  
tgtagaagta ctgcgccgata gtggaaaccg acgccccagc actcgtccga gggcaaagga 5100  
atagcacgtg ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg 5160  
aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgetggagtt 5220  
cttcgccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat 5280  
cacaatttc acaataaag cattttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact 5340  
catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc 5400  
atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg 5460  
agccggaagc ataaagtgt aagcctggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat 5520  
tgcgttgccg tcaactgccg ctttcagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 5580  
aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgtctctccg ctctctcgct 5640  
cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 5700  
ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 5760  
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 5820  
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 5880  
actataaaga taccaggcgt ttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 5940  
cctgccgctt accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 6000  
atgctcacgc tqtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 6060  
gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 6120  
caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 6180  
agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 6240  
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 6300  
tggtagctct tgatccggca acaaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 6360  
gcagcagatt acgcgagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 6420  
gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 6480  
aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 6540

ES 2 438 495 T3

atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 6600  
 gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 6660  
 acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 6720  
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc 6780  
 tgcaacttta tccgctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 6840  
 ttccgagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg 6900  
 ctctcgtttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 6960  
 atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctctctcggc cctccgatcg ttgtcagaag 7020  
 taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7080  
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga 7140  
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata ataccgcgcc 7200  
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 7260  
 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgatc 7320  
 ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 7380  
 cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atggtgaata ctcatactct tctttttca 7440  
 atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7500  
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7560  
 c 7561

<210> 8

<211> 6082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 8

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtteat agcccatata 300  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggccccgc tggctgaccg cccaacgacc 360

ES 2 438 495 T3

cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggctgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagaccaa gctggctaga 900  
 aagcttggat ctccatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgcctggct 960  
 cccagatacc agatgtgaca tccagatgac ccagctcca tccctcctgt ctgcatctgt 1020  
 aggagacaga gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt atttagcctg 1080  
 gtatcagcag aaaacagga aagttcctaa gttcctgatc tatgaagcat ccactttgca 1140  
 atcaggggtc ccatctcggg tcagtgggcg tggatctggg acagatttca ctctccat 1200  
 cagcagcctg cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaattata acagtgcccc 1260  
 attcactttc ggccctggga ccaaagtga tatcaaagca actgtggctg caccctctgt 1320  
 cttcatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgect 1380  
 gctgaataac ttctatcca gagaggcca agtacagtgg aagggtgata acgcccctca 1440  
 atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500  
 cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgca 1560  
 agtcacccat cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620  
 ggaattcgcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg 1680  
 tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg 1740  
 aagggtgccac tcccactgct ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800  
 gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860  
 aagacaatag caggcatgct ggggatgagg tgggctctat ggcttctgag gggaaagaa 1920  
 ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 1980  
 gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg cccgctcctt 2040  
 tcgctttctt ccttctctt ctgccacgt tcgccgctt tcccgtcaa gctctaaatc 2100  
 ggggcatccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 2160  
 attaggtgga tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga 2220

ES 2 438 495 T3

cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 2280  
 ctatctcggc ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggttaa 2340  
 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400  
 aggggtgtgga aagccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460  
 attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520  
 gcatgcatct caattagtea gcaaccatag tcccgccctt aactccgccc atcccgcctt 2580  
 taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640  
 cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700  
 gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgtat atccattttc ggatctgac 2760  
 aagagacagg atgaggatcg tttcgcataa ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820  
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 2880  
 ctgatccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 2940  
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gccgctatcg tggctggcca 3000  
 cgacggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 3060  
 tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga 3120  
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3180  
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcaacg tactcggatg gaagccggtc 3240  
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300  
 ccaggctcaa ggccgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 3360  
 gcttccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcacgac tgtggccggc 3420  
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 3480  
 ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgc tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 3540  
 agcgcacgac cttctatcgc cttcttgacg agttctctcg agcgggactc tggggttcga 3600  
 aatgaccgac caagcgaagc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgctt 3660  
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tctccagcg 3720  
 cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag cttataatgg 3780  
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3840  
 tagttgtggc ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900  
 tagctagagc ttggcgtaat catggctata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 3960  
 cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag 4020  
 agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct 4080

ES 2 438 495 T3

gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4140  
 gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcggtcggc tgcggcgagc 4200  
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4260  
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4320  
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380  
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440  
 cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctccctc 4500  
 gggaaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt 4560  
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 4620  
 cgtaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4680  
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 4740  
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 4800  
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860  
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 4920  
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 4980  
 tttggtcatg agattatcaa aaagatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5040  
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat 5100  
 cagtgaggea cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 5160  
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5220  
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280  
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg 5340  
 ccgggaagct agagtaagta gttcggcagt taatagtttg cgcaacggtg ttgccattgc 5400  
 tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 5460  
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg 5520  
 tectccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc 5580  
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 5640  
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gccggcgctc 5700  
 aatacgggat aatacggcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760  
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5820  
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accageggtt ctgggtgagc 5880  
 aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 5940

ES 2 438 495 T3

actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000  
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 6060  
 ccgaaaagtg ccacctgacg tc 6082

<210> 9

<211> 6082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 9

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata 300  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600  
 tgcctattac catgggtgat cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcaogggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780  
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 aagcttgat ctccatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt 960  
 cccagtgcc agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctcactgt ctgcatctgt 1020  
 aggagacaga gtcacatca cttgtcgggc gagtcagggc attaccaatt atttagcctg 1080  
 gtttcagcag aaaccagga aagcccctaa gtcccctatc tatgctgcat ccagtttgca 1140  
 aagtggggtc ccatcaaagt tcagcggcag tggatctggg acagatttca gtctccat 1200  
 cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagttacco 1260

ES 2 438 495 T3

gatcaccttc ggccaagggg cactgactgga gattaaacga actgtggctg caccatctgt 1320  
cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgcct 1380  
gctgaataac ttctatccca gagaggcca agtacagtgg aagggtgata acgccctcca 1440  
atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500  
cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 1560  
agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620  
ggaattcgcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg 1680  
tgctttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg 1740  
aagggtgccac tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800  
gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860  
aagacaatag caggcatgct ggggatgctg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 1920  
ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgatta agcgcggcgg 1980  
gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 2040  
tcgctttctt ccttccctt ctgcaccgt tcgcccgtt tccccgcaa gctctaaatc 2100  
ggggcatccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 2160  
attaggtgga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt cgcccttga 2220  
cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 2280  
ctatctcggc ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggttaa 2340  
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400  
aggggtgtgga aagtccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460  
attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520  
gcatgcatct caattagtea gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgcc 2580  
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640  
cagaggccga gccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700  
gaggcctagg cttttgcaaa aagetcccgg gagcttgat atccattttc ggatctgatc 2760  
aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820  
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 2880  
ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgcc ggttcttttt gtcaagaccg 2940  
acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3000  
cgacggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgcac tgaagcggga agggactggc 3060  
tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgcct cctgccgaga 3120

ES 2 438 495 T3

aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3180  
cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 3240  
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300  
ccaggetcaa ggccgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 3360  
gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 3420  
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 3480  
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgccttacgg tatcgccgct cccgattcgc 3540  
agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 3600  
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 3660  
ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 3720  
cggggatctc atgctggagt tcttcgccc ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 3780  
ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3840  
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900  
tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 3960  
cacaattcca cacacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 4020  
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct 4080  
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4140  
gcgctcttcc gcttctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4200  
ggatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagc 4260  
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct 4320  
ggcgtttttc cataggtccc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380  
gagggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440  
cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt tacccgatac ctgtccgctt ttctccctc 4500  
gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 4560  
tcgctccaag ctgggctgtg tgacgaaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc 4620  
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4680  
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 4740  
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc 4800  
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860  
cgggtgtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 4920  
tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat 4980

ES 2 438 495 T3

tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5040  
 ttttaaataca atctaaagta tatatgagta aacttgggtct gacagttacc aatgcttaat 5100  
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcggttca tccatagtgt cctgactccc 5160  
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5220  
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280  
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg 5340  
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 5400  
 tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 5460  
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gctccttcgg 5520  
 tctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc 5580  
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 5640  
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 5700  
 aatacgggat aataccggc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760  
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5820  
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5880  
 aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat 5940  
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000  
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 6060  
 ccgaaaagtg ccaoctgacg tc 6082

<210> 10

<211> 6082

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 10

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgtc gagtagtgcc 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

ES 2 438 495 T3

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggc aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggctgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccacccc ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcy 780  
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 aagcttgat ctccatga gggctcctgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgtt 960  
 ccaggtgcc agatgtgaca tccagatgac ccagctcca tctcactgt ctgcatctgt 1020  
 aggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggc attagccatt atttagcctg 1080  
 gtttcagcag aaaccagga aagcccctaa gtcctgatc tatgetgcat ccagtttga 1140  
 aagtggggtc ccatcaaagt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat 1200  
 cagcagccta cagcctgaag attttgaac ttattactgc caacagtata atagtttccc 1260  
 gctcactttc ggcgagggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt 1320  
 ctccatctc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgcct 1380  
 gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca 1440  
 atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500  
 cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacagaaa cacaaagtct acgcctgoga 1560  
 agtcacccat cagggcctga gctcggccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620  
 ggaattcgcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaac ccgctgatca gcctcgactg 1680  
 tgctttctag ttgccagcca tctgttgtt gccctccc cgtgecttcc ttgacctgg 1740  
 aaggtgccac tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800  
 gtaggtgtca ttctattctg ggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860  
 aagacaatag caggcatgct ggggatgagg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 1920  
 ccagctgggg ctctaggggg tateccccag cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 1980  
 gtgtggtgt tacgagcagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg ccgctcctt 2040  
 tcgctttctt ccttccctt ctgccaagt tcgcccgtt tccccgcaa gctctaaatc 2100  
 gggcatccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg 2160

ES 2 438 495 T3

attaggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga 2220  
 cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 2280  
 ctatctcgt ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggttaa 2340  
 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400  
 aggggtgtga aagtccccag gctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460  
 attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520  
 gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atcccgccc 2580  
 taactccgcc cagttccgcc cattctcgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640  
 cagaggccga ggccgctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700  
 gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgat atccattttc ggatctgatc 2760  
 aagagacagg atgaggatcg tttcgcata ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820  
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 2880  
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgcc ggttcttttt gtcaagaccg 2940  
 acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3000  
 cgacggcgt tecttgcca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 3060  
 tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tctgtctc tcaacttget cctgcgaga 3120  
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3180  
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcacg tactcggatg gaagccggtc 3240  
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300  
 ccaggetcaa ggcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgct 3360  
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggc gcttttctgg atcatcgac tgtggccggc 3420  
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc 3480  
 ttggcggcga atgggctgac cgcttctc tgctttacgg tatcgcgct cccgatcgc 3540  
 agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttctctc agcgggactc tggggttcga 3600  
 aatgaccgac caagcagc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgcgcctt 3660  
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tctccagcg 3720  
 cgggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag cttataatgg 3780  
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3840  
 tagttgtgt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900  
 tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgttctc gtgtgaaatt gttatccgct 3960  
 cacaattcca cacacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 4020

ES 2 438 495 T3

agtgagctaa ctcacattaa ttgCGTtgcg cTcactgccc gctttccagt cgggaaacct 4080  
 gtcgtgccag ctgcattaa gaatCGgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4140  
 gcgctcttcc gcttctctgc tCactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4200  
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4260  
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgCGttgct 4320  
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380  
 gaggtggcga aaccCGacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440  
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc 4500  
 gggaaCGgtg gcgctttctc aatgctcag ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 4560  
 tcgctccaag ctgggctgtg tgcaCGaacc cccCGttcag cccgaccgct gcgccttacc 4620  
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccCGgt aagacacgac ttatCGccac tggcagcagc 4680  
 cactggtaac aggattagca gagcGaggta tgtaggCGgt gctacagagt tcttgaagtg 4740  
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggT atctgcgctc tgctgaagcc 4800  
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860  
 cggTggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 4920  
 tcctttgate tttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttAagggat 4980  
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5040  
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggTct gacagttacc aatgcttaat 5100  
 cagtGaggca cctatctcag cgatctgtct atttCGttca tccatagttg cctgactccc 5160  
 cgTcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5220  
 accCGagagc ccacgctcAc cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280  
 ggccGagcgc agaagtggTc ctgcaacttt atccgcctcc atccagTcta ttaattgTtg 5340  
 ccgggaagct agagtaagta gttCGccagT taatagTttg cgcaacgTtg ttgccattgc 5400  
 tacaggcAtc gtggtgtcAc gctcgtcgtt tggTatggct tCattcagct ccggttccca 5460  
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagCGgtta gctccttcgg 5520  
 tcctccgAtc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgTta tCactcatgg ttatggcagc 5580  
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 5640  
 ctcaaccaag tCattctgag aatagTgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgTc 5700  
 aatacgggat aataccGcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760  
 ttcttcgggg cGaaaactct caaggatctt accgctgTtg agatccagtt cgatgtaacc 5820  
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcAtc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5880

ES 2 438 495 T3

aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa ggaataag ggcacacgga aatggtgaat 5940  
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000  
 cgatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 6060  
 ccgaaaagtg ccacctgacg tc 6082

<210> 11

<211> 6085

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 11

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agccatata 300  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780  
 gtaggegtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcactatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 aagcttgat ctccaccatga gggtecccgc tcagcttctc ttccttctgc tactctggct 960  
 ccagatacc actggaggaa tagtgatgac gcagctcca gccaccctgt ctgtgtctcc 1020  
 aggggaaaga gccaccctct cctgcaggac cagtcagagt attggctgga acttagcctg 1080  
 gtaccaacag aaacctggcc aggtcccg gctcctcacc tatggtgcat cttccaggac 1140  
 cactggtatc ccagccaggt tcagtgccag tgggtctggg acagagttca ctctcaccat 1200

ES 2 438 495 T3

cagcagcctg cagtctgaag attctgcagt ttattactgt cagcattatg ataactggcc 1260  
 catgtgcagt ttggccagg ggaccgagct ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc 1320  
 tgtcttcac tcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcta gcgttggtg 1380  
 cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaagtgg ataacgcct 1440  
 ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag 1500  
 cctcagcage acctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tetacgcctg 1560  
 cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg 1620  
 ttaggaatc gcggccgctc gagtctagag ggcccgttta aaccgcctga tcagcctega 1680  
 ctgtgccttc tagttgccag ccatctggtt tttgcccctc ccccgctgct tccttgaccd 1740  
 tggaaagtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 1800  
 tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggggggca ggacagcaag ggggaggatt 1860  
 ggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgtggggctc tatggcttct gaggcgga 1920  
 gaaccagctg gggctctagg gggtatcccc acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcg 1980  
 cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgccta gcgcccgtc 2040  
 ctttcgctt cttcccttc tttctcgca cgttcgcgg ctttcccgt caagctctaa 2100  
 atcggggcat ccttttagg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaac 2160  
 ttgattagg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttgcctt 2220  
 tgacgttga gtccacgttc ttaaatagt gactctgtt ccaaactgga acaacactca 2280  
 accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggatttt ggggatttcg gcctattggt 2340  
 taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaatta attctgtgga atgtgtgtca 2400  
 gttaggggtg ggaaagtccc caggctcccc aggcaggcag aagtatgcaa agcatgcac 2460  
 tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt cccaggctc cccagcaggc agaagtatgc 2520  
 aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc 2580  
 ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt tttttattt 2640  
 atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtatgga ggagctttt 2700  
 ttggaggcct aggcttttgc aaaaagctcc cgggagcttg tatatccatt ttcggatctg 2760  
 atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcaggtt 2820  
 ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcaaacag acaatcggct 2880  
 gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag cgcagggcg cccggttctt tttgtcaaga 2940  
 ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg 3000  
 ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact 3060

ES 2 438 495 T3

ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg 3120  
 agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct 3180  
 gccattcgca ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg 3240  
 gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgccca gccgaactgt 3300  
 tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgcgc gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg 3360  
 cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcadc gactgtggcc 3420  
 ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccogtgat attgctgaag 3480  
 agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt 3540  
 cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt 3600  
 cgaaatgacc gaccaagcga cgcaccaact gccatcacga gatttcgatt ccaccgcgc 3660  
 ctctatgaa aggttgggct tcggaatcgt ttccgggac gccggctgga tgatcctcca 3720  
 gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccaccccaac ttgtttattg cagcttataa 3780  
 tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa ttccacaaat aaagcatttt ttacttgca 3840  
 ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac 3900  
 ctctagctag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 3960  
 gctcaccaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 4020  
 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 4080  
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 4140  
 tgggcgctct tccgcttccct cgctcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 4200  
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4260  
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 4320  
 gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4380  
 tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 4440  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaaccga tacctgtccg cctttctccc 4500  
 ttccgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 4560  
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 4620  
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 4680  
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 4740  
 gtgggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 4800  
 gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 4860  
 tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 4920

ES 2 438 495 T3

agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 4980  
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5040  
aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 5100  
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact 5160  
ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 5220  
gataccgga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5280  
aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5340  
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttggtgccat 5400  
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc 5460  
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 5520  
cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 5580  
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga 5640  
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcgcgca ccgagttgct cttgcccggc 5700  
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 5760  
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 5820  
accactcgt gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 5880  
agcaaaaaaca ggaaggcaaa atgccgaaa aaaggggaata agggcgacac ggaaatggtg 5940  
aatactcata ctcttctttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 6000  
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 6060  
tccccgaaaa gtgccacctg acgtc 6085

<210> 12

<211> 6097

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 12

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

ES 2 438 495 T3

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
attgaogtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480  
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
atgccagta catgacotta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600  
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc ccattgacg caaatgggog 780  
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaatag ggagacccaa gctggctaga 900  
aagcttggat ctacacatga gggtcctcgc tcagctcctg gggctgctaa tgctctggat 960  
acctggatcc agtgcagata ttgtgatgac ccagactcca ctctctctgt ccgtcacccc 1020  
tggacagccg gcctccatct cctgcaagtc tagtcagagc ctctgcata gtgatggaaa 1080  
gacctttttg tattggtatc tgcagaagcc aggccagcct ccacagctcc tgatctatga 1140  
ggtttccaac cggttctctg gagtgccaga taggttcagt ggcagcgggt cagggacaga 1200  
tttcacactg aaaatcagcc ggggtggaggc tgaggatgtt gggctttatt actgcatgca 1260  
aagtatacag cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt 1320  
ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc 1380  
tagcgttgtg tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg 1440  
ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga 1500  
cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaa gcagactacg agaaacacaa 1560  
agtctacgcc tgcaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa 1620  
caggggagag tgttaggaat tcggggcgc tcgagtctag agggcccgtt taaaccgct 1680  
gatcagcctc gactgtgctt tctagtggcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc 1740  
cttccttgac cctggaagggt gccactccca ctgtccttcc ctaataaaat gaggaaattg 1800  
catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 1860  
agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt 1920  
ctgaggcggg aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgcc tgtagcggcg 1980  
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcggcc 2040  
tagcggcgcg tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc 2100

ES 2 438 495 T3

gtcaagctct aaatcggggc atccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg 2160  
 accccaaaaa acttgattag ggtgatgggt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 2220  
 tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt ttttaaatag tggactcttg ttccaaactg 2280  
 gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttggggattt 2340  
 cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaatt taacgcgaat taattctgtg 2400  
 gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaagtc ccaggctcc ccaggcaggc agaagtatgc 2460  
 aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 2520  
 gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 2580  
 cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 2640  
 ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt 2700  
 gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca 2760  
 ttttcggatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat 2820  
 tgacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac 2880  
 agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc 2940  
 tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc 3000  
 taticgtggt ggccaagcag ggcgttcoct ggcagctgt gctcgactgt gtcactgaag 3060  
 cgggaagggg ctggtgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctctctg tcatctcacc 3120  
 ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gggcggtctg catacgttg 3180  
 atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc 3240  
 ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc 3300  
 cagccgaact gttcgcagc ctcaaggcgc gcatgccga cggcgaggat ctctctctga 3360  
 cccatggcga tgctctctg ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca 3420  
 tcgactgtgg ccggtctggg gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg 3480  
 atattgetga agagcttggc ggcgaaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg 3540  
 ccgctcccga ttgcagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc ttctgagcgg 3600  
 gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac ctgcatcac gagatttca 3660  
 ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaaatc gttttccggg acgcccgtg 3720  
 gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacccca acttgtttat 3780  
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 3840  
 ttttcoactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcacc aatgtatctt atcatgtctg 3900  
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc gtaatcatgg tcatagetgt ttctgtgtg 3960

ES 2 438 495 T3

aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 4020  
 ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt 4080  
 ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaate ggccaacgcg cggggagagg 4140  
 cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcaact gactcgtcgc gctcggtcgt 4200  
 tcggetgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaate 4260  
 aggggataac gcagaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 4320  
 aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 4380  
 tcgacgtca agtcagagg ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 4440  
 ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc 4500  
 cgcctttctc ccttcggga gcgtggcgt ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag 4560  
 ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 4620  
 ccgctgcgcc ttatccggt actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac acgacttate 4680  
 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 4740  
 agagttcttg aagtgtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 4800  
 cgctctgctg aagccagtta ccttcgaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa 4860  
 aaccaccgct ggtagcggg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 4920  
 aggatctcaa gaagatcct tgatctttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 4980  
 ctcacgttaa gggattttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 5040  
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtataat gagtaaactt ggtctgacag 5100  
 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 5160  
 agttgcctga ctcccgtcg ttagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 5220  
 cagtgctgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 5280  
 ccagccagcc ggaaggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 5340  
 gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgccgaa 5400  
 cgttggtgcc attgetacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg ta ggtttcatt 5460  
 cagctccggt tcccaacgat caaggcagat tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc 5520  
 ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 5580  
 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 5640  
 tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 5700  
 ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 5760  
 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 5820

ES 2 438 495 T3

cagttc gatg taacc cactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 5880  
 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac 5940  
 acgaaaatgt tgaatactca tactcttctc ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 6000  
 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 6060  
 tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtc 6097

<210> 13

<211> 6094

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido

<400> 13

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg 120  
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240  
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300  
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360  
 cccgccatt gacgtcaata atgacgatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc 420  
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480  
 atcatatgcc aagtacgcc octattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540  
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600  
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660  
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720  
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggog 780  
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840  
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaatag ggagacccaa gctggctaga 900  
 aagcttgat ctcaccatgg tgttgacagc ccaggtcttc atttctctgt tactctggat 960  
 ctctggtgcc tacggggaca tcgtgatgac ccagctcca gactccctgg ctgtgtctct 1020  
 gggcgagagg gccaccatca actgcaagtc caaccagagt gtcttacaca gctccaacaa 1080  
 taagaactat ttagcttggg accagcagaa accaggacag cctcctaact tgctcattta 1140

ES 2 438 495 T3

ttgggcattc ctccgggaat ccgggggtccc tgaccgcttc agtggcagcg ggtctgggac 1200  
 agatttcaact ctccacatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca 1260  
 ccaatattat totactttat ataactttcg cgaggggacc aaggtagaga tcaaacgaac 1320  
 ygtggctgca ccactgtct tcatcttccc gccatctgat gacgagttga aatctggaac 1380  
 tgctagecgt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa 1440  
 ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa 1500  
 ggacagcacc tacagcctca gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca 1560  
 caaagtctac gcctgcgaag tcaacctca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt 1620  
 caacagggga gagtgtagg cggccgctcg agtctagagg gcccgttta acccgtgat 1680  
 cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt 1740  
 ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcttttcta ataaaatgag gaaattgcat 1800  
 cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag gacagcaagg 1860  
 gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg 1920  
 aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca cgcgccctgt agcggcgcat 1980  
 taagcgcggc ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgcctag 2040  
 cgcgccctcc tttegettcc ttcccttctt ttctcgccac gttcgccggc ttccccgctc 2100  
 aagctctaaa tcggggcctc cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc 2160  
 ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggccc atcgccctga tagacggttt 2220  
 ttgcgccctt gacgttgag tccacgttct ttaatagtgg actcttgctc caaactggaa 2280  
 caaactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata agggattttg gggatttcgg 2340  
 cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaattaa ttctgtggaa 2400  
 tgtgtgtcag ttaggggtgt gaaagtcccc aggctcccca ggcaggcaga agtatgcaaa 2460  
 gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca 2520  
 gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaacct agtcccggcc ctaactccgc 2580  
 ccactccgcc cctaactccg cccagttccg cccattctcc gccccatggc tgactaattt 2640  
 tttttattta tgcagaggcc gaggcgcct ctgcctctga gctattccag aagtagtgag 2700  
 gaggttttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctccc gggagcttgt atatccattt 2760  
 tcggatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcct gattgaacaa gatggattgc 2820  
 acgcaggctc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 2880  
 caatcgctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcc ccggttcttt 2940  
 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 3000

ES 2 438 495 T3

cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 3060  
 gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 3120  
 ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 3180  
 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 3240  
 tggaagccgg tcttgctgat caggatgata tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccag 3300  
 ccgaactggt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccgaagg cgaggatctc gtcgtgacct 3360  
 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 3420  
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggtc acccgtgata 3480  
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgccg 3540  
 ctcccgatcc gcagcgcata gccttctata gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac 3600  
 tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag atttcgatcc 3660  
 caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat 3720  
 gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc 3780  
 agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt 3840  
 ttcaactgat tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctgtat 3900  
 accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 3960  
 ttgttatccg ctcaaatcc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 4020  
 gggtgccata tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 4080  
 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 4140  
 tttgcgtatt gggcgcctct ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg 4200  
 gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 4260  
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 4320  
 ggccgcgctg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcacc acaaaaatcg 4380  
 acgctcaagt cagaggtggc gaaaccggac aggactataa agataccagg cgtttcccc 4440  
 tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgcg ottaccggat acctgtccgc 4500  
 cttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc 4560  
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg 4620  
 ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaacctg gtaagacacg acttatcgcc 4680  
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 4740  
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 4800  
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 4860

ES 2 438 495 T3

caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg 4920  
atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc 4980  
acgttaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa 5040  
ttaaaaatga agtttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta 5100  
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 5160  
tgctgactc cccgctggtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 5220  
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggtcca gatttatcag caataaacca 5280  
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgctt ccatccagtc 5340  
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 5400  
tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg ttggtatgg cttcattcag 5460  
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggg 5520  
tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 5580  
ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgcatgccca tccgtaagat gcttttctgt 5640  
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 5700  
ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 5760  
cattgaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 5820  
ttgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 5880  
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 5940  
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6000  
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 6060  
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 6094

<210> 14

<211> 481

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

<400> 14

ggatctcacc atggagttgg gactgagctg gggcttctc gttgctcttt taagaggtgt 60  
ccagtgtcag gtgcaattgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct 120

10

ES 2 438 495 T3

gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcgc cttcagtaga tatggcatgc actgggtccg 180  
 ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggatgatg gaagtaataa 240  
 atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac 300  
 gcagtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag 360  
 aggcggtgac ttctctact actactatta cggtatggac gtctggggcc aaggaccac 420  
 ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctag 480  
 c 481

<210> 15

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Leu | Gly | Leu | Arg | Trp | Gly | Phe | Leu | Val | Ala | Leu | Leu | Arg | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Val | Gln | Cys | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Val | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Pro | Gly | Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Ala | Phe |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Arg | Tyr | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Trp | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn | Lys | Tyr | Tyr | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Gln | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Gly | Asp | Phe | Leu | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Met | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |

<210> 16

<211 >463

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bgl1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

ES 2 438 495 T3

<400> 16

```

ggatctcacc atgaggggtcc ctgctcagct cctgggactc ctgctgctct ggctcccaga      60
taccagatgt gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga      120
cagagtcacc atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca      180
gcagaaaaca gggaaagttc ctaagttcct gatctatgaa gcatccactt tgcaatcagg      240
ggtcccactc cggttcagtg gcggtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag      300
cctgcagcct gaagatggtg caacttatta ctgtcaaaat tataacagtg cccattcac      360
tttcggccct gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccct ctgtcttcat      420
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct agc                          463
    
```

<210> 17

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

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

<210> 18

10 <211 >508

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

ES 2 438 495 T3

<400> 18

```

ggatctcacc atgggggtcaa cgcctatcct caccatggag ttggggctgc gctgggttct      60
cctcgttgct cttttaagag gtgtccagtg tcaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg      120
cgtggtccag cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca gcgtctggat tcaccttcag      180
taactatgtc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag gggctggagt ggggtggcaat      240
tatatggtat gatggaagta ataaatacta tgcagactcc gtgaagggcc gattcaccat      300
ctccagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga      360
cacggctgtg tattactgtg cgggtggata taactggaac tacgagtacc actactacgg      420
tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc      480
atcggttctc ccctggcac cctctagc                                          508
    
```

<210> 19

<211> 143

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

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

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130             135             140
    
```

<210> 20

10

<211 >463

<212> ADN

ES 2 438 495 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bgl1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

5 <400> 20

```

ggatctcacc atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct gtttcccagg      60
tgccagatgt gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga      120
cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggcattacc aattatitag cctggtttca      180
gcagaaacca gggaaagccc ctaagtccct tatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg      240
ggtcccatca aagttcagcg gcagtggttc tgggacagat ttcagtctca ccatcagcag      300
cctgcagcct gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgatcac      360
cttcggccaa gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat      420
cttcccgcga tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct agc                          463
    
```

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

<210> 22

<211 >490

15 <212> ADN

# ES 2 438 495 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bgl I, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

5 <400> 22

```
ggatctcacc atggagttgg gacttagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt      60
ccagtgtcag gtccagctgg tggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggtccct    120
gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg     180
ccaggctcca ggcaaggggc tggactgggt ggcaattatt tggcatgatg gaagtaataa     240
atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaagac     300
gctgtacctg caaatgaaca gtttgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag     360
agcttgggcc tatgactacg gtgactatga atactacttc ggtatggacg tctggggcca     420
agggaccacg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc     480
accctctagc                                     490
```

<210> 23

<211 > 145

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 438 495 T3

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Asp Trp Val Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Trp Ala Tyr Asp Tyr Gly Asp Tyr Glu Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 130 135 140  
 Ser  
 145

<210> 24

<211 >463

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

<400> 24

ggatctcacc atgaggggtcc ctgctcagct cctgggggctc ctgctgctct gtttcccagg 60  
 tgccagatgt gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga 120  
 cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggcattagc cattatttag cctggtttca 180  
 gcagaaacca gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg 240  
 ggtcccatca aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag 300  
 cctacagcct gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt tcccgtcac 360  
 tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat 420  
 cttcccgccca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgct agc 463

10

<210> 25

ES 2 438 495 T3

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

```

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Pro
1           5           10           15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20           25           30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35           40           45

Ile Ser His Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50           55           60

Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65           70           75           80

Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85           90           95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
100          105          110

Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115          120          125
    
```

5

<210> 26

<211 >469

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

<400> 26

```

ggatcccacc atgggggtcaa ccgtcatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt      60
ctgtgccgag gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccc gggagtctct      120
gaagatctcc tgtaagggtt ctggatacag ctttaccagt tactggatcg gctgggtgcg      180
ccagatgccc gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tatcctggtg actctgatac      240
cagatacagc ccgtccttec aaggccaggc caccatctca gccgacaagt ccatcagcac      300
cgcctacctg cagtggagca gcctgaaggc ctgggacacc gccatgtatt actgtgcgag      360
acggatggca gcagctggcc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc      420
ctcagcctcc accaagggcc catcgggtctt cccctggca ccctctagc      469
    
```

ES 2 438 495 T3

<210> 27

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 27

```

Met Gly Ser Thr Val Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1          5          10          15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
          50          55          60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65          70          75          80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
          85          90          95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Met Ala Ala Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp
          115          120          125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          130          135

```

<210> 28

<211 >466

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

<400> 28

ES 2 438 495 T3

ggatctcacc atgagggtcc ccgctcagct tctcttcctt ctgctactct ggctcccaga 60  
 taccactgga ggaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga 120  
 aagagccacc ctctcctgca ggaccagtca gagtattggc tggaacttag cctggtacca 180  
 acagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatcttcca ggaccactgg 240  
 tatcccagcc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag 300  
 cctgcagtct gaagattctg cagtttatta ctgtcagcat tatgataact ggcccatgtg 360  
 cagttttggc caggggaccg agctggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt 420  
 catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gctagc 466

<210> 29

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30

<211 >487

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

15 <400> 30

ES 2 438 495 T3

ggatctcacc atggagtttg ggctgtgctg gattttcctc gttgctcttt taagaggtgt 60  
 ccagtgtcag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct 120  
 gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cttcattagc tatggcatgc actgggtccg 180  
 ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgatg gaagtaataa 240  
 atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac 300  
 gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag 360  
 agtattagtg ggagctttat attattataa ctactacggg atggacgtct ggggccaagg 420  
 gaccacggtc accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc 480  
 ctctagc 487

<210> 31

<211> 144

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 31

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Glu | Phe | Gly | Leu | Cys | Trp | Ile | Phe | Leu | Val | Ala | Leu | Leu | Arg | Gly | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Val | Gln | Cys | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Val | Val | Gln | 20  | 25  | 30  |    |
| Pro | Gly | Arg | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | 35  | 40  | 45  |    |
| Ile | Ser | Tyr | Gly | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | 50  | 55  | 60  |    |
| Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Ser | Tyr | Asp | Gly | Ser | Asn | Lys | Tyr | Tyr | Ala | 65  | 70  | 75  | 80 |
| Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | 85  | 90  | 95  |    |
| Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | 100 | 105 | 110 |    |
| Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Val | Leu | Val | Gly | Ala | Leu | Tyr | Tyr | Tyr | Asn | Tyr | 115 | 120 | 125 |    |
| Tyr | Gly | Met | Asp | Val | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | 130 | 135 | 140 |    |

<210> 32

<211> 478

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 438 495 T3

<220>

<223> Incluye unión de clonación BamHI/Bg1 II, péptido señal, región V, porción de la región C, y unión de clonación 3'XbaI/NheI (pesada) o NheI (ligera)

<400> 32

```

ggatctcacc atgagggtcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg      60
atccagtgca gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca      120
gccggcctcc atctctgca agtctagtc gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt      180
tttgattgg tatctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaggtttc      240
caaccggttc tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcagga cagattcac      300
actgaaaatc agccgggtgg aggetgagga tgttgggctt tattactgca tgcaaagtat      360
acagottccg ctcactttcg gcggaggac caaggtggag atcaaacgaa ctgtggetgc      420
accatctgtc ttcactttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctagc      478

```

5

<210> 33

<211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 33

```

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

```

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, que comprende:

5 poner en contacto las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, con un conjugado de anticuerpo-fármaco en una cantidad eficaz para exterminar las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) conjugado con monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y en el que la secuencia de PSMA es la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1.

10 2. Un conjugado de anticuerpo-fármaco para tratar un sujeto que tiene un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco comprende un anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) conjugado con monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y en el que la secuencia de PSMA es la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1.

15 3. Un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 2, en el que la supervivencia en el sujeto aumenta en comparación con el tiempo medio de supervivencia de sujetos con cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, no tratado con ADC de PSMA, preferiblemente en el que la supervivencia en el sujeto aumenta en:

- a) cuatro semanas;
- 20 b) seis semanas;
- c) dos meses;
- d) cuatro meses;
- e) seis meses;
- f) ocho meses;
- 25 g) diez meses;
- h) doce meses; y/o
- i) catorce meses.

4. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, son:

- 30 a) resistentes a docetaxel o paclitaxel;
- b) células de cáncer de próstata o células de cáncer no de próstata, preferiblemente en el que las células de cáncer no de próstata son células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer hepático, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma;
- 35 c) de un tumor; y/o
- d) de una metástasis.

5. Un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano, es:

- 40 a) resistente a docetaxel o paclitaxel;
- b) cáncer de próstata o cáncer no de próstata, preferiblemente en el que el cáncer no de próstata es cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma;
- c) un tumor; y/o
- 45 d) metastásico.

6. Un método como se reivindica en la reivindicación 4 o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 5, en el que el volumen tumoral es al menos:

- 5
- a) 100 mm<sup>3</sup>;
  - b) 200 mm<sup>3</sup>;
  - c) 300 mm<sup>3</sup>;
  - d) 400 mm<sup>3</sup>;
  - e) 500 mm<sup>3</sup>;
  - f) 600 mm<sup>3</sup>;
  - g) 700 mm<sup>3</sup>;
  - 10 h) 800 mm<sup>3</sup>;
  - i) 900 mm<sup>3</sup>;
  - j) 1000 mm<sup>3</sup>;
  - k) 1200 mm<sup>3</sup>;
  - l) 1400 mm<sup>3</sup>; y/o
  - 15 m) 1600 mm<sup>3</sup>.

7. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el volumen tumoral se reduce en al menos:

- 20
- a) 10%;
  - b) 20%;
  - c) 30%;
  - d) 40%;
  - e) 50%;
  - f) 60%;
  - g) 70%;
  - 25 h) 80%;
  - i) 90%; y/o
  - j) 95%.

30 8. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se conjuga a al menos 2 ó 3 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina, y preferiblemente a al menos 4 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina.

9. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina se conjuga al anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno con un compuesto de la fórmula:



en el que:

A es una unidad de acilo carboxílico;

Y es un aminoácido;

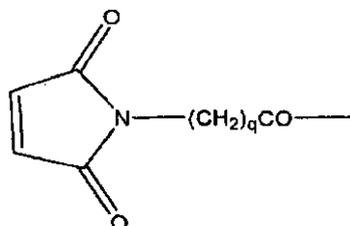
Z es un aminoácido;

40 X y W son, cada uno, un espaciador autoinmolativo;

n es un número entero de 0 ó 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6,  
y preferiblemente en el que:

a) A es

i)



5

en la que q es 1-10; o

ii) 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo, m-succinimidobenzoílo, 4-(p-succinimidofenil)-butirilo, 4-(2-acetamido)benzoílo, 3-tiopropionilo, 4-(1-tioetil)-benzoílo, 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoílo o maleimida caproílo;

10

b) Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina; y/o

c) Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con grupos tosilo o nitro, histidina, o nitina, o nitina protegida con acetilo o formilo, o citrulina.

10. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 9, en el que:

a)  $Y_m-Z_m$  es:

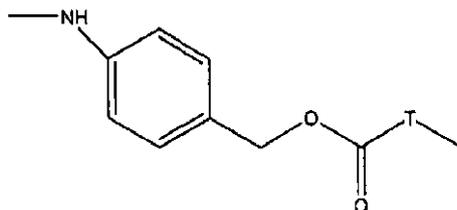
15

i) valina-citrulina; y/o

ii) una secuencia proteínica que es escindible selectivamente por una proteasa; y/o

b) X es:

i) un compuesto que tiene la fórmula:



20

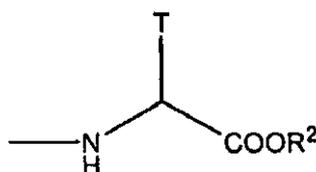
en la que T es O, N, o S,

ii) un compuesto que tiene la fórmula:



en la que  $R^1$  es alquilo de  $C_1-C_5$ , T es O, N o S;

iii) un compuesto que tiene la fórmula:



25

en la que T es O, N, o S, R<sup>2</sup> es H o alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

iv) p-aminobencilcarbamoiloxi;

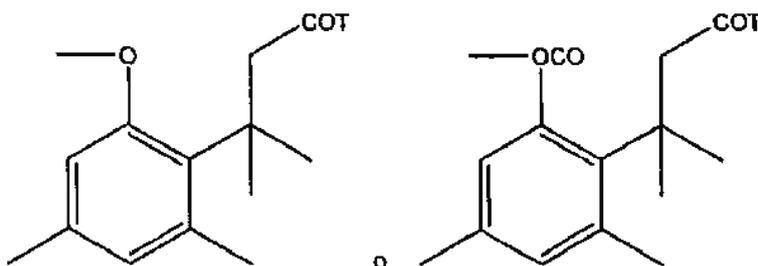
v) alcohol p-aminobencílico;

vi) carbamato de p-aminobencilo;

5 vii) p-aminobenciloxycarbonilo; o

viii) ácido  $\gamma$ -aminobutírico; ácido  $\alpha,\alpha$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico o ácido  $\beta,\beta$ -dimetil  $\gamma$ -aminobutírico.

11. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 9, en el que W es



en la que T es O, S o N.

10 12. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que m y n son 0.

13. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 9, en el que el conjugado de anticuerpo-fármaco es:

15 a) AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefedrina;

b) AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo carbamato de-monometilauristatin norefedrina;

c) AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina;

20 d) AB-PG1-XG1-006-maleimida carbamato de caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin fenilalanina;

e) AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-monometilauristatin fenilalanina;

f) AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefedrina;

25 g) AB-PG1-XG1-026-maleimida carbamato de caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin norefedrina;

h) AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina;

30 i) AB-PG1-XG1-026-maleimida carbamato de caproil-valina-citrulina-p-aminobencilo-monometilauristatin fenilalanina; o

j) AB-PG1-XG1-026-maleimida caproil-monometilauristatin fenilalanina.

14. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno:

a) se une específicamente a un dominio extracelular de PSMA;

35 b) se une específicamente a un epítipo conformacional de PSMA;

- c) se une a células vivas;
- d) no requiere la lisis celular para unirse a PSMA; y/o
- e) se une a células de la neovasculatura de un tumor.

15. Un método o conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno:

l) inhiben competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA, en el que el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden:

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y

d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32,

preferiblemente en el que el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden:

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y

d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20,

y más preferiblemente en el que el segundo anticuerpo comprende:

i)

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 14, y

d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuestas como SEC ID NO: 16; y/o

ii)

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 3, y

5

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 9, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuestas como SEC ID NO: 18, y

10

(d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuestas como SEC ID NO: 20; y/o

II) se une a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1, Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden:

15

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2-7, y

20

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8-13, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y

25

(d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32.

30

16. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos 90% idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden:

35

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o

40

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y

45

(d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20,

preferiblemente en el que el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que es al menos:

i) 95%;

ii) 97%;

50

iii) 98%; y/o

iv) 99% idéntica.

17. Un método o un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno:

I) es AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 o su fragmento de unión a antígeno; y/o

5 II) se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos que comprenden:

a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 2 y 3, y

10 b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 8 y 9, o

c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 14 y 18, y

15 d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en secuencias nucleotídicas expuestas como SEC ID NOs: 16 y 20, y

sus fragmentos de unión a antígeno,

preferiblemente en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno comprende:

20 i)

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y

25 (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 14, y

30 (d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 16, y

sus fragmentos de unión a antígeno; y/o

ii)

35 (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 3, y

40 (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 9, o

(c) una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 18, y

45 (d) una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de la secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 20, y

sus fragmentos de unión a antígeno.

18. Un conjugado de fármaco-anticuerpo de antígeno de membrana específico de próstata (ADC de PSMA) para tratar un sujeto que tiene un cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano, en el que el ADC de PSMA consiste esencialmente en un anticuerpo monoclonal humano contra PSMA conjugado a monometilaurastatin norefedrina (MMAE) vía un ligador de valina-citrulina, y está en una cantidad suficiente para 1) retrasar o inhibir la progresión del cáncer, 2) incrementar la supervivencia del sujeto en comparación con la supervivencia media de sujetos no tratados con el ADC de PSMA y que tienen cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano, 3) disminuir un nivel circulante de células tumorales circulantes (CTCs) en comparación con un nivel de línea base, o 4) disminuir o estabilizar un nivel sérico de PSA en comparación con un nivel de línea base de PSA.

19. Un ADC de PSMA como se reivindica en la reivindicación 18, en el que:

i) el taxano es docetaxel;

ii) el anticuerpo humano es una IgG1 que comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificantes de una secuencia nucleotídica expuesta como SEC ID NO: 8;

iii) el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se demuestra mediante cambios en la imagen radiográfica en la carga tumoral en comparación con una imagen radiográfica inicial en el sujeto antes de la administración del ADC de PSMA, preferiblemente en el que el cambio en la imagen radiográfica es un cambio de al menos:

a) 10%;

b) 20%;

c) 30%;

d) 40%;

e) 50%; y/o

f) 60%; y/o

iv) el retraso o inhibición de la progresión del cáncer se demuestra mediante un cambio en al menos un biomarcador para metástasis ósea y metabolismo óseo en comparación con un valor de línea base antes de la administración del ADC de PSMA, preferiblemente en el que el biomarcador es N-telopéptido, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina, calcitonina, calcio, piridinolina o desoxipiridinolina.

20. Un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo, o su fragmento de unión a antígeno, que se une específicamente a PSMA, conjugado a un derivado de dolastatina 10, para uso en un método para tratar un cáncer que expresa PSMA, resistente a taxano.

21. Un conjugado de anticuerpo-fármaco como se reivindica en la reivindicación 20, en el que:

a) el método implica exterminar células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, en el que, preferiblemente, las células cancerosas que expresan PSMA, resistentes a taxano, se exterminan mediante el conjugado;

b) el PSMA tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 1;

c) el cáncer es cáncer de próstata metastásico progresivo, resistente a la castración, que ha progresado tras una terapia previa con taxano;

d) el derivado de dolastatina 10 es una auristatina; y/o

e) la dolastatina es MMAE (monometilauristatina E o monometilauristatin norefedrina) o MMAF (monometilauristatina F o monometilauristatin fenilalanina).

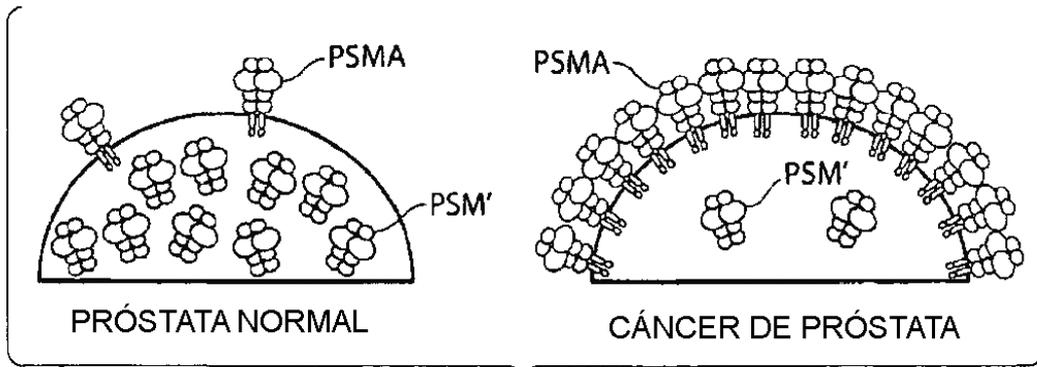


Fig. 1

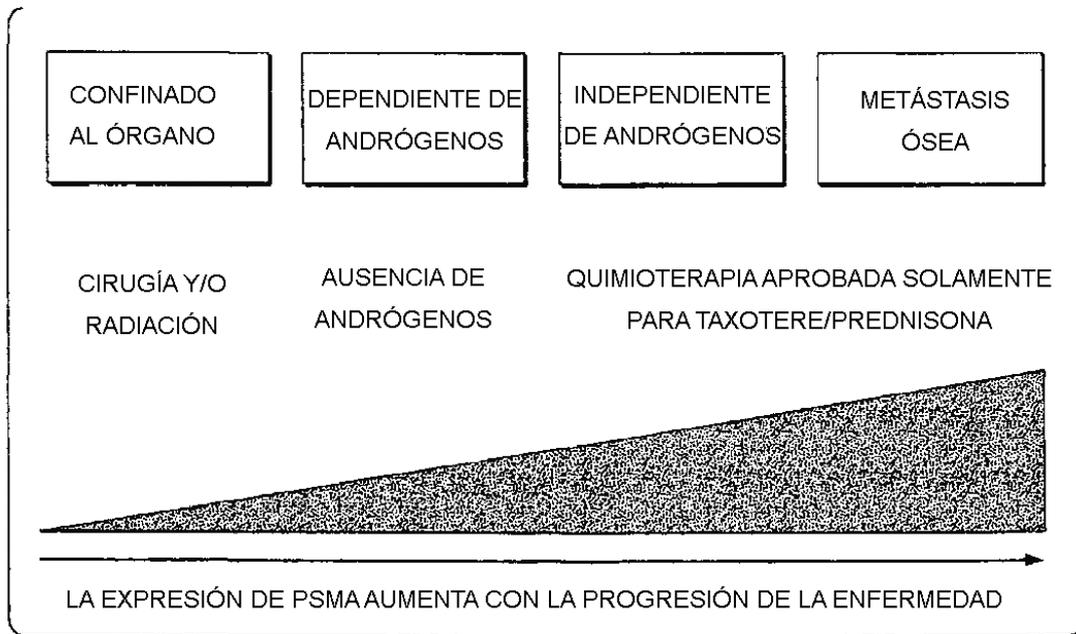


Fig. 2

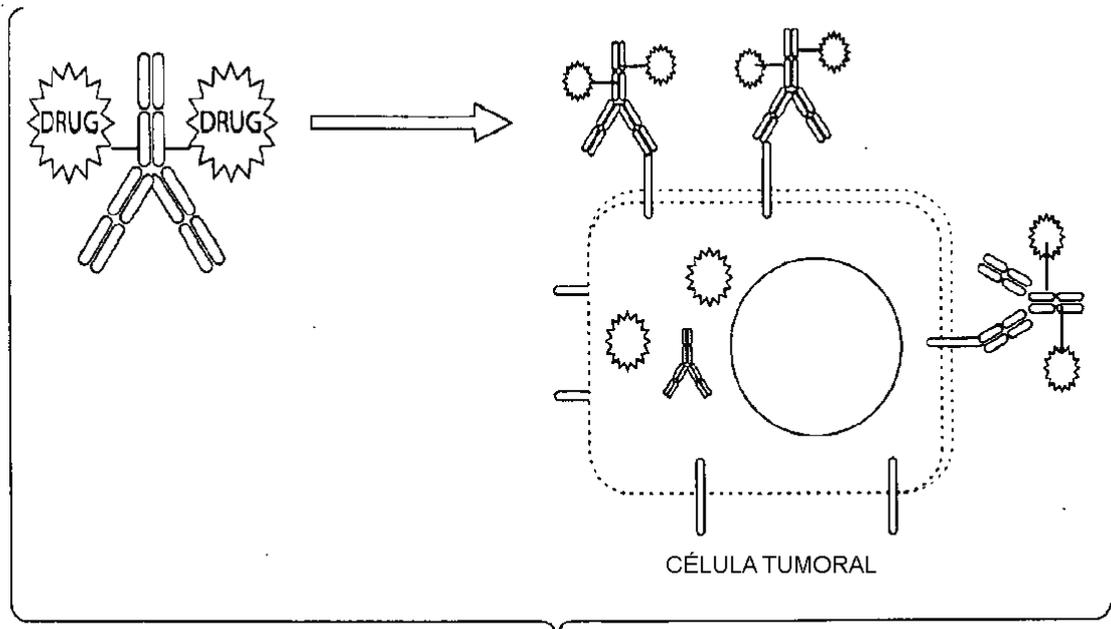


Fig. 3

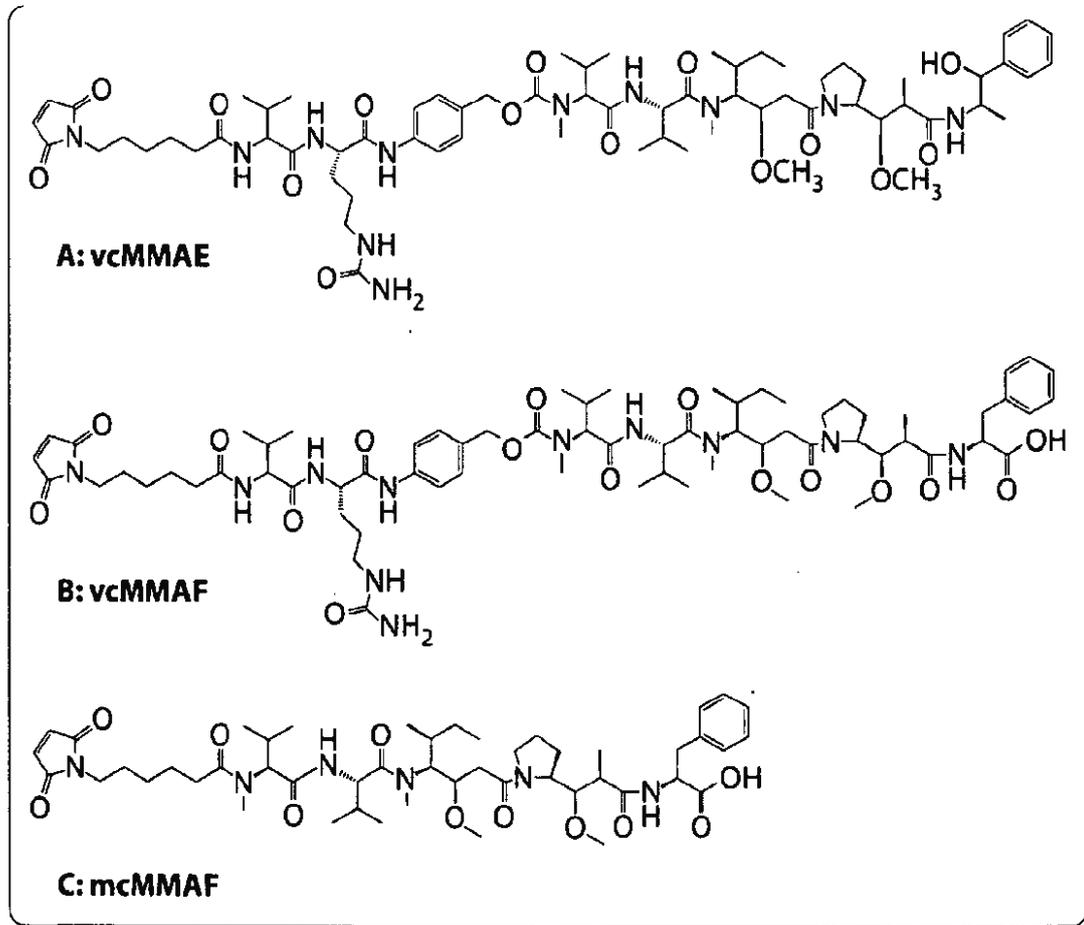


Fig. 4

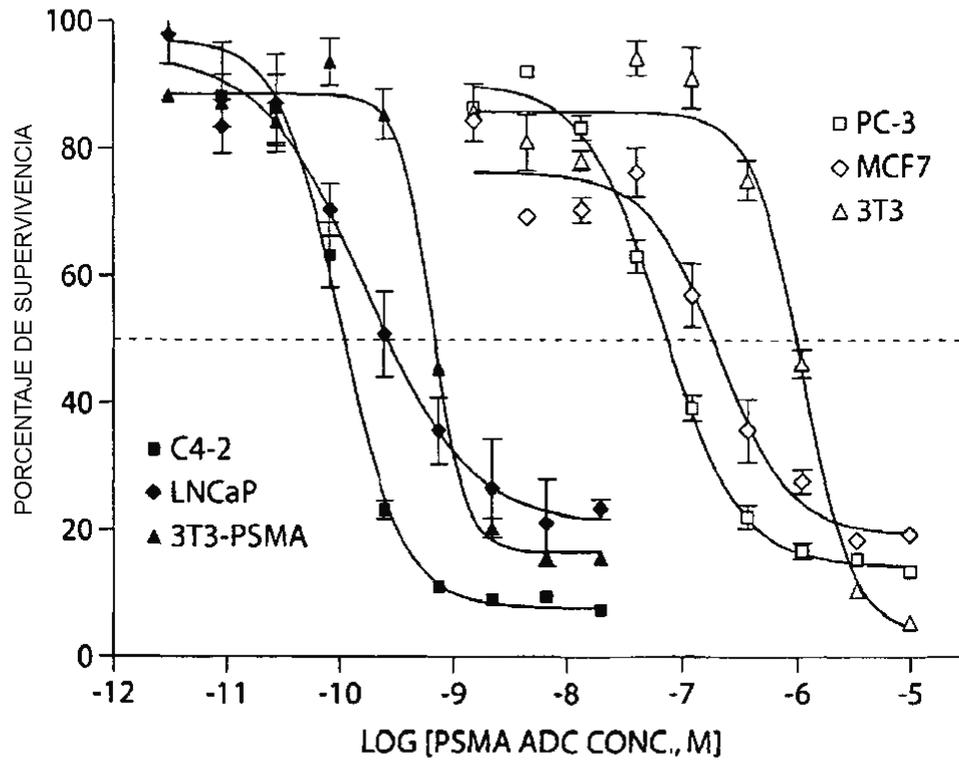


Fig. 5

| ESTIRPES CELULARES            | MFI <sup>1</sup>    | IC <sub>50</sub> (nM) | POTENCIA (nM) <sup>2</sup> | SELECTIVIDAD <sup>3</sup> |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>POSITIVA A PSMA</b>        |                     |                       |                            |                           |
| C4-2 (PRÓSTATA)               | 88 ± 50 (n = 2)     | 0,10 ± 0,01 (n = 3)   | 0,26 ± 0,20                | 1,131                     |
| LNCaP (PRÓSTATA)              | 140 (n= 1)          | 0,20 ± 0,07 (n = 3)   |                            |                           |
| 3T3-PSMA (FIBROBLASTO)        | 314 ± 53 (n = 2)    | 0,49 ± 0,20 (n = 3)   |                            |                           |
| <b>NEGATIVA A PSMA</b>        |                     |                       |                            |                           |
| RAMOS (LINFOCITO B)           | 10,6 ± 10,4 (n = 2) | 46 ± 13 (n = 2)       | 299 ± 355                  | 1,131                     |
| IMR-90 (FIBROBLASTO PULMONAR) | 1,9 ± 0,6 (n = 2)   | 62 ± 55 (n = 3)       |                            |                           |
| PC-3 (PRÓSTATA)               | 6,6 ± 6,1 (n = 2)   | 74 ± 10 (n = 3)       |                            |                           |
| Hep 3B (HÍGADO)               | 5,5 (n = 1)         | 113 ± 87 (n = 3)      |                            |                           |
| HeLa (CUELLO UTERINO)         | 3,3 ± 1,2 (n = 2)   | 173 ± 61 (n = 3)      |                            |                           |
| MCF7 (MAMA)                   | 2,2 (n = 1)         | 192 ± 87 (n = 3)      |                            |                           |
| 3T3 (FIBROBLASTO)             | 10,2 ± 8,7 (n = 2)  | 822 ± 151 (n = 3)     |                            |                           |
| Caco-2 (COLON)                | 8,4 ± 2,5 (n = 2)   | 912 (n = 1)           |                            |                           |

<sup>1</sup> INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA DE LA TINCIÓN DE PSMA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

<sup>2</sup> MEDIA DE IC<sub>50</sub>S (CONCENTRACIÓN REQUERIDA PARA EXTERMINAR EL 50% DE LAS CÉLULAS) DE TODAS LAS ESTIRPES CELULARES POSITIVAS A PSMA O NEGATIVAS A PSMA

<sup>3</sup> LAS SELECTIVIDAD ES IGUAL A LA RELACIÓN DE POTENCIAS DETERMINADA PARA LAS ESTIRPES CELULARES NEGATIVAS A PSMA O POSITIVAS A PSMA

Fig.6

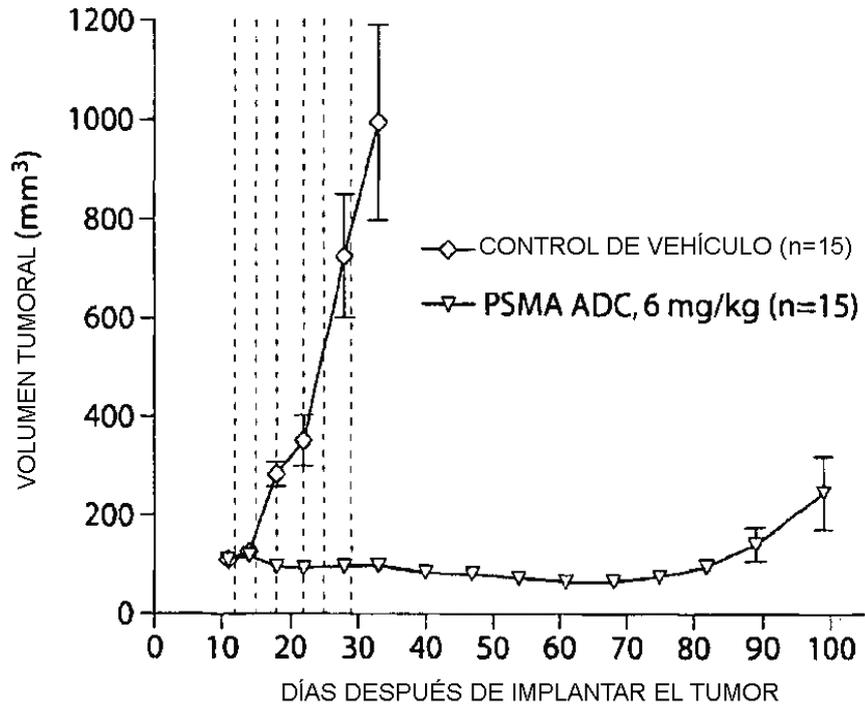


Fig. 7

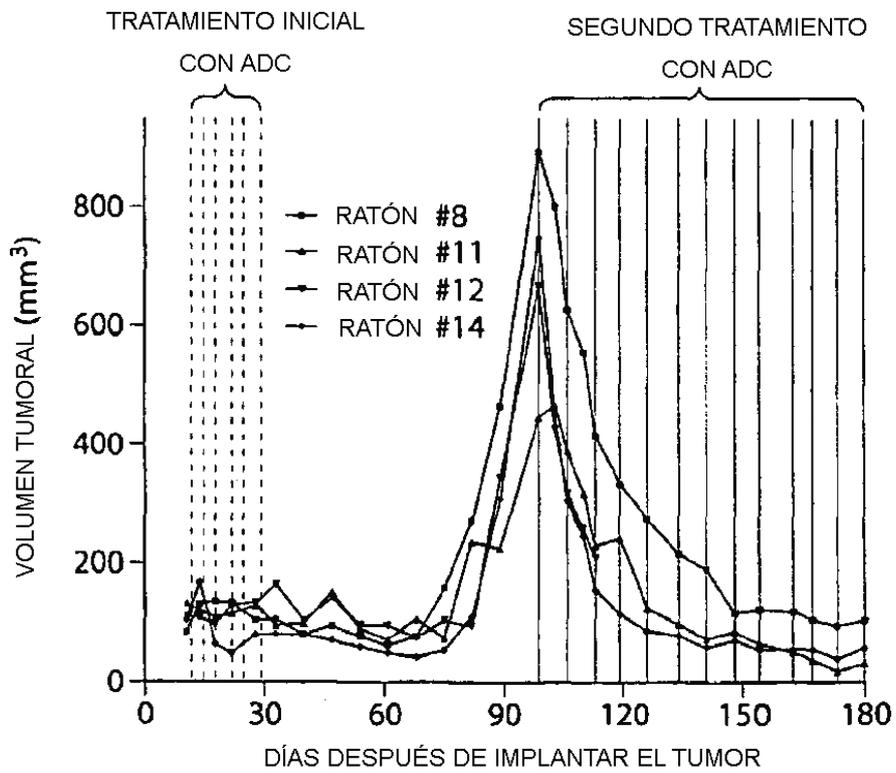


Fig. 8

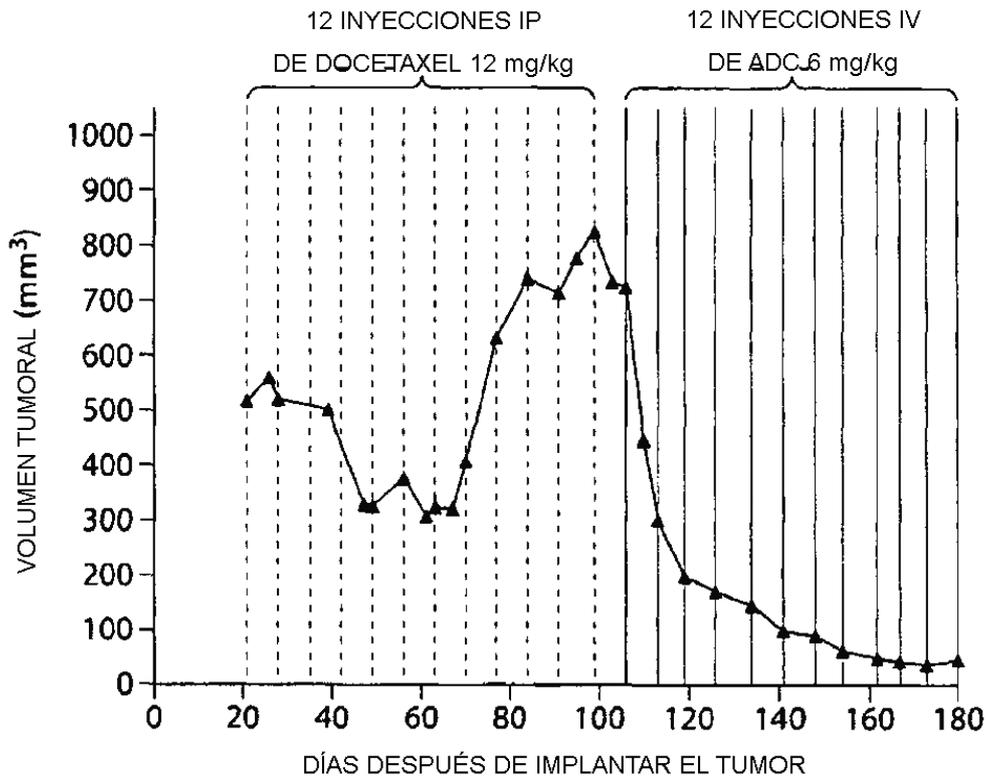


Fig. 9

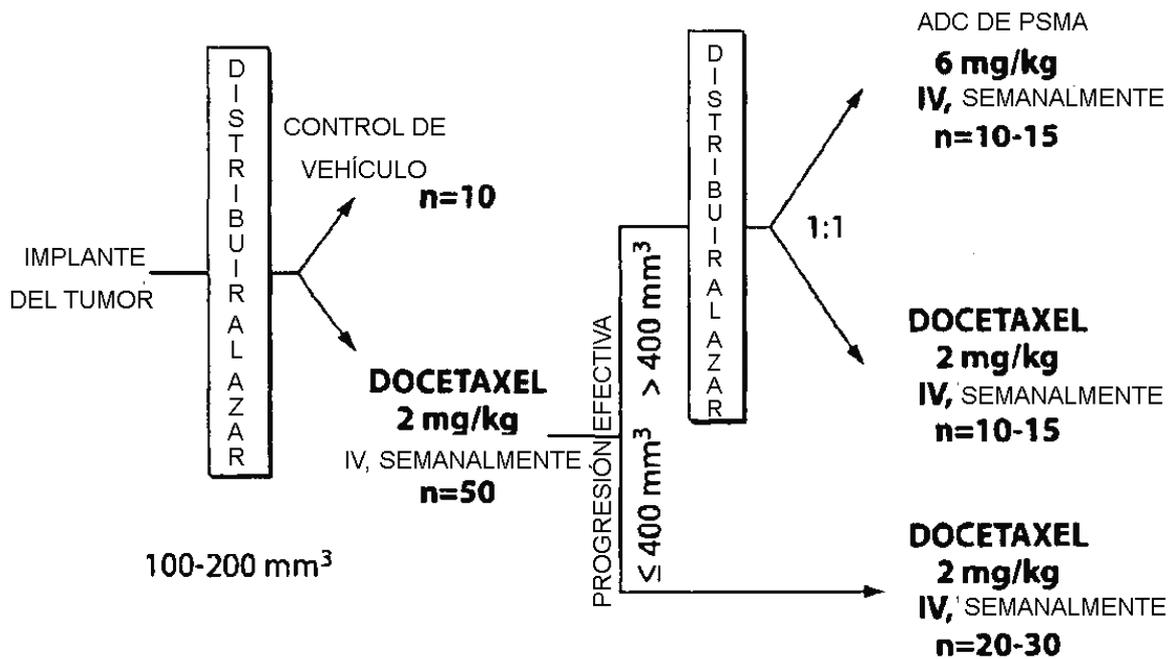


Fig. 10

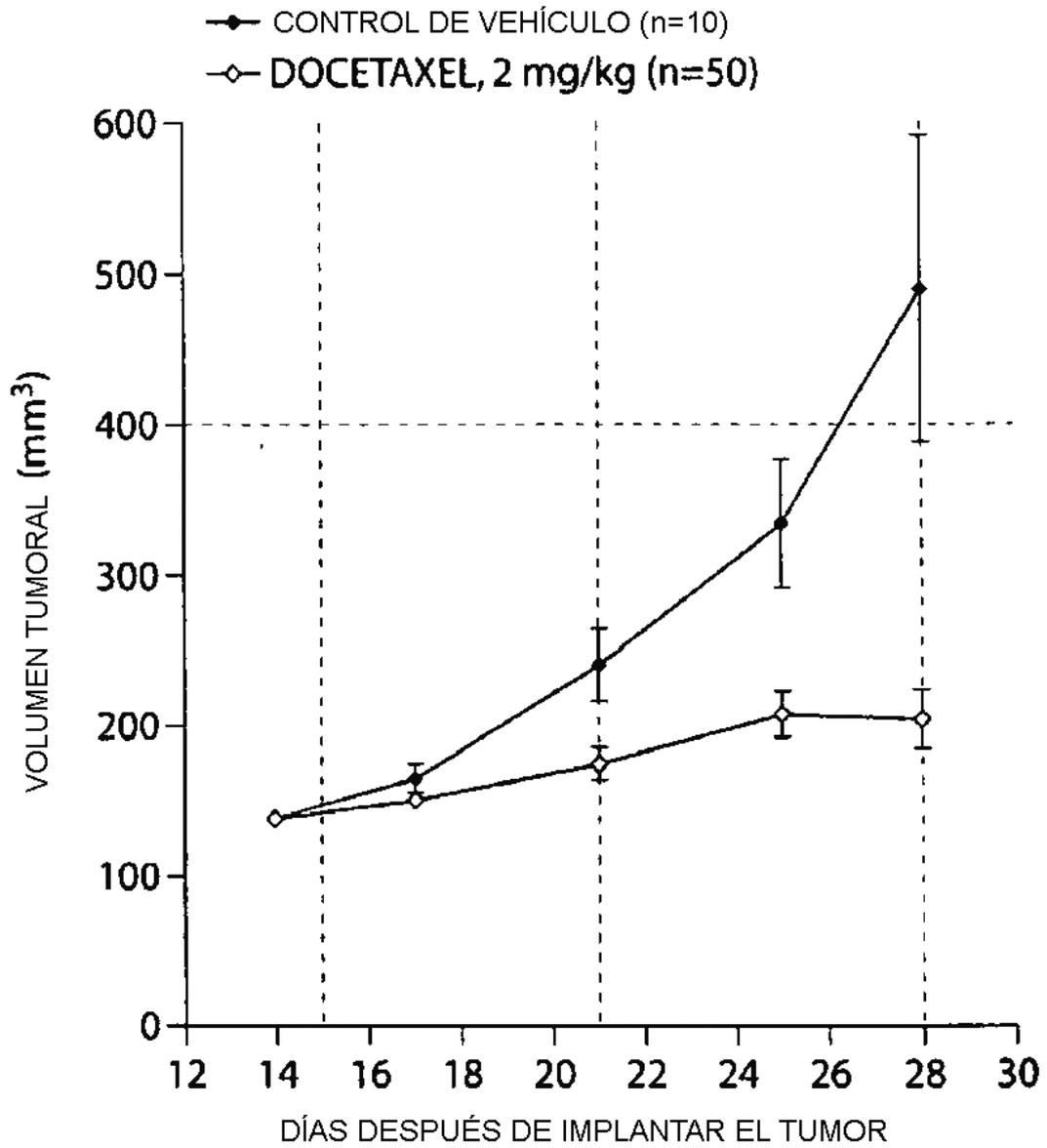


Fig. 11

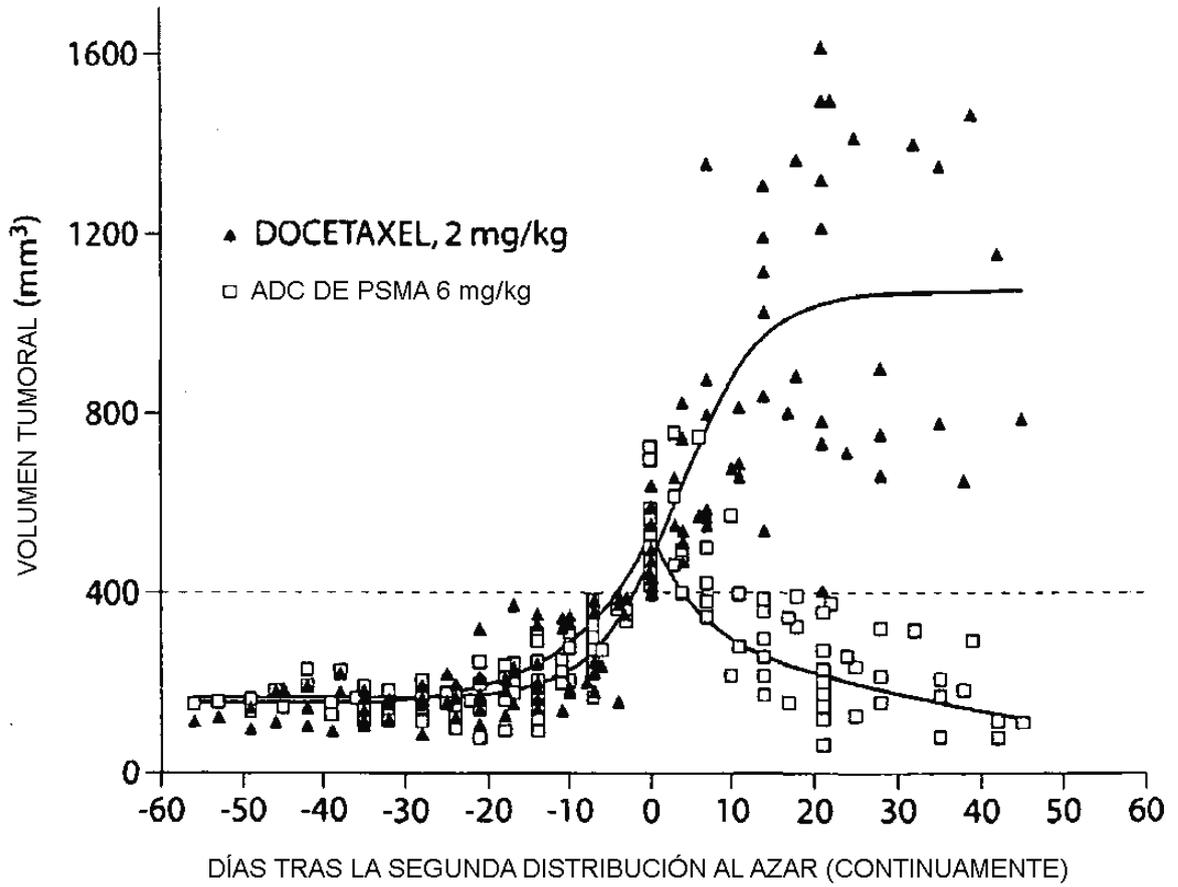


Fig. 12

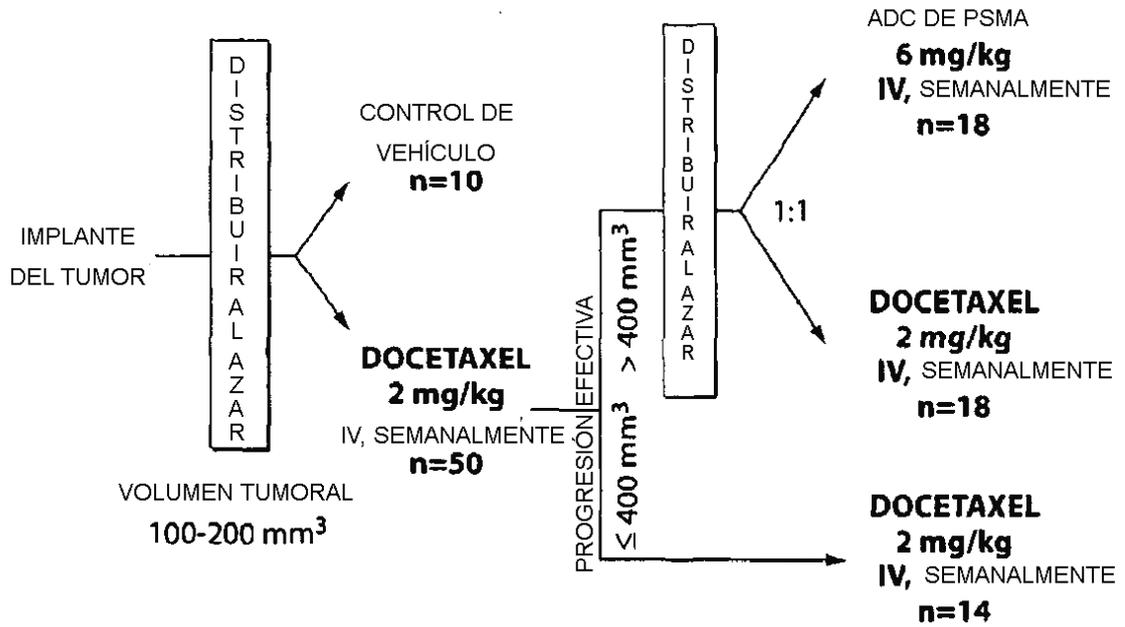


Fig. 13

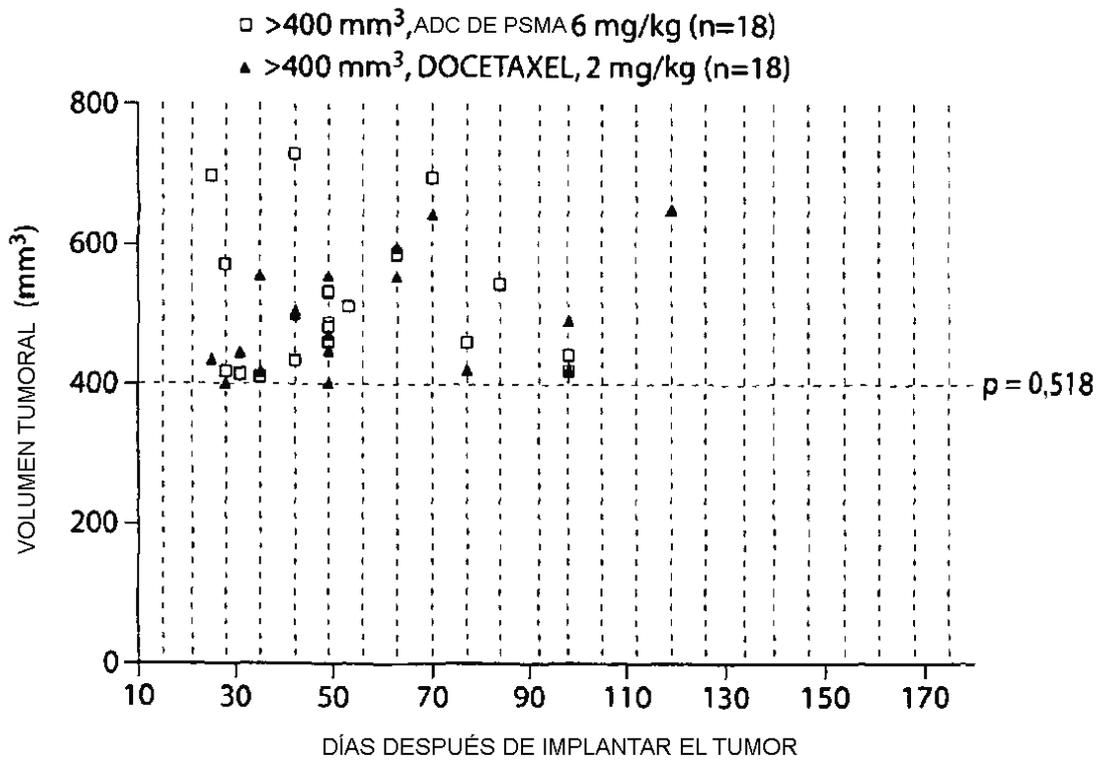


Fig. 14

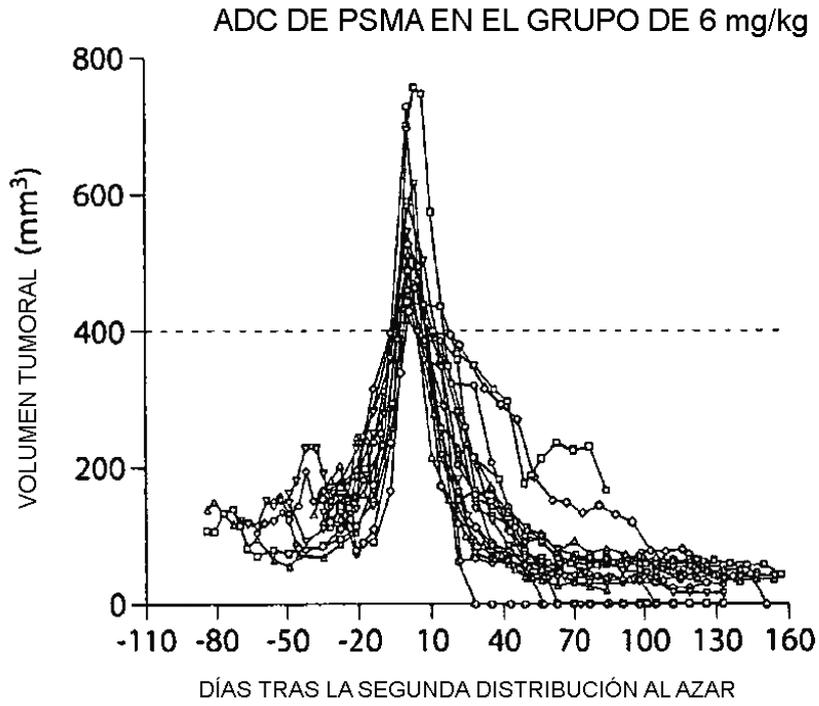


Fig. 15A

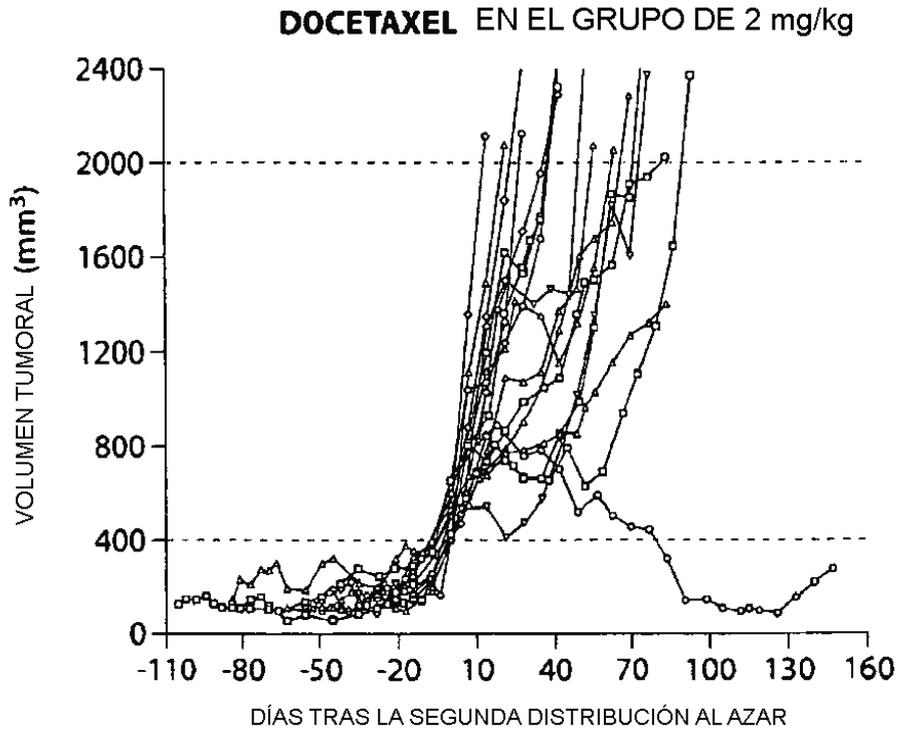


Fig. 15B

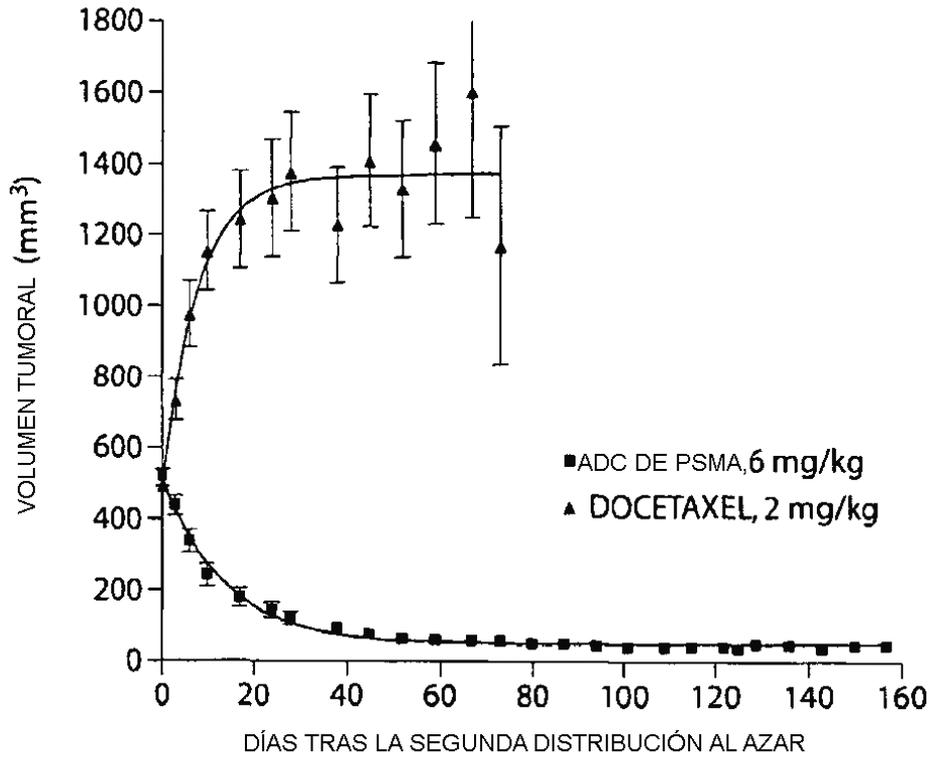


Fig. 16

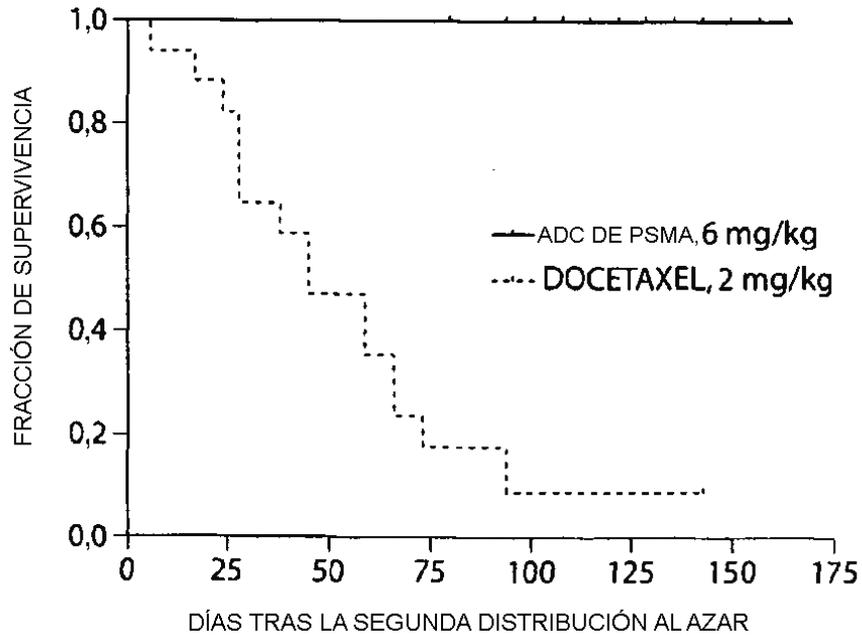


Fig. 17

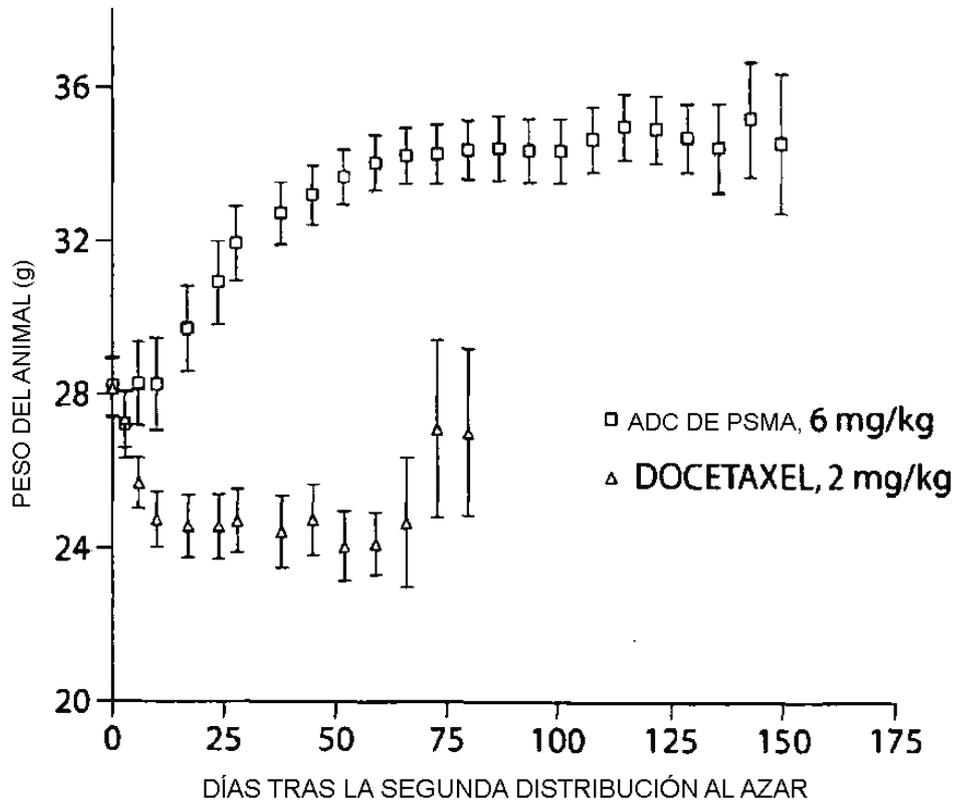


Fig. 18