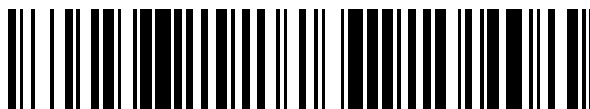


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 768**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006** **E 06762910 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 1910529**

54 Título: **Polinucleótidos que codifican epítomos hTERT restringidos a HLA-B7 para su uso en la prevención y/o tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

29.07.2005 EP 05291627

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2014

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (50.0%)
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)

72 Inventor/es:

LANGLADE-DEMOYEN, PIERRE;
GARCIA PONS, FRANCISCO;
ADOTEVI, OLIVIER;
CARDINAUD, SYLVAIN y
NEUVEUT, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 440 768 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

Polinucleótidos que codifican epítomos hTERT restringidos a HLA-B7 para su uso en la prevención y/o tratamiento de cáncer

5

Esta invención se refiere al campo de terapia antineoplásica, y a la identificación de péptidos inmunogénicos derivados de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). La presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican epítomos hTERT restringidos a la molécula MHC clase I, análogos de los mismos y poliepítomos que contienen dichos epítomos y/o análogos para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

10

También se incluyen en la presente invención vectores y células que comprenden dichos polinucleótidos para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden polipéptidos hTERT, polinucleótidos correspondientes, vectores y células, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

15

A la luz de las deficiencias en los actuales enfoques terapéuticos antineoplásicos, la terapia antitumoral ha disfrutado de un interés renovado. Los recientes estudios han potenciado nuestra comprensión de las respuestas inmunes antimelanoma asociadas con la regresión tumoral. Colectivamente, estos datos sugieren que las CTL CD8 específicas de tumor activadas son un arma inmunológica de elección para una potente terapia antitumoral. La investigación de proteínas sobreexpresadas que permiten activar linfocitos T citotóxicos contra tumores de diferentes orígenes también está progresando.

20

La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico, que consta de un componente proteico, TERT, y un componente de ARN (TR) que contiene el molde para la síntesis de la unidad repetitiva (T_2AG_3) añadida a los extremos de los cromosomas, que estabiliza a los cromosomas durante la replicación y evita la fusión extremo a extremo. El mantenimiento de una longitud constante del telómero evita que las células envejecan, y confiere inmortalidad (Hahn et al. Nat Med 1999;5:1164-70). Se halló una elevada actividad hTERT en más del 85% de cánceres humanos, mientras que la mayoría de los tejidos humanos adultos normales muestran ninguna o poca actividad telomerasa (Counter et al. Blood 1995;85:2315-20).

25

La expresión propagada de telomerasa en tumores indica que fragmentos peptídicos de hTERT podrían servir como antígeno o antígenos específicos de tumor y esto se ha confirmado en varios informes (Vonderheide et al. Immunity 1999;10:673-9). Los datos recientes de ensayos clínicos en Fase I demuestran la viabilidad de una vacuna contra hTERT en pacientes HLA-A2⁺, abriendo el camino para el uso de hTERT para vacunación terapéutica (Vonderheide et al. Clin Cancer Res 2004;10:828-39 ; Parkhurst et al. Clin Cancer Res 2004;10:4688-98). No obstante, los péptidos hTERT inmunogénicos identificados hasta la fecha están restringidos a un alelo MHC HLA-A2.1, con solamente dos informes iniciales sobre dos supertipos HLA, HLA-A3 y HLA-A24, representados respectivamente en el 44,2% y el 40% de la población.

35

Por tanto, las siguientes publicaciones informaron de la identificación de péptidos hTERT:

40

- El péptido hTERT ILAKFLHWL, restringido a HLA- A2 (Vonderheide et al. Immunity 1999; 10: 673- 9),
- Los péptidos hTERT MPRAPRCRA, RPAEEATSL, RPSFLLSSL y APRCRAVRS identificados por predicción informática dentro del contexto HLA-A (documento WO 00/02581). Sin embargo, nunca se han confirmado por resultados experimentales que estos péptidos sean epítomos eficaces, ni en un contexto HLA-B7 ni en cualquier contexto HLA.
- El péptido hTERT KLFGVLRLLK (K973), restringido a HLA- A3 (Vonderheide et al. Clin Cancer Res 2001; 7: 3343- 8), y
- Los péptidos hTERT VYAETKHFL (TEL324) y VYGFVRACL (TEL 461), restringidos a HLA-A24 (Arai et al. Blood 2001;9:2903-7)

50

Por consiguiente, los péptidos hTERT identificados hasta ahora no cubren toda la población, excluyendo de este modo un gran segmento de pacientes.

Para superar este fallo, al menos en parte y por tanto para cubrir mejor la diversidad genética de la población humana, la presente invención identifica nuevos epítomos derivados de hTERT, restringidos a un HLA particular que es diferente de HLA-A3 y HLA-A24. Entre los muchos alelos diferentes, la presente solicitud está interesada en el supertipo HLA-B7 que se expresa en aproximadamente el 25% de la población, y particularmente en el segundo alelo más expresado en la población humana HLA-B: el HLA-*B0702 (alelo presente en el 15-20% de los individuos en la población humana).

60

El gen de la isoforma-1 de la telomerasa es de 4015 pares de bases (pb) de longitud (número de acceso a NCBI AF015950) y codifica una proteína de 1132 aminoácidos (número de acceso a NCBI AAC51672.1) (Figura 1).

La invención se refiere a un polinucleótido que codifica un péptido de telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. En una realización particular, los péptidos codificados son de 9 aminoácidos de longitud (nonámero) o de 10 aminoácidos de longitud (decámero), y el

65

polinucleótido por tanto tiene 27 ó 30 nucleótidos. En general, el péptido codificado es de menos de 15 aminoácidos y el polinucleótido tiene menos de 45 nucleótidos.

La invención también se refiere a un polinucleótido que codifica péptidos hTERT que son epítomos, restringidos a la molécula MHC clase I, especialmente epítomos adecuados para inducir una respuesta inmune restringida a HLA-B7, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. La secuencia de nucleótidos del polinucleótido para su uso en la invención está, en una realización particular, limitado a la secuencia que codifica el péptido hTERT. Dichos péptidos pueden elegirse entre el grupo que consiste en MPRAPRCRA (p1; restos aminoácidos 1 a 9), APRCRAVRSL (p4; restos aminoácidos 4 a 13), APSFRQVSCL (p68; restos aminoácidos 68 a 77), RPAEEATSL (p277; restos aminoácidos 277 a 285), RPSFLLSSL (p342; restos aminoácidos 342 a 350), RPSLTGARRL (p351; restos aminoácidos 351 a 360), DPRRLVQLL (p444; restos aminoácidos 444 a 452), FVRACLRRL (p464; restos aminoácidos 464 a 472), AGRNMRRKL (p966; restos aminoácidos 966 a 974), LPGTTLTAL (p1107; restos aminoácidos 1107 a 1115) y LPSPKFTIL (p1123; restos aminoácidos 1123 a 1131). Todos estos polinucleótidos pueden usarse para inducir una respuesta inmune restringida a HLA-B7. En una realización particular, la invención se refiere especialmente a un polinucleótido que codifica un epítomo hTERT restringido a HLA-B7, elegido entre el grupo que consiste en RPSLTGARRL (p351), APSFRQVSCL (p68), APRCRAVRSL (p4), DPRRLVQLL (p444), FVRACLRRL (p464), AGRNMRRKL (p966), LPGTTLTAL (p1107) y hLPSPKFTIL (p1123) para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

Como se define en este documento, un "epítomo" es un determinante antigénico, es decir, el sitio peptídico reconocido por células del sistema inmune (células inmunes) y especialmente el sitio necesario para provocar una respuesta inmune. El término epítomo abarca tanto un epítomo lineal para el cual los aminoácidos consecutivos (especialmente, 9 ó 10) se reconocen por células inmunes, así como un epítomo conformacional para el cual las células inmunes reconocen aminoácidos en la medida que adoptan una configuración o conformación apropiada. Por consiguiente, en algunos epítomos, la conformación (estructura tridimensional) es tan importante como la secuencia de aminoácidos (estructura primaria).

La expresión "restringido a MHC clase I" se refiere a la capacidad de un péptido o epítomo particular de obtener una afinidad por una molécula MHC (complejo principal de histocompatibilidad) de clase I. Así mismo, la expresión "restringido a HLA-B7" se refiere a la capacidad de un péptido o epítomo particular de obtener una afinidad por este tipo de molécula HLA.

En resumen, los genes MHC codifican todas las moléculas polimórficas de superficie celular que no se unen solamente a péptidos foráneos sino también que pueden unirse a auto-péptidos o auto-péptidos mutados sobreexpresados o no, para presentarlos en la superficie celular de la célula que posibilita su reconocimiento por células inmunes apropiadas, especialmente células T. Dichas moléculas MHC, mencionadas como H-2 en ratones y HLA (Antígeno de Leucocitos Humanos) en seres humanos, se clasifican como moléculas de clase I (designadas HLA-A, B, o C) o moléculas de clase II (designadas DP, DQ, o DR).

Por consiguiente, las moléculas MHC clase I se unen específicamente a moléculas CD8 expresadas en linfocitos T citotóxicos (también llamados TCD8⁺), mientras que las moléculas MHC clase II se unen específicamente a moléculas CD4 expresadas en linfocitos T auxiliares (TCD4⁺).

Las moléculas MHC clase I se unen a péptidos derivados de proteínas degradadas proteolíticamente especialmente proteínas sintetizadas de forma endógena, por una célula. Los péptidos pequeños obtenidos en consecuencia se transportan al retículo endoplasmático donde se asocian a moléculas MHC clase I nacientes antes de guiarse a través del aparato de Golgi y presentarse en la superficie celular para el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos.

En la presente invención, los péptidos identificados anteriormente han demostrado por un lado que se unen con afinidad elevada o media a la molécula MHC clase I, y por otro lado transportarse de forma eficaz como un complejo MHC/epítomo hasta la superficie celular de las células. En una realización preferida, la molécula MHC clase I es un alelo MHC de la familia del supertipo HLA-B7; se dice que el epítomo hTERT está restringido al supertipo HLA-B7. Dicha familia abarca los alelos B0702, B0703, B0704, B0705, B1508, B3501, B3502, B3503, B51, B5301, B5401, B5501, B5502, B 5601, B5602, B6701 y B7801, familia de la cual se prefiere el HLA-B0702 (epítomo hTERT restringido a HLA-B0702).

Puede usarse un ensayo de estabilización de MHC para ensayar la afinidad de un péptido por una molécula HLA clase I particular (avidez relativa), tal como descrita en Firat et al. (1999. Eur. J. of Immunol. 29: 3112-3121), incorporada en este documento por referencia. En resumen, se incuban células transfectadas con la molécula MHC clase I durante una noche a 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio AIM-V libre de suero (Invitrogen Corp., Gibco), suplementado con 100 ng/ml de β 2-microglobulina humana,

- en ausencia de péptidos (control negativo),
- en presencia de un péptido de referencia (control positivo), y
- en presencia de los péptidos a ensayar (péptidos hTERT en el presente caso).

Los péptidos se incuban a diversas concentraciones finales que varían de 0,1 a 100 μ M (con concentraciones intermedias de 1 a 10 μ M). Las células transfectadas después se marcan con una concentración de saturación de un anticuerpo que reconoce la molécula MHC clase I de HLA particular, después se lavan dos veces y finalmente se tiñen con un anticuerpo secundario antes de la citometría de flujo. Los resultados se expresan como valores de

5 aidez relativa, es decir, la proporción de concentración de péptido ensayado necesaria para alcanzar el 20% de la unión máxima por la referencia respecto a la del péptido de referencia. Por lo tanto, cuanto menor sea el valor, más fuerte será la unión. Siguiendo este método, se dice que un péptido tiene una elevada afinidad relativa por una molécula HLA clase I particular, cuando RA < 1. En contraste, se concluye una afinidad relativa media cuando RA está comprendido entre 1 y 5, y preferiblemente entre 1 y 3.

10 Entre los nonámeros y decámeros hTERT, y particularmente los péptidos identificados anteriormente, los siguientes epítomos hTERT restringidos a MHC clase I pueden clasificarse como poseedores de una alta afinidad relativa por la molécula MHC clase I: MPRAPRCRA (p1), APRCRAVRSL (p4) y APSFRQVSCSL (p68). Usando el mismo enfoque, los siguientes epítomos hTERT restringidos a MHC clase I pueden clasificarse como poseedores

15 de una afinidad relativa media por la molécula MHC clase I: RPAEEATSL (p277), RPSFLLSSL (p342) y RPSLTGARRL (p351).

La presente solicitud también analiza un polinucleótido que codifica un análogo del epítomo restringido a MHC clase I, es decir, epítomos que tienen al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un epítomo hTERT restringido a clase I como se ha descrito anteriormente, especialmente un análogo del epítomo restringido a HLA-B7.

20

El término "análogo" como se define en este documento se refiere a un péptido cuya secuencia se obtiene de un péptido hTERT como se ha descrito anteriormente mediante al menos una sustitución de aminoácido, ya sea conservativa, semi-conservativa o no conservativa. Un análogo es opuesto a un epítomo por el hecho de que su secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos no se halla en el gen o proteína hTERT de referencia desvelado en la

25 Figura 1 que se consideran dentro de la presente solicitud como las moléculas de referencia para definir los péptidos o polinucleótidos llamados de tipo silvestre. Dicho análogo puede resultar de la sustitución en la secuencia de nucleótidos correspondiente de una o varias bases nucleicas en el codón que codifica dicho aminoácido. Por lo tanto, un análogo polinucleotídico difiere de su equivalente de tipo silvestre (polinucleótido que codifica el péptido hTERT con la secuencia de referencia de la cual se obtiene el análogo peptídico) mediante al menos una sustitución, y preferiblemente una, dos o tres sustituciones en el codón o codones que codifican el resto aminoacídico a sustituir. Como ejemplo, el péptido APRRLVQLL (llamado p444*) se obtiene del péptido p444 mediante la sustitución del primer resto aminoacídico (D -> A).

30

Un análogo particular de un análogo restringido a HLA-B7 tiene la misma longitud o es más corto que el epítomo del cual se obtiene.

35

Como realización particular, los epítomos hTERT descritos anteriormente y los análogos siempre conservan en su estructura primaria una prolina (P) en la posición 2, y/o uno de los siguientes aminoácidos en la última posición C-terminal: A, L, I, M, V, F, W o Y. Por lo tanto, los péptidos hTERT, incluyendo los análogos, tienen la siguiente secuencia consenso: X- P- X₆₋₇- [ALIMVFWY], donde X se refiere a cualquier aminoácido, X₆₋₇ se refiere a la cantidad de aminoácidos y [ALIMVFWY] se refiere a uno de estos aminoácidos.

40

Por lo tanto, para proporcionar un análogo de epítomo, la sustitución del aminoácido o la sustitución del codón correspondiente en el polinucleótido no está localizada en la segunda posición (o segundo codón). En una realización preferida, no se realiza ninguna sustitución en la posición C-terminal, aunque puede reemplazarse el último aminoácido C-terminal por un aminoácido equivalente, es decir, A, L, I, M, V, F, W o Y. Finalmente, en una realización preferida, la sustitución se localiza en la primera posición aminoacídica, donde cualquier aminoácido se reemplaza por una alanina (A).

45

50

En una realización adicional, el último aminoácido C-terminal de un decámero se deleta para dar un nonámero, con la condición de que el nonámero resultante mantenga o adopte la secuencia consenso X- P- X₆₋₇- [ALIMVFWY]. Del mismo modo, se añade un aminoácido seleccionado entre A, L, I, M, V, F, W e Y al extremo C-terminal de un nonámero para dar lugar al decámero, con la condición de que el decámero resultante mantenga o adopte la secuencia consenso X- P- X₆₋₇- [ALIMVFWY].

55

En el caso de sustitución, delección o adición, incluyendo especialmente aquellas ilustradas anteriormente, tomadas de forma individual o como combinaciones, la conformación tridimensional del análogo peptídico debe ser igual o ligeramente modificada con respecto a la del equivalente de tipo silvestre, para asegurar un plegamiento correcto del análogo y su correcta unión a la molécula MHC clase I. El ensayo de estabilización de MHC descrito anteriormente puede usarse para comprobar que dichas restricciones se cumplen.

60

El análogo resultante tiene al menos las mismas características que su equivalente de tipo silvestre, en términos de afinidad por una molécula MHC clase I particular, especialmente la molécula HLA-B7, y tiene esencialmente la misma capacidad de transportarse como un complejo epítomo/MHC en la superficie celular y/o tiene esencialmente

65

la misma capacidad de provocar una respuesta inmunogénica cuando se ensaya en las mismas condiciones.

En una realización preferida, el péptido de partida es un epítipo hTERT que tiene una afinidad media, y el análogo resultante tiene una afinidad mayor que su equivalente de tipo silvestre. En otra realización, el análogo tiene una inmunogenicidad mayor que su equivalente de tipo silvestre. Como ejemplo, el análogo peptídico p444* citado anteriormente tiene una afinidad aumentada por la molécula MHC clase I en comparación con el péptido p444 a partir del cual se obtiene.

Un objeto de la invención es proporcionar un epítipo hTERT o análogo, capaz de provocar una respuesta inmune, y particularmente una respuesta CTL (linfocito T citotóxico). Sin embargo, los linfocitos T no reconocen dicho análogo que se usa para estimular dichos linfocitos solamente, mediante células presentadoras de antígeno. En una realización, el análogo descrito anteriormente mantiene su comportamiento inmunogénico, y es capaz de provocar una respuesta inmune contra células que sobreexpresan epítipos hTERT, es decir, esos CTL reconocen el epítipo de tipo silvestre, incluso si se estimulan con un análogo del epítipo. En una realización particular, los linfocitos estimulados por un análogo de epítipo de la invención no reaccionan contra las células, que no sobreexpresaban epítipos hTERT. Por lo tanto, los linfocitos estimulados no reaccionan con células que sobreexpresan otros epítipos (reacción cruzada) o con células que expresan el epítipo hTERT como un nivel basal (células sanas). En una realización particular, todas las características mencionadas anteriormente son en un entorno HLA-B7, y preferiblemente en un contexto HLA-B0702.

Puede realizarse un ensayo de citotoxicidad convencional usando un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr de 4-5 horas para ensayar la capacidad de los linfocitos estimulados de reaccionar contra las células diana, tal como en la publicación Firat (1999. Eur. J. of Immunol. 29: 3112-3121) incorporada en este documento por referencia. En resumen, se activa una suspensión celular que contiene CTL, con péptido (péptido hTERT o análogo en el presente caso) más la propia molécula MHC clase I *in vivo*. Las células diana (que expresan o no el epítipo hTERT correspondiente) previamente incubadas con ^{51}Cr después se incuban con linfocitos activados. El reconocimiento de las células diana por los CTL activados conduce a la apoptosis de las células diana y la liberación de ^{51}Cr , donde dicha liberación es proporcional a la cantidad de células diana eliminadas. Se usa una incubación de células diana con un péptido de control como control negativo para calcular la liberación espontánea de ^{51}Cr . El porcentaje específico de lisis se calcula sustrayendo la lisis no específica observada con el péptido de control a la lisis obtenida con los péptidos a ensayar. Cuanto mayor es el porcentaje, más dianas se habrán eliminado por los CTL. La lisis específica se determina a varias proporciones de células efectoras (CTL) a células diana (E:T). La lisis específica se calcula como la proporción entre [liberación experimental - liberación espontánea] y [liberación total - liberación espontánea].

La presente solicitud describe un polinucleótido que codifica un poliepítipo. Un poliepítipo se define como un polipéptido que tiene al menos dos epítipos, elegidos entre los epítipos hTERT restringidos a MHC clase I, especialmente restringidos a HLA-B7 (p1, p4, p68, p277, p342, p351, p444, p464, p966, p1107 y p1123) y/o análogos de epítipos restringidos a MHC clase I, especialmente restringidos a HLA-B7 descritos en este documento. El polinucleótido comprende o consta de al menos dos unidades polinucleotídicas que codifican dichos epítipos o análogos. Una unidad polinucleotídica se define como la secuencia codificante para un epítipo o análogo desvelado en este documento.

En una realización particular, la solicitud describe un polinucleótido que codifica un poliepítipo, que comprende al menos epítipos elegidos entre (a) RPSLTGARRL (p351), (b) APSFRQVSCL (p68), (c) APRCRAVRSL (p4), (d) DPRRLVQLL (p444), (e) FVRACLRRRL (p464), (f) AGRNMRRKL (p966), (g) LPGTTLTAL (p1107) y (h) LPSPKFITL (p1123), o sus análogos como se ha definido anteriormente. Otro polinucleótido, que codifica un poliepítipo, comprende al menos una unidad polinucleotídica elegida entre el grupo de un polinucleótido que codifica un epítipo hTERT restringido a HLA-B7 correspondiente a (a) RPSLTGARRL (p351), (b) APSFRQVSCL (p68), (c) APRCRAVRSL (p4), (d) DPRRLVQLL (p444), (e) FVRACLRRRL (p464), (f) AGRNMRRKL (p966), (g) LPGTTLTAL (p1107) y (h) LPSPKFITL (p1123) y/o sus análogos como se ha definido anteriormente, y al menos una unidad polinucleotídica elegida entre el grupo de los polinucleótidos que codifican la secuencia MPAPRCRA (p1), RPAEEATSL (p277) o RPSFLLSSL (p342), o sus análogos como se ha definido anteriormente.

Ninguno de los polinucleótidos que codifican poliepítipos de la invención coincide con la secuencia codificante de hTERT de longitud completa.

En una realización particular, la cantidad de epítipos hTERT restringidos a MHC clase I y/o análogos en el poliepítipo preparado está limitada a 30. En otra realización, la cantidad de epítipos hTERT restringidos a HLA-B7 y/o análogos está limitada a aproximadamente 30, y es preferiblemente de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 30. En otra realización, la cantidad de epítipos hTERT restringidos a HLA-B0702 y/o análogos está limitada a aproximadamente 10, y es preferiblemente de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

Por consiguiente, el polinucleótido que codifica un poliepítipo tiene 30 o menos unidades polinucleotídicas, especialmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó 30 o cualquier cantidad dentro de este intervalo.

En una realización particular, las unidades polinucleotídicas (y por consiguiente los epítomos) del polinucleótido son consecutivas.

5 En dicha realización particular de la invención, el tamaño de la secuencia nucleica que codifica los epítomos hTERT o análogos consecutivos es de menos de 3000 pb, y preferiblemente de menos de 2000 pb, 1000 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb o 100 pb.

10 En una realización particular, el polinucleótido que codifica los múltiples epítomos (poliepítomo) consta de una molécula de ácido nucleico que codifica una forma truncada o mutada de la proteína hTERT. En una realización preferida, la forma truncada o mutada de la proteína hTERT se desprovee de su actividad catalítica, es decir, no es capaz de dirigir la síntesis de la unidad repetida (T_2AG_3) en los extremos de los cromosomas, participando en el mantenimiento de la longitud del telómero. Dicha proteína hTERT desprovista de su actividad catalítica, es decir, la actividad retrotranscriptasa, se denomina no funcional. Por lo tanto, en otra realización particular, la molécula de ácido nucleico que codifica una forma truncada o mutada de la proteína hTERT carece del dominio de actividad catalítica de hTERT. En una realización particular, la molécula de ácido nucleico que codifica una forma truncada de la proteína hTERT codifica una proteína que consta de al menos los 500 últimos aminoácidos C-terminales.

20 En una realización particular, el polinucleótido codifica una proteína hTERT que está delecionada en los aminoácidos 867 a 869 (secuencia VDD), correspondiente a los nucleótidos 2654 a 2662 de la Figura 1 (tipo silvestre) y que posibilita que el nucleótido 2657 sea contiguo al nucleótido 2658 en la Figura 9 que representa el sitio de deleción, o como alternativa en los aminoácidos 864 a 872, correspondiente a los nucleótidos 2645 a 2671 de la Figura 1 (tipo silvestre) y que posibilita que el nucleótido 2648 sea contiguo al nucleótido 2649 en la Figura 9 que representa el sitio de deleción. En una realización particular, la proteína hTERT codificada tiene una deleción que comprende al menos los restos aminoácidos 867 a 869, es decir, esa deleción es más larga que los 3 restos aminoácidos (secuencia VDD). Como ejemplo, tenemos la deleción 864-872 descrita anteriormente así como una deleción de 22 aminoácidos partiendo del resto aminoácido 857 a 879 (de acuerdo con la Figura 1) o una deleción que comprende los 5 aminoácidos N-terminales y los 5 aminoácidos C-terminales a la secuencia VDD (desde el aminoácido 862 hasta el aminoácido 874 de acuerdo con la Figura 1, correspondiente a los nucleótidos 2639 a 2679). En una realización particular, el polinucleótido comprende o consta de la secuencia de nucleótidos expuesta en la Figura 9 o Figura 10.

35 Las unidades polinucleotídicas de acuerdo con los múltiples epítomos pueden disponerse de forma consecutiva, es decir, el extremo 3' de la primera unidad polinucleotídica está directamente unido al extremo 5' de la segunda unidad polinucleotídica (etc.), produciendo un polinucleótido que codifica una secuencia peptídica exclusivamente compuesta por epítomos consecutivos. Dicho polinucleótido puede codificar un poliepítomo que comprende o consta de los péptidos p1, p4, p68, p277, p342, p351, p444, p464, p966, p1107 y p1123. En una realización particular, el polinucleótido codifica la siguiente secuencia peptídica MPRAPRCRAAPRCRAVRSLSFRQVSLRPAEEATS-LRPSFLLSSLRPSLTGARRL, que comprende por tanto 6 epítomos hTERT restringidos a MHC clase I, particularmente restringidos a HLA-B7.

40 Los múltiples epítomos pueden separarse alternativamente por un espaciador de un aminoácido o un espaciador peptídico, es decir, lo que significa que las diferentes unidades polinucleotídicas se separan por uno o varios codones que codifican respectivamente uno o varios aminoácidos. Como espaciadores que mejoran el procesamiento de múltiples epítomos, se prefieren péptidos de 4 aminoácidos compuestos por una arginina (R) en la posición C-terminal y restos hidrófilos (A, K, D y/o T) en otras posiciones. Especialmente, pueden usarse los péptidos de 4 aminoácidos que tienen un resto cargado positivamente o un resto ácido en la posición C-terminal, dependiente o independientemente de los restos hidrófilos (A, K, D, y/o T) en otras posiciones. En una realización particular, dichos espaciadores son secuencias de procesamiento interno tales como secuencias de procesamiento endosómico o lisosómico, que posibilitan un mejor procesamiento de los múltiples epítomos y evitan el procesamiento de nuevos péptidos resultantes del corte solapante. Dicha separación que recurre a un espaciador puede usarse para separar todo o, por el contrario, parte de las unidades polinucleotídicas y, por consiguiente, todo o parte de los epítomos.

55 El orden en que se disponen los epítomos puede determinarse por los especialistas en la técnica, de acuerdo con los siguientes criterios: algunos órdenes pueden facilitar la transcripción y/o traducción del polinucleótido, pueden facilitar el transporte del poliepítomo expresado resultante en el retículo endoplasmático (RE), especialmente si la confirmación tridimensional afecta a las propiedades, y puede facilitar el procesamiento del poliepítomo en varios epítomos o análogos y evitar el procesamiento de epítomos solapantes.

60 El poliepítomo posibilita la producción de una respuesta CTL contra al menos uno, especialmente contra varios epítomos o análogos contenidos en el poliepítomo, de forma simultánea, en un único animal o ser humano.

65 En una realización particular, el polinucleótido que codifica el poliepítomo comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica una señal diana, unida de forma funcional a la unidad polinucleotídica que codifica el epítomo más N-terminal de los al menos dos epítomos. "Unida de forma funcional" como se usa en este documento indica que la señal diana (secuencia cadena arriba) está unida al epítomo N-terminal (secuencia cadena abajo) de

un modo que posibilita que la secuencia señal sea funcional, es decir, posibilitando dirigir al polipéptido al compartimento celular o dominio correcto. Por lo tanto, la unión entre las dos secuencias permite que cada secuencia desempeñe su propia función en diferentes localizaciones y/o diferentes fases. En una realización particular, dicha señal diana es una secuencia señal de retículo endoplasmático, y permite que el polipéptido se dirija al RE, para un procesamiento apropiado y asociación con la molécula MHC clase I.

En una realización adicional, se añade un codón que codifica un resto de metionina cadena arriba de la secuencia que codifica el epítipo más N-terminal, para posibilitar la correcta traducción del polinucleótido, si el proceso de traducción requiere un codón de inicio. Dicho codón se añade, solamente cuando el epítipo más N-terminal no posee un resto de metionina en su primera posición.

La presente solicitud también describe un polinucleótido, de acuerdo con las definiciones dadas anteriormente, que comprende o consta de al menos dos unidades polinucleotídicas seleccionadas entre el grupo que consiste en

- a. ATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCC (n1),
- b. GCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTG (n4),
- c. GCCCCCTCCTTCCGCCAGGTGTCCTGCCTG (n68),
- d. AGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTG (n277),
- e. CGGCCCTCCTTCTACTCAGCTCTCTG (n342),
- f. AGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC (n351),
- g. GACCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444),
- h. TTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGCTG (n464),
- i. GCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTC (n966),
- j. CTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTG (n1107),
- k. CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTG (n1123), y
- l. GCCCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444*).

Los siguientes polinucleótidos también se describen:

- un polinucleótido, que comprende al menos una unidad polinucleotídica seleccionada entre:

- a. AGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC (n351)
- b. GCCCCCTCCTTCCGCCAGGTGTCCTGCCTG (n68),
- c. GCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTG (n4),
- d. GACCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444),
- e. TTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGCTG (n464),
- f. GCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTC (n966),
- g. CTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTG (n1107),
- h. CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTG (n1123), y
- i. GCCCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444*), o sus análogos como se ha definido anteriormente, y al menos una unidad polinucleotídica seleccionada entre:
- j. ATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCC (n1),
- k. AGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTG (n277),
- l. CGGCCCTCCTTCTACTCAGCTCTCTG (n342), o sus análogos como se ha definido anteriormente.

- un polinucleótido, que comprende al menos una unidad polinucleotídica seleccionada entre:

- a. AGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC (n351)
- b. GCCCCCTCCTTCCGCCAGGTGTCCTGCCTG (n68),
- c. GCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTG (n4),
- d. GACCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444),
- e. TTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGCTG (n464),
- f. GCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTC (n966),
- g. CTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTG (n1107),
- h. CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTG (n1123), y
- i. GCCCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444*), o sus análogos como se ha definido anteriormente.

También se describen polinucleótidos o unidades polinucleotídicas de acuerdo con un epítipo, análogo o polipéptido de la invención, teniendo en consideración la degeneración del código genético. Por lo tanto, cada aminoácido puede codificarse por el codón de la secuencia de nucleótidos de referencia de hTERT, o por cualquier codón que codifique dicho aminoácido.

La solicitud también describe un polinucleótido que comprende o consta de cualquier combinación de al menos dos de estas unidades polinucleotídicas o análogos de las mismas, seleccionados entre el grupo anterior, donde dicha unidad polinucleotídica o análogo codifica un epítipo hTERT restringido a MHC clase I, especialmente restringido a HLA-B7.

Todas las características dadas anteriormente referentes a epítomos, análogos, poliepítomos, combinación de los mismos, espaciadores, secuencias señal diana... son aplicables a cualquier polipéptido así como a las secuencias polinucleotídicas correspondientes.

5

Un vector recombinante, que comprende o consta de un polinucleótido como se ha definido en el uso de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, también es un objeto de la presente invención. El vector recombinante puede ser un vector para expresión eucariota o procariota, tal como un plásmido, un fago para introducción en bacterias, un YAC capaz de transformar levaduras, un vector viral y especialmente un vector

10

retroviral, o cualquier vector de expresión. Un vector de expresión como se define en este documento se elige para posibilitar la producción de un epítopo o análogo o poliepítopo como se ha definido anteriormente, *in vitro* o *in vivo*.

Por lo tanto, además del polinucleótido, el vector de la invención puede comprender adicionalmente regiones de regulación de la transcripción (incluyendo promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma (RBS), señal poliA), una señal de terminación, un origen de replicación procariota o eucariota y/o un gen de selección. Las características del promotor pueden determinarse fácilmente por los especialistas en la técnica en vista de la expresión necesaria, es decir, promotor constitutivo, transitorio o inducible, fuerte o débil, específico de tejido y/o específico de la fase del desarrollo. Por lo tanto, pueden elegirse promotores específicos de tejido dependiendo del órgano en el cual se administra una composición que contenga este vector, por ejemplo, inyectado, y dependiendo

15

20

de la intensidad de expresión requerida. En una realización particular, el promotor es un promotor CMV (citomegalovirus humano). Dicho vector también puede comprender una secuencia que posibilite la expresión condicional, tal como secuencias del sistema Cre/Lox o sistemas análogos.

Los vectores de expresión de la invención pueden ser vectores virales, y particularmente un vector de expresión viral, tal como vectores derivados de retrovirus, especialmente derivados de lentivirus tales como vectores derivados de VIH, VIF o VIS. Más particularmente, el vector derivado de lentivirus es un vector derivado de lentivirus humano tal como un vector de expresión de VIH, particularmente un vector derivado de VIH-1 o VIH-2. Un vector derivado de retrovirus comprende un genoma del vector retroviral, habitualmente incluido 3n una construcción de ADN, tal como un plásmido, y expresado en partículas virales, donde dicho genoma de vector

25

30

35

retroviral comprende los elementos necesarios para la retrotranscripción, particularmente las LTR posiblemente mutadas incluyendo delecionadas en parte, especialmente delecionadas en la región U3. En ningún caso, el vector derivado de retrovirus contiene todas las secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas retrovirales de longitud completa. Posiblemente, contenga parte de una o varias de dichas secuencias de nucleótidos siempre que no codifique dichas proteínas o fragmentos funcionales de las mismas. Dichas construcción de ADN que comprende dicho genoma de vector retroviral comprende adicionalmente un ADN de interés recombinado con las secuencias nucleotídicas retrovirales, comprendiendo o constando dicho ADN de interés de un polinucleótido de la invención.

En una realización preferida, el genoma del vector derivado de retrovirus comprende un ADN solapa como se describe a continuación y al menos un polinucleótido como se define en el uso de la invención. En una realización preferida, el vector derivado de retrovirus es un vector de expresión de VIH que comprende un ADN solapa como se describe a continuación y al menos un polinucleótido de la invención. Los vectores de VIH expresan por lo tanto solamente el ácido o ácidos nucleicos de interés, incluyendo los polinucleótidos de la invención, contenidos entre las dos LTR de VIH y por tanto pueden acomodar grandes secuencias de hasta 5-6 kb. Una realización particular

40

45

50

de la invención es un vector de expresión de VIH, y más particularmente un vector de expresión de VIH-1 o VIH-2, donde una LTR de VIH-1 o respectivamente la LTR de VIH-2 está delecionada para el promotor y el potenciador del dominio U3 ($\Delta U3$). Esta delección particular ha demostrado previamente aumentar la expresión del ácido o ácidos nucleicos contenidos en el vector, y particularmente cuando están asociados con un promotor. En otra realización particular, el vector comprende una LTR delecionada en el promotor y el potenciador del dominio U3, un promotor tal como un promotor CMV o EF1 α y un polinucleótido de la invención.

En otra realización, el polinucleótido de la invención introducido en el vector derivado de retrovirus se incluye en un casete de expresión.

Un ADN solapa (o triple hélice como se desvela en el documento WO 99/55892, el documento WO 01/27300 y el documento WO 01/27304) es una secuencia de nucleótidos de origen retroviral o tipo retroviral que comprende dos regiones esenciales, es decir, las regiones cPPT (tracto central de polipurina) y la CTS (región de terminación de acción en cis), donde las regiones cPPT y CTS incluyen una estructura de ADN de tres hebras. Un ADN solapa adecuado para la invención puede obtenerse de un organismo retroviral o tipo retroviral tal como un retrotransposón, preparado sintéticamente (síntesis química) o por amplificación del ADN solapa de cualquier ácido nucleico retroviral tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El retrovirus, del cual puede obtenerse el ADN solapa, es particularmente un retrovirus o un lentivirus, especialmente un retrovirus o lentivirus humano y es en particular un retrovirus VIH, el virus VAEC (virus de la artritis encefálica caprina), el virus VAIE (virus de la anemia infecciosa equina), el virus VISNA, el virus VIS (virus de la inmunodeficiencia del simio) o el virus VIF (virus de la inmunodeficiencia felina). En una realización más preferida, el ADN solapa se obtiene de un retrovirus VIH, por ejemplo, un virus VIH-1 o VIH-2 o cualquier aislado diferente de estos dos tipos. Es digno de

55

60

65

menção que el ADN solapa se usa aislado de su contexto nucleotídico natural (genoma viral), es decir, aislado del gen *pol* en el cual está contenido de forma natural en un retrovirus. Por lo tanto, el ADN solapa se usa, en la presente invención, delecionado de las partes 5' y 3' innecesarias del gen *pol* y se recombina con secuencias de origen diferente.

El ADN solapa actúa como un determinante en cis de la importación nuclear del vector, y es de gran interés para la recombinación y la integración de uno o más ácidos nucleicos en células tanto en división como no en división. El vector de expresión derivado de retrovirus especialmente vectores derivados de VIH, que incluyen la secuencia del ADN solapa (vectores TRIP) son capaces de transducir células B y T primarias, macrófagos, células dendríticas, etc., con una eficiencia diez veces mayor que otros vectores VIH que carecen del ADN solapa. Puede obtenerse de forma rutinaria una transducción del 80-90% de las células.

En una realización preferida, un vector adecuado para una estrategia de expresión *in vivo* y vacuna es un vector retroviral y especialmente un vector lentiviral (véanse los documentos WO 99/55892, WO 01/27300 y WO 01/27304). Dichos vectores han demostrado ser particularmente eficaces y seguros, cuando su genoma se modifica (Firat et al. 2002, The Journal of Gene Medicine 4: 38-45). De hecho, estos vectores tienen la capacidad de transferir de forma eficaz y estable genes terapéuticos o indicadores, en gran diversidad de células y tejidos, tales como células madre hematopoyéticas, cerebro, hígado y retina. Además, esta elevada eficacia de transducción es independiente del estado proliferativo de las células diana. En particular, estos vectores han demostrado inducir de forma eficaz respuestas de células T CD8⁺ tanto *in vivo* en ratones como *ex vivo* en seres humanos, debido a su capacidad de transducir células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas (DC) con elevada eficacia, *ex vivo* así como *in vivo* (Esslinger et al. Hum Gene Ther 2002;13:1091-100; Breckpot et al. J Gene Med 2003;5:654-67; Esslinger et al. J Clin Invest 2003;111: 1673-81).

El vector, definido en la Figura 7, se ha usado para expresión *in vitro* o *in vivo* de epítomos, análogos o poliepítomos de la invención. Como ejemplos de vectores, de los cuales pueden obtenerse los vectores de la invención, están los siguientes, todos depositados en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes at Institut Pasteur, París, Francia):

Nombre del vector	Número de acceso	Fecha de depósito	Descrito en la solicitud de patente
pTRIP.EGFP	I-2005	15 de abril de 1998	WO 99/55892
PTRIP-MEL.IRES-GFP	I-2185	20 de abril de 1999	
PTRIP-TEL/AML.IRES-GFP	I-2326	11 de octubre de 1999	WO 01/27300
PTRIP-TEL/ILKE.IRES-GFP	I-2327	11 de octubre de 1999	
PTRIP-DES.IRES-GFP	I-2331	11 de octubre de 1999	

Los vectores descritos en la solicitud de patente WO 01/27304, y especialmente TRIP ΔU3 Efa1 GFP y TRIP ΔU3 PL CMV GFP, también pueden usarse para obtener los vectores de la presente invención.

Un vector particular es el vector pTRIP-CMV-ΔhTERT, depositado en la CNCM (Institut Pasteur, París, Francia) con el número CNCM I-3660 el 28 de julio de 2006. Un medio de crecimiento adecuado para cultivar este vector es un medio TB, opcionalmente suplementado con higromicina. Un vector para el uso de la invención es el vector pTRIP-CMV-ΔhTERT depositado en la CNCM con el número CNCM I-3660 el 28 de julio de 2006, en el cual se ha sustituido la secuencia hTERT delecionada por un polinucleótido definido en el uso de la invención.

La presente invención también se refiere a células que comprenden los vectores definidos en el uso de la invención.

En una realización, la célula se transfecta con un vector definido en el uso de la invención, por métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica, es decir, por transfección química (fosfato cálcico, lipofectamina), técnicas basadas en lípidos (liposoma), electroporación, fotoporación, uso de vectores virales... En otra realización, una célula se transforma o transduce con un polinucleótido definido en el uso de la invención, de un modo que posibilite la integración del polinucleótido en el genoma de la célula por recombinación con la secuencia celular homóloga o por inserción en el genoma celular. La transfección, infección o transducción puede suceder *ex vivo*, es decir, en un entorno artificial fuera del organismo vivo.

Entre las células particularmente interesantes en la estrategia de vacuna están células del sistema inmune, y especialmente células presentadoras de antígeno (APC). En una realización particular, estas células son APC implicadas en el reconocimiento MHC clase I, como células dendríticas (DC) o en el reconocimiento MHC clase II tal como macrófagos o linfocitos B. Entre las DC, se prefieren DC maduras completamente *ex vivo*, es decir, DC que se han madurado *in vitro* por epítomos o análogos.

Como se usa en este documento, los términos "*transfectado*", "*transformado*" o "*infectado*" se refieren a una célula que comprende un vector definido en el uso de la invención (expresión transitoria), mientras que la expresión

"genéticamente transformado" se refiere a una célula cuyo genoma se ha modificado definitivamente por un polinucleótido definido en el uso de la invención (expresión permanente).

5 Dichas células transformadas de forma transitoria o estable pueden cualquier célula procariota (bacterias) o eucariota (levaduras, células animales incluyendo de mamífero especialmente humanas). En una realización, las células son células no humanas. En una realización particular, las células de la invención son células humanas aisladas, significando "aisladas" fuera de su entorno natural.

10 Un hospedador particular es la cepa de *E. coli* depositada en la CNCM con el número CNCM I-3660 el 28 de julio de 2006.

La invención también se refiere a epítomos, análogos o poliepítomos definidos anteriormente cuando se describen los polinucleótidos definidos en el uso de la invención y particularmente a cualquier polipéptido codificado por un polinucleótido o unidades polinucleotídicas definidas en el uso de la invención. La invención también se refiere a un epítomo hTERT elegido entre el grupo que consiste en:

- a. MPRAPRCRA (p1),
- b. APRCRAVRSL (p4),
- c. APSFRQVSCL (p68),
- 20 d. RPAEEATSL (p277),
- e. RPSFLLSSL (p342),
- f. RPSLTGARRL (p351),
- g. DPRRLVQLL (p444),
- h. FVRACLRRL (p464),
- 25 i. AGRNMRRKL (p966),
- j. LPGTTLTAL (p1107), y
- k. LPSPKFTIL (p1123), para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer

Los epítomos hTERT restringidos a HLA-B7 particulares, se eligen entre el grupo que consiste en:

- a. RPSLTGARRL (p351),
- b. APSFRQVSCL (p68),
- c. APRCRAVRSL (p4),
- 35 d. DPRRLVQLL (p444),
- e. FVRACLRRL (p464),
- f. AGRNMRRKL (p966),
- g. LPGTTLTAL (p1107),
- h. LPSPKFTIL (p1123), y
- 40 i. APRRLVQLL (p444*).

Un grupo particular consta de los siguientes epítomos hTERT restringidos a MHC clase I, especialmente restringidos a HLA-B7:

- a. MPRAPRCRA (p1),
- 45 b. APRCRAVRSL (p4),
- c. APSFRQVSCL (p68), y
- d. RPSLTGARRL (p351).

Otro grupo consta de los siguientes epítomos hTERT restringidos a HLA-B7: RPAEEATSL (p277) y RPS-FLSSL (p342). Un alelo HLA-B7 preferido abordado por estos epítomos es HLA-B0702.

También se describen análogos de los péptidos desvelados anteriormente, y que tienen al menos una sustitución de aminoácido. Las características que pertenecen a estos análogos se han descrito especialmente en las páginas anteriores. Un análogo de péptido particular para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer p444* que tiene la siguiente secuencia peptídica APRRLVQLL.

También se describe un poliepítomo que comprende al menos dos epítomos y/o análogos descritos anteriormente. Los poliepítomos no son la proteína hTERT de longitud completa. El tamaño de dicho poliepítomo puede variar de 15 a 1000, en particular de 50 o de 100 a 1000 aminoácidos, especial y particularmente de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500 ó 1000 aminoácidos. Dicho epítomo comprende o consta de 2 a 30 epítomos o análogos, y particularmente de 2 a 20 o de 2 a 10 epítomos y/o análogos. Un poliepítomo particular comprende o consta de 6 epítomos consecutivos y tiene la siguiente secuencia MPRAPRCRAAPRCRAVRSLAPSFRQVSCLRPAEEATSLRPSF LLSSLRPSLTGARRL. Otro poliepítomo particular comprende o consta de los epítomos p1, p4, p68, p277, p342 y p351, siendo los epítomos consecutivos entre sí en el poliepítomo obtenido o estando separados todo o parte de ellos por espaciadores peptídicos.

Otro poliepítopo comprende al menos dos epítomos, eligiéndose al menos uno entre el grupo que consiste en:

- a. RPSLTGARRL (p351),
- b. APSFRQVSCL (p68),
- c. APRCRAVRSL (p4),
- d. DPRRLVQLL (p444),
- e. FVRACLRRL (p464),
- f. AGRNMRRKL (p966),
- g. LPGTTLTAL (p1107),
- h. LPSPKFTIL (p1123), y
- i. APRRLVQLL (p444*),

o análogos de los mismos obtenidos por sustitución de al menos un resto de aminoácido, y eligiéndose al menos uno entre el grupo que consiste en

- j. MPRAPRCRA (p1),
- k. RPAEEATSL (p277),
- l. RPSFLLSSL (p342),

o análogos de los mismos obtenidos por sustitución de al menos un resto de aminoácido, donde dicho poliepítopo no es hTERT de longitud completa.

Los polipéptidos pueden sintetizarse químicamente, o producirse *in vitro* (sistema sin células) o *in vivo* después de la expresión de la secuencia correspondiente de ácido nucleico en un sistema celular.

La proteína hTERT de longitud completa representada en la Figura 1 se excluye de la invención, así como la correspondiente secuencia codificante de longitud completa. También se excluye de la presente invención el péptido RPALLTSRL. Estos péptidos se excluyen particularmente en el contexto del reconocimiento de HLA-B7.

La invención también se refiere a un epítopo, análogo, polinucleótido, un vector de expresión o célula hospedadora definida en el uso anteriormente, para su uso en la provocación o participación para proporcionar una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra hTERT.

La invención también se refiere a una composición que comprende un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora y/o un polipéptido definido en el uso de la invención. En una realización particular, dicha composición es adecuada para administración *in vivo*, es decir, dicha composición se preparada para inyección, o más generalmente para asociación con soluciones o emulsiones líquidas fisiológicamente aceptables para administración. Dicha composición puede usarse para administración sistémica o local, especialmente por inyección, y puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente adecuado (incluyendo agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos), o un medio y/o un vehículo.

En una realización particular, dicha composición comprende un polinucleótido definido en el uso de la invención que codifica un epítopo, análogo o que codifica un poliepítopo descrito anteriormente. Dicha composición puede comprender otras moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un epítopo hTERT o análogo del mismo o poliepítopo, restringido a un alelo diferente de MHC clase I al de HLA-B7. La combinación de epítomos hTERT restringidos a diferentes supertipos HLA o alelos posibilita cubrir una población más grande de pacientes en necesidad de tratamiento que un único supertipo o alelo. Para este fin, se prefieren HLA-A1, -A2, -A3 y -A24.

En otra realización, la composición comprende moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un epítopo hTERT o análogo del mismo o poliepítopo, restringido a MHC clase II. Dicha composición puede comprender cualquier combinación de moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, con al menos un epítopo hTERT restringido a HLA-B7, análogo o poliepítopo de la presente invención. La combinación, en una composición de moléculas de ácido nucleico, de polinucleótidos que codifican epítomos restringidos a Clase I y Clase II que posibilitan la reacción de diversas células inmunes (linfocitos T o células NK para clase I frente a linfocitos auxiliares para clase II), y/o la provocación de diversas respuestas inmunes (respuesta humoral frente a celular) también está dentro de la presente invención.

En otra realización, la composición comprende moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos dichas moléculas que codifican un antígeno específico de tumor (TSA) y/o al menos un antígeno asociado a tumor (TAA), tal como antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) o fosfatasa ácida prostática (PAP) (Tartour et al. 2000 Immunol Lett Sep 15; 74(1): 1-3; Tartour et al. 1996 Presse Med. Nov 16; 25(25): 1717-22).

Pueden usarse varios tipos de composiciones terapéuticas para provocar una respuesta inmune contra un epítopo o análogo como se define en el uso de la invención.

Una composición que comprende un polinucleótido definido en el uso de la invención se administra a un hospedador, por ejemplo inyectado (conocido como vacunación con ADN) y dicho ácido nucleico expresa *in vivo* un polipéptido que comprende o que consta de múltiple epítomos. Dichas vacunas de ADN habitualmente constan de vectores plasmídicos como se ha descrito anteriormente. El suministro de ADN desnudo ha demostrado ser poco eficaz, y se necesitan algunos vehículos para mejorar el suministro y captación de ADN en las células. Hasta la fecha se han desarrollado dos tipos de vehículos: (1) vehículos virales (adenovirus, lentivirus, virus del sarampión), o (2) vehículos no virales tales como polímeros (y especialmente polímeros catiónicos), ADN encapsulado (liposomas, que comprenden lípidos catiónicos que interaccionan espontánea y rápidamente con polianiones, tales como ADN y ARN, produciendo complejos liposoma/ácido nucleico) o ADN ligado a micropartículas de oro. Además, pueden usarse ventajosamente agentes que ayudan a la captación celular del ácido nucleico, tal como iones calcio, proteínas bacterianas (proteínas de *Shigella*), proteínas virales y otros agentes que facilitan la transfección. Otro tipo de composición es una composición que comprende pseudopartículas lentivirales que comprenden un vector o genoma de vector como se ha mencionado anteriormente.

Otro tipo de composición comprende un epítomo, análogo o poliepítomo como se define en el uso de la invención. Dicha composición es inmunogénica, es decir, es capaz de provocar una respuesta inmune en un hospedador en que se administra. Sin embargo, para aumentar las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos de la invención, puede administrarse un adyuvante con el polipéptido, para provocar o mejorar la respuesta inmune. Un adyuvante se define como cualquier sustancia que potencia la inmunogenicidad de un antígeno mezclado con dicho adyuvante. Algunos adyuvantes convierten antígenos solubles en pequeñas partículas, tales como hidróxido de aluminio en gel, emulsión de aceite en agua o complejos inmunoestimuladores (ISCOM). Otra clase de adyuvantes comprende constituyentes estériles de bacterias tales como pared celular o polisacáridos, adyuvante de Freund. Finalmente, también pueden usarse agentes emulsionantes o agentes tamponantes del pH para potenciar el comportamiento inmunogénico del epítomo o análogo.

Todas las composiciones indicadas anteriormente pueden inyectarse en un hospedador mediante diferentes vías: inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), administración oral y administración a la mucosa, especialmente administración intra-nasal o inhalación. La cantidad a administrar (dosificación) depende del sujeto a tratar, incluyendo la afección del paciente, el estado del sistema inmune del individuo, la vía de administración y el tamaño del hospedador. Las dosificaciones adecuadas varían entre 200 µg a 1 mg, y pueden modificarlas los especialistas en la técnica, dependiendo de las circunstancias.

Las composiciones definidas en el uso de la invención son útiles para la profilaxis y/o tratamiento de estados neoplásicos en pacientes, resultantes de proliferación celular no controlada, incluyendo tumores, resultantes de la sobre-expresión de hTERT, así como para el tratamiento de consecuencias perjudiciales que acompañan a dicho estado neoplásico, por ejemplo, cáncer. La expresión "*tratamiento*" abarca el efecto curativo conseguido con las composiciones de la invención y también el efecto beneficioso para el paciente que experimenta el tratamiento, obteniéndose dicho efecto a nivel celular o nivel clínico, incluyendo como resultado, una mejora de la afección del paciente y/o un estado de remisión o una recuperación del estado de salud. En una realización particular, la composición definida en el uso de la invención comprende adicionalmente compuestos activos adicionales útiles para la profilaxis o el tratamiento de tumores, ya sean compuestos generales o compuestos que han demostrado ser activos en un cáncer específico de tejido.

La solicitud desvela un proceso para activar linfocitos T contra epítomos hTERT restringidos a clase I, particularmente restringidos a HLA-B7:

a. proporcionando linfocitos T, y,

b. cultivando *in vitro* dichos linfocitos T con al menos un epítomo o análogo de epítomo o poliepítomo como se describe en este documento, en condiciones que posibiliten la activación de dichos linfocitos.

En una realización particular, los linfocitos T activados con linfocitos T citotóxicos (CTL). Las condiciones convencionales para activar linfocitos T usan interleuquina (IL) 2, IL-7, IL-12 y/o IL-15, y se describen en Minev et al. (2000 PNAS; 97(9): 4796-4801) incorporado en este documento por referencia.

La solicitud también desvela un proceso para comprobar el comportamiento inmunogénico de un péptido hTERT, que comprende:

a. activar linfocitos T, por cultivo *in vitro* de dichos linfocitos T con al menos un epítomo o análogo de epítomo o poliepítomo como se describe en este documento, en condiciones apropiadas,

b. cultivar *in vitro* dichos linfocitos activados con células diana que expresan, en su superficie celular, un epítomo hTERT como se describe en este documento unido a una molécula MHC clase I, en condiciones adecuadas, y

c. determinar si dichos linfocitos activados reaccionan contra dichas células diana.

En un proceso particular para comprobar el comportamiento inmunogénico de un péptido hTERT, el epítipo cuando se usa individualmente, es decir, no en forma de un poliepítipo, se elige entre (a) RPSLTGARRL (p351), (b) APSFRQVSCL (p68), (c) APRCRAVRS (p4), (d) DPRRLVQLL (p444), (e) FVRACLRR (p464), (f) AGRRMNRKL (p966), (g) LPGTTLTAL (p1107) y (h) LPSPKFTIL (p1123); un ejemplo de análogo es p444*

5

Un proceso para comprobar el comportamiento inmunogénico y la restricción a HLA-B7 de un péptido hTERT, comprende:

10

a. activar linfocitos T como se ha descrito anteriormente, con un epítipo elegido entre MPRAPRCRA (p1), APRCRAVRS (p4), APSFRQVSCL (p68), RPAEEATSL (p277), RPSFLLSSL (p342) RPSLTGARRL (p351), DPRRLVQLL (p444), FVRACLRR (p464), AGRRMNRKL (p966), LPGTTLTAL (p1107) y LPSPKFTIL (p1123) o un análogo de epítipo tal como APRRLVQLL (p444*) o el poliepítipo definido anteriormente;

15

b. cultivar *in vitro* dichos linfocitos activados con células diana que expresan, en su superficie celular, un epítipo hTERT de la invención unido a una molécula HLA-B7, en condiciones adecuadas, y
c. determinar si dichos linfocitos activados reaccionan contra dichas células diana.

La activación de linfocitos incluye la presentación de dichos epítopos o análogos por células presentadoras de antígeno a linfocitos T vírgenes (no activados). Una vez que los linfocitos T vírgenes han reconocido el epítipo o análogo de la invención, en el contexto de una molécula HLA clase I particular, se dice que están "activados" y listos para reconocer dicho epítipo en la superficie celular de una célula diana. El contacto entre dichos linfocitos activados (células efectoras) y células diana (que expresan el epítipo, a partir del cual se ha activado el linfocito), conduce a la secreción de moléculas y a la eliminación de las células diana. Si un epítipo o análogo usado para activar los linfocitos conduce a una destrucción eficaz de una célula diana que alberga dicho epítipo por dichos linfocitos activados, dicho epítipo puede considerarse suficientemente inmunogénico para permitir no solamente la reacción *in vitro* sino también *in vivo* de las células T contra las células que expresan dichos epítopos. Las condiciones adecuadas para el reconocimiento células diana/linfocitos son un contacto de 4 horas a 37°C en medio RPMI.

30

La solicitud también describe un proceso para madurar *in vitro* células, y especialmente células presentadoras de antígeno (APC), células B, células T y/o células dendríticas, contra epítopos hTERT restringidos a MHC clase I, particularmente restringidos a HLA-B7. Dicho proceso para madurar *in vitro* células comprende:

35

a. proporcionar células,
b. posibilitar la maduración de dichas células con al menos un epítipo hTERT restringido a MHC clase I, particularmente restringido a HLA-B7 o análogo de epítipo o poliepítipo como se describe en este documento, y
c. opcionalmente, favorecer la expansión de dichas células maduras.

Como se ha descrito anteriormente, la activación de linfocitos requiere la presentación del epítipo por células presentadoras de antígeno maduras. En una realización preferida de la invención, dichas células expresan al menos un alelo HLA-B7. Una de ellas, las células dendríticas (DC), son particularmente eficaces en la presentación de epítopos endógenos restringidos a MHC clase I, a linfocitos T. Uno de los objetivos de la maduración de dichas células es su administración una vez maduras, a un paciente en necesidad de tratamiento. La administración de dichas DC maduras provocaría *in vivo* la activación de los linfocitos del paciente, y la rápida reacción contra la célula que expresa el epítipo (la única, las DC con las que se ha transformado).

En una realización particular, un proceso para madurar *in vitro* células dendríticas comprende:

50

a. proporciona células dendríticas,
b. posibilitar la maduración de dichas células dendríticas con al menos un epítipo hTERT restringido a MHC clase I o análogo de epítipo o poliepítipo como se describe en este documento, y
c. opcionalmente, favorecer la expansión de dichas células dendríticas maduras.

55

En una realización particular, dichas células dendríticas se aíslan de sangre en circulación o células de médula ósea. En otra realización, las células dendríticas se aíslan del paciente en necesidad de tratamiento o de un donante de HLA coincidente, para evitar el rechazo después de la administración a dicho paciente.

La maduración de las DC puede conseguirse por transformación genética de dichas células dendríticas con un polinucleótido de la invención, por transfección de dichas células dendríticas con un vector de la invención o por contacto de dichas células dendríticas con al menos un epítipo, análogo de epítipo o poliepítipo como se describe en este documento. Se prefiere la transformación genética a causa de su eficacia y la expresión permanente del epítipo, análogo o poliepítipo codificado por el polinucleótido insertado en el genoma de la DC.

65

La invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un epítipo hTERT restringido a HLA-B7 para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer. En una realización particular, dicho polinucleótido, para su uso en

la prevención y/o tratamiento del cáncer codifica un epítipo hTERT restringido a HLA-B7 o análogo del mismo. Dicho polinucleótido codifica un epítipo hTERT restringido a HLA-B7, elegido entre el grupo que consiste en:

- a. MPRAPRCRA (p1),
- b. APRCRAVRSL (p4),
- c. APSFRQVSCL (p68),
- d. RPAEEATSL (p277),
- e. RPSFLLSSL (p342),
- f. RPSLTGARRL (p351),
- g. DPRRLVQLL (p444),
- h. FVRACLRRRL (p464),
- i. AGRRMNRKL (p966),
- j. LPGTTLTAL (p1107), y
- k. LPSPKFTIL (p1123).

o el análogo de hTERT restringido a HLA-B7 APRRLVQLL (p444*).

La invención se refiere a un epítipo hTERT HLA-B7, y especialmente a un epítipo restringido a HLA-B0702 para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer. La invención se refiere también a un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora o un polipéptido como se define en el uso de la invención, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer.

La invención también se refiere al uso de un epítipo hTERT HLA-B7, (o polinucleótido correspondiente) para la fabricación de un fármaco para la prevención y/o tratamiento del cáncer. Los epítopos hTERT HLA-B7 particulares (o polinucleótidos correspondientes) son aquellos descritos anteriormente así como vectores, células o composiciones que comprenden o que constan de los mismos. En una realización particular, se pretende el uso del polinucleótido, vector, célula hospedadora o polipéptido definido en el uso de la invención en la fabricación de un fármaco para la prevención y/o tratamiento del cáncer para pacientes que tienen al menos un alelo HLA-B7 como se ha definido anteriormente, y particularmente al menos un alelo HLA-B0702.

Cada definición proporcionada en la memoria descriptiva se aplica a todos y cada uno de los péptidos (epítopos, análogos o polipéptidos) así como a todos y cada uno de los polinucleótidos, tomados individualmente (como tales) o abarcados en un grupo.

Breve descripción de lo dibujos

Figura 1: Gen que codifica la proteína hTERT y secuencia correspondiente de aminoácidos.

La secuencia codificante está localizada entre el nucleótido 56 y 3454. Los codones de inicio y terminación están subrayados. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la correspondiente secuencia de aminoácidos. La tercera línea es la numeración de la secuencia codificante de hTERT, empezando desde el codón de inicio como primer aminoácido.

Figura 2: Los péptidos derivados de hTERT se procesan en ratones transgénicos HLA-B0702.

Se inmunizaron ratones HLA- B7 Tg y ratones vírgenes (N) con 100 µg de ADN codificante de Htert. En el día 14, se estimularon células esplénicas de cada ratón por separado *in vitro* con diferentes péptidos derivados de hTERT. Las células efectoras se ensayaron 6 días después contra dianas RMA-B7 cargadas con péptidos relevantes (■) o de control (□) como se describe en materiales y métodos. Se muestra el porcentaje de lisis a una proporción 60/1 (resultados de dos experimentos independientes).

Figura 3: Inducción de respuesta CTL contra hTERT en PBMC de donantes sanos de sangre.

Se activaron células linfocíticas T de donantes sanos HLA-*B0702⁺ con cada una de las seis PBMC autólogas pulsadas con péptido hTERT como se detalla en materiales y métodos. Después de cuatro rondas de estimulación semanal, se ensayaron las células efectoras, pulsadas con péptidos relevantes (■) o de control (□), para la actividad lítica contra células T2-B7 marcadas con ⁵¹Cr. Se muestra el porcentaje de lisis a una proporción efector-diana de 20/1. Se presentan los resultados de 8 de 10 donantes (d1 a d8).

Figura 4: Efecto de un mAb anti-HLA clase I sobre la citotoxicidad de CTLp351 contra células tumorales.

Se determinó la citotoxicidad de la línea CTLp351 contra las líneas celulares de tumor HLA-*B0702⁺ Mamo y U293T pre-tratadas en ausencia (ninguno) o presencia de mAb contra HLA (mAb anti-HLA clase I o mAb anti-clase II (HLA-DR)) por ensayo convencional de liberación de ⁵¹Cr a una proporción efector-diana de 10/1.

Figura 5: Detección ex-vivo de respuesta de células T específica de hTERT después de inmunización con Lv-hTERT.

A) Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-B7 con partículas recombinantes Trip-hTERT o Trip-GFP de control (1500 ng). Después de 12 días, se detectaron *ex vivo* las células T específicas de péptido hTERT que producían IFN γ de cada ratón por ensayo IFN γ -ELISPOT en células esplénicas frescas. Se calcularon las SFC de IFN γ después de sustraer los valores del control negativo. Se representan los resultados de tres experimentos independientes.

B) Se inmunizaron ratones HHD con Trip-hTERT como se ha descrito anteriormente. Se detectaron *ex vivo* las células T específicas de péptido hTERT que producían IFN γ por ELISPOT como se ha descrito anteriormente. Se representan los resultados de dos experimentos independientes.

Figura 6: Sensibilización de respuestas de células T CD8⁺ específicas en ratones transgénicos HLA-B*0702 después de inmunización con Trip-hTERT

Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-B*0702 con Trip-hTERT (4 primeras barras negras) o control (2 últimas barras verticales con bandas horizontales). Doce días después, se detectaron *ex vivo* las células individuales productoras de IFN- γ dentro en los esplenocitos de cada ratón por ensayo ELISPOT de IFN- γ . Se cultivaron linfocitos purificados en Ficoll de esplenocitos recién aislados de ratones inmunizados individuales directamente con o sin 5 μ g/ml de cada péptido derivado de hTERT restringido a HLA-B*0702 durante 24 h. La cantidad de SFC de IFN- γ específicas se calculó tras sustraer los valores no específicos obtenidos con control sin péptido (< 15 SFC), y las respuestas se consideraron positivas para SFC $\geq$ 30.

Figura 7: Representación esquemática de pTRIP-hTERT

Este vector derivado de lentivirus contiene la secuencia psi, las secuencias cPPT y CTS activa en cis central (Solapa) del genoma de VIH-1 y el promotor CMV que permite la expresión del gen de interés. Además, el dominio U3 está deletado en la LTR 3' (Δ U3).

Figura 8:

A) Respuestas de células T CD8⁺ específicas de hTERT sensibilizadas por inmunización con ADN pTRIP-CMV- Δ hTERT en ratones HHD. Se inmunizaron con ADN ratones HHD (HLA-A2.1 Tg) con un ADN que codificaba una forma no funcional de hTERT (pTRIP-CMV- Δ hTERT). Diez días después, se detectaron *ex vivo* las células T específicas de péptido productoras de IFN- γ por ensayo IFN- γ -ELISPOT. Se cultivaron linfocitos purificados en Ficoll de esplenocitos de ratones inmunizados individuales directamente durante 24 h, con o sin 5 μ g/ml de cada péptido derivado de hTERT restringido a HLA-A2.1. La cantidad de SFC de INF- γ específicas se calculó como se ha descrito anteriormente. Las respuestas se consideraron positivas para SFC $\geq$ 30.

B) Inducción de cortas respuestas CTL en ratones HHD después de inmunización con pTRIP-CMV- Δ hTERT. Se inmunizaron ratones HHD con un ADN que codificaba una forma no funcional de hTERT (pTRIP-CMV- Δ hTERT) durante 10 días. Las células esplénicas de ratones individuales se volvieron a estimular *in vitro* con los péptidos p540 y pY572 derivados de hTERT restringidos a HLA-A2.1 durante 6 días. Las células efectoras se ensayaron en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr frente a células EL4 transfectadas con HHD cargadas con el péptido relevante o el péptido irrelevante.

Figura 9: Secuencia de una proteína hTERT no funcional (deleción de los aminoácidos 867 a 869)

La secuencia codificante está localizada entre el nucleótido 59 y 3348. Los codones de inicio y terminación están subrayados. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la correspondiente secuencia de aminoácidos. La tercera línea es la numeración de la secuencia codificante de hTERT, empezando desde el codón de inicio como primer aminoácido.

Figura 10: Secuencia de una proteína hTERT no funcional (deleción de los aminoácidos 864 a 872)

La secuencia codificante está localizada entre el nucleótido 59 y 3430. Los codones de inicio y terminación están subrayados. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la correspondiente secuencia de aminoácidos. La tercera línea es la numeración de la secuencia codificante de hTERT, empezando desde el codón de inicio como primer aminoácido.

Ejemplos

I- Materiales y métodos

Donantes de sangre

- Se obtuvieron muestras de sangre periférica tras el consentimiento informado por escrito de donantes sanos adultos de plaquetas (centro de transfusión de sangre del hospital Mondor, Créteil, Francia). El tipificado del HLA de los donantes de sangre periférica se realizó en el laboratorio de HLA del H. Mondor. Hospital Creteil (Francia). El estudio fue aprobado por el Instituto Francés de Banco de Sangre.

Ratones

- A ratones transgénicos HLA-*B0702 (Tg), que expresan una construcción quimérica HLA-B0702 α 1 α 2, H2-Kd α 3, en combinación con la molécula constitutiva murina β 2-m (HLA-B7^{m α 3}) y a ratones transgénicos HHD que expresan una molécula HLA-A2.1/H2-Db quimérica, se les delecionaron sus genes H2-Db y H2-k^b como se ha descrito previamente (Pascolo et al. J Exp Med 1997; 185: 2043-51; Rohrlisch et al. Int Immunol 2003; 15: 765-72). Estos ratones son de origen C57BU6 y se cruzaron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos en nuestra instalación animal.

Líneas celulares de tumor

- El híbrido T-B T1, la célula B JY transformada con EBV, la línea celular de cáncer renal U293T y la línea celular de linfoma de Burkitt Raji procedían de la American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas celulares de melanoma (SK23MEL, LB34, y KUL68) las proporcionó amablemente P. Coulie (Bruselas, Bélgica) y las células B transformadas con EBV BBG.1 y BC3 las proporcionó amablemente H. Collandre (R.A.H.P., Grenoble, Francia).

- Las células T2 deficientes en TAP transfectadas con HLA-*B0702 (T2-B7) las proporcionó amablemente P. Cresswell (Smith et al. J Immunol 1996; 156: 3755-64). Las líneas celulares de linfoma murino RMA, y EL4 procedían de la ATCC; estas células también estaban transfectadas con el gen HLA-*B0702 y se usaron como células diana

Selección de epítipo Síntesis de péptidos

- Se usó el algoritmo predictivo "SYFPEITHI" (Lu y Celis E Cancer Res 2000; 60:5223-7) para analizar la secuencia de aminoácidos de hTERT para la existencia de péptidos de 9 aminoácidos (nonámero) o 10 aminoácidos (decámero), de unión prevista a HLA-*B0702. Se seleccionaron péptidos candidatos que contenían anclajes de unión canónica a HLA-B7, Pro en la posición 2 y aminoácidos alifáticos hidrófobos (Ala o Leu) en los extremos carboxilo, y de acuerdo con su mayor valor predictivo. Se retuvieron y sintetizaron seis péptidos, tres péptidos de 9 aminoácidos llamados p1, (MPRAPRCRA, restos 1-9), p277 (RPAEEATSL, restos 277-285) y p342 (RPSFLLSSL, restos 342-350), y tres péptidos de 10 aminoácidos, p4 (APRCRAVRSL, restos 4-13) p68, (APSFQRQVSC, restos 68-77), y p351 (RPSLTGARRL, restos 351-360) (las posiciones de anclaje están subrayadas).
- Se sintetizaron péptidos derivados de pp65 de citomegalovirus humano, RPHERNGFTV (R10TV), e IPRRIRQGL del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y se usaron como péptidos de control. El péptido derivado del núcleo 128-140 (TPPATRPPNAPIL) del virus de la hepatitis B se usó como péptido auxiliar para la inmunización con péptidos en ratones. Los péptidos se adquirieron de PRIM a una pureza mínima del 80% y se reconstituyeron en agua destilada o DMSO a una concentración de 2 mg/ml.

Ensayo de unión/estabilización de HLA-B0702

- La avidéz relativa de los péptidos derivados de hTERT por HLA-*B0702 se midió usando un ensayo de estabilización de MHC sobre células T2 transfectadas con HLAB0702 (T2-B7) en comparación con un péptido de referencia (R10TV) como se ha descrito (Rohrlisch et al. Int Immunol 2003; 15:765-72). En resumen, se incubaron T2-B7 durante una noche a 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio sin suero AIM-V (Invitrogen Corp., Gibco), suplementado con 100 ng/ml de β 2-microglobulina humana, en ausencia (control negativo) o en presencia del péptido de referencia R10V o péptidos hTERT a diversas concentraciones finales (100, 10, 1 y 0,1 μ M). Las células T2-B7 se marcaron con una concentración de saturación de ME.1, un mAAb anti-HLA-B7, después se lavaron dos veces y finalmente se tiñeron con F(ab')₂ de cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC antes de la citometría de flujo.

- Los resultados se expresan como valores de avidéz relativa, que es la proporción de concentración de péptido de ensayo necesaria para alcanzar el 20% de la unión máxima (obtenida con el péptido de referencia) sobre la concentración del péptido de referencia. Por lo tanto, cuanto menor sea el valor, más fuerte será la unión.

Inmunización con péptido de ratones transgénicos HLA-*B0702 para inducción de CTL

- A ratones transgénicos HLA-*B0702 hembra de 8-10 semanas de edad se les inyectó por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola 50 μ g de individual péptidos hTERT restringidos a HLA-B0702 suplementados con 140 μ g de

péptido auxiliar co-emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco, Detroit, MI). Diez días después, se reactivaron las células esplénicas de los ratones individuales *in vitro* con péptido relevante en placa de seis pocillos. Las células CTL efectoras se ensayaron en un ensayo convencional de liberación de ^{51}Cr de 4-5 h, usando células RMA transfectadas con HLA-*B0702 (RMA-B7) pulsadas con péptido relevante o de control negativo. Los ratones se consideraron respondedores cuando se observó lisis específica $\geq 10\%$.

Inmunización con ADN en ratones transgénicos HLA-*B0702

Se purificó el vector plasmídico LvCMV-hTERT que codifica el gen hTERT bajo el control del promotor CMV en columnas plasmid Giga kit en condiciones libres de endotoxinas (Qiagen). A ratones transgénicos HLA-*B0702 anestesiados se les inyectó dicho plásmido (50 μg cada lado) en los músculos tibialis anterior en regeneración. Catorce días después, se reactivaron las células esplénicas de los ratones individuales *in vitro* con LPS-linfoblasto singénico con irradiación γ (50 Gy), pulsado con péptido (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en medio completo, suplementado con un 10% de sobrenadante de células esplénicas de rata activadas por Con A. Se realizaron ensayos de citotoxicidad 6 días como se ha descrito.

Construcción y producción de vector lentiviral

La construcción pTRIP-deltaU3-CMV-hTERT (mencionada como TRIPLv-hTERT o Lv-hTERT o pTrip-hTERT) (Figura 7) se creó subclonando primero un inserto EcoRI-Sall de hTERT derivado del plásmido pBABE-hygro-hTERT (Counter et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998; 95: 14723-8) en el vector pSP73 (Promega). Después se insertó un fragmento BglII-Sall en el plásmido pTRIP-CMV cortado con BamH1 y XhoI. Se produjeron partículas retrovirales recombinantes pseudo tipadas por transfección transitoria (48 h) de células 293T como se ha descrito (Zennou et al. Cell 2000; 14; 101: 173; Firat et al. J Gene Med 2002; 4: 38-45). Las partículas retrovirales recombinantes se concentraron por ultra-centrifugación y se resuspendieron en PBS. La cantidad de partículas vectoriales se estimó a partir de la de proteína p24 en un ensayo ELISA disponible en el mercado (NEN, DUPONT, France Perkin Elmer).

El vector pTRIP-CMV- Δ hTERT, depositado en la CNM (Institut Pasteur, París, Francia) con el número CNM I-3660 el 28 de julio de 2006, se realizó como se ha descrito en el párrafo anterior. Sin embargo, la proteína hTERT se volvió no funcional por delección de los aminoácidos 867 a 869, correspondientes a los nucleótidos 2654 a 2662 de la Figura 1 (tipo silvestre). El mutante de RT hTERT catalíticamente muerto (Δ hTERT) se generó creando una delección de los restos aminoacídicos 867 a 869 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL (Stratagene) y se verificó por secuenciación.

Inmunización en ratones transgénicos para MHC clase I y detección de CTL

La inmunización con TRIPLv-hTERT se realizó como una única inyección subcutánea (en la base de la cola) de 1500 ng de suspensión de TripLv-hTERT o vector de control.

La inmunización se realizó en ratones transgénicos HLA.A2 como una única inyección intraperitoneal de partículas lentivirales recombinantes, pTRIP-CMV- Δ hTERT o Trip-GFP como control, equivalente a 1500 ng de antígeno p24 en 500 μl de PBS.

Doce días depuse, se detectaron células T específicas de péptido hTERT entre los esplenocitos mediante un ensayo ELISPOT (véase a continuación). Se realizaron ensayos de citotoxicidad en las mismas poblaciones de esplenocitos inmunes después de estimulación *in vitro* con pulsación con péptido como se ha descrito anteriormente.

Evaluación de la respuesta de células T por ensayo ELISPOT de IFN- γ ex vivo

Se detectaron células T específicas de péptido de ratones inmunizados por ensayo ELISPOT de IFN- γ como se ha descrito previamente (Miyahira et al. J Immunol Methods 1995; 181: 45- 54). Se depositaron mAb anti-IFN- γ de ratón (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Pharmigen, Becton Dickinson biosciences) sobre microplacas de nitrocelulosa de 96 pocillos (multi screen; Millipore corp, Molsheim, Francia). Después de la lisis de los glóbulos rojos, se cultivaron los linfocitos de bazo recién aislado de un ratón individual (5×10^5 , $2,5 \times 10^5$ y $1,25 \times 10^5$ células/pocillo) directamente con o sin 5 μg de péptido hTERT nativo durante 18 h a 37°C . Después de los lavados, las placas se incubaron 2 horas con anticuerpo biotinilado anti-IFN- γ de ratón (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Pharmigen, Becton Dickinson biosciences). Finalmente, las placas se lavaron y se incubaron a 37°C durante 1 h con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (Roche molecular biochemicals, Mannheim, Alemania). Los controles positivos incluyen células estimuladas con miristato acetato de forbol (100 ng/ml, Sigma) e ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células formadoras de manchas (SFC) de IFN γ se revelaron añadiendo sustratos de peroxidasa (BCIP/NBT, Promega Corp, Madison W; EEUU) y se contaron usando el sistema automatizado de análisis de imágenes Bioreader 2000 (Biosys, Karben, Alemania). La cantidad de SFC específicas se calculó tras sustraer los valores de control negativo (< 10 SFC). Las respuestas fueron

positivas si la media de las SFC en el pocillo estimulado era mayor de la media + 2 S.D. de las SFC en los pocillos de control negativo y mayor de 50 SFC/10⁶ células.

Ensayo citolítico

Se realizaron ensayos de citotoxicidad usando el ensayo convencional de liberación de ⁵¹Cr de 4-5 h como se ha descrito previamente (Firat et al. J Gene Med 2002; 4:38-45). La lisis específica en % se calculó sustrayendo la lisis no específica observada con el péptido de control. Los ratones se consideraron respondedores cuando se observaba lisis específica ≥ 10%.

Generación de CTL específicos de péptido hTERT en seres humanos

Se obtuvieron los CTL humanos de donantes después de reactivar *in vitro* las PBMC durante 4 semanas con péptido hTERT restringido a HLA-B0702 como se ha descrito previamente (Hernandez et al. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2002; 99:12275-80). En resumen, Se descongelaron PBMC humanas purificadas en Ficoll y se incubaron (4 x 10⁶/pocillo) en placas de 24 pocillos en RPMI 1640, piruvato sódico 1 mM, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, HEPES 10 mM, 5x 10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol suplementado con suero humano al 10% inactivado con calor (Institut Jacques Boy, Reims, Francia). Se estimularon con cada péptido hTERT (10 µg/ml) y se añadió IL-7 humana recombinante (20 ng/ml; R&D Systems).

En el día 7, se reactivaron los linfocitos con PBMC autólogas irradiadas con γ pulsadas con péptido (50 Gy). El siguiente día, se añadieron 20 UI/ml de IL-2 humana (Roche, Mannheim, Alemania) al cultivo. Las líneas de CTL se reactivaron semanalmente durante cuatro ciclos. Para algunos donantes, se purificaron células T CD8⁺ después del ciclo de la tercera ronda, usando micropelotas CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se activaron una vez antes del ensayo funcional. Los ensayos citolíticos se realizaron 6 días después de la última reactivación contra diversas dianas marcadas con ⁵¹Cr: T2-B7 pulsadas con péptidos hTERT de ensayos o péptido irrelevante, o líneas celulares de tumor.

En algunos experimentos, se incubaron células tumorales con un mAAb de región flanqueante anti-HLA clase I, w6/32 (BD Pharmingen) o mAAb anti-HLA-*B0702, ME.1, o un mAAb anti-HLA-DR, G46.6 (BD Pharmingen) a una concentración óptima (10 µg/ml) durante 30 minutos para determinar si la citotoxicidad estaba restringida a HLA clase I.

II- Resultados

1. Inmunogenicidad de péptidos HLA-*B-0702 predichos derivados de hTERT.

Usando un programa de predicción de epítomos de células T, se analizó la secuencia de la proteína hTERT y se retiraron seis péptidos (3 noámeros y 3 decámeros) debido a su alto valor predictivo (Tabla I). A continuación se analizó su capacidad de unirse a la molécula HLA-B0702 usando células T2 deficientes en el transportador de antígeno (TAP) transfectadas con el gen HLA-B0702 (T2- B7). Tres péptidos, p1, p4 y p68 respectivamente muestran una elevada afinidad relativa (RA ≤ 1) y los otros tres, p277, p342 y p351 mostraron una RA media > 1 (Tabla I). Estos datos indican que estos seis péptidos son excelentes agentes de unión a HLA-B0702. Por lo tanto, se podría esperar que dichos complejos, formados en el retículo endoplasmático, alcanzaran la superficie de las células tumorales y estuvieran disponibles para el reconocimiento por CTL.

Para ensayar si estos péptidos son inmunogénicos *in vivo*, se han inmunizado ratones transgénicos HLA-*B0702. Los seis péptidos ensayados demostraron ser capaces de inducir respuestas CTL, aunque se apreciaron diferencias (Tabla I). Dos péptidos, p4 y p68, que se unen con una alta afinidad a las moléculas HLA-B7, inducen una fuerte respuesta CTL en todos los ratones ensayados. En contraste, los péptidos (p277 y p342) que tienen inferior afinidad por las moléculas HLA-B7, posibilitan la generación de CTL específicos moderados, en solamente el 50% de los ratones ensayados. Las líneas CTL específicas para epítomos hTERT, generadas a partir de ratones transgénicos, reconocían T2-B7 humanas pulsadas con sus respectivos péptidos específicos (datos no mostrados), lo que demuestra la alta afinidad de su TCR por el complejo MHC/péptido. Por tanto, existe una correlación global entre los resultados de unión/estabilización de HLAB0702 y la respuesta CTL *in vivo* en ratones transgénicos HLA-B7.

Tabla 1: Inmunogenicidad de péptidos hTERT seleccionados de unión a HLA-*B0702

Péptido*	Secuencia	Valor§	Avidéz relativa†	Inmunogenicidad‡	
				R/T**	Lisis específica (%)
p1	MPRAPRCRA	23	0,4	4/6	30, 39, 35, 28
p4	APRCRAVRSLS	25	0,3	6/6	52, 53, 48, 51, 46, 49
p68	APSFQRQVSL	25	0,4	6/6	63, 78, 75, 69, 70, 72
p277	RPAEEATSL	23	4,7	3/6	29, 33, 29

p342	RPSFLLSSL	23	2,5	3/6	26, 39, 32,
p351	RPSLTGARRL	23	1,5	4/6	47, 31, 37, 26

* El valor representa el primer aminoácido del péptido. Por lo tanto, "p4" indica que el resto de alanina es el cuarto aminoácido de la secuencia codificante.

§. Valor del algoritmo obtenido usando el sistema predictivo SYFPEITHI

†. La avidéz relativa de los péptidos hTERT por HLA-B*0702 se midió usando un ensayo de estabilización de MHC en comparación con un péptido de referencia como se detalla en materiales y métodos.

‡. Los ratones transgénicos HLA-B*0702 se inmunizaron con péptidos candidatos (seis ratones para cada péptido) como se ha detallado anteriormente. Diez días después, se volvieron a estimular las células esplénicas de los ratones individuales *in vitro* con cada péptido hTERT. Las actividades citolíticas se ensayaron por ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4-5 h usando células diana RMA-B7 cargadas con péptido. La lisis específica se calculó sustrayendo la lisis no específica observada con el péptido de control R10TV. Se mostró lisis específica a una proporción efector/diana de 75:1. ** R/T: ratones respondedores (lisis específica ≥ 10%) frente a ensayados.

2. Péptidos derivados de hTERT se procesaban en ratones transgénicos HLA-B0702.

- Para evaluar la presentación de péptidos hTERT sintetizados de forma endógena en el contexto de la molécula HLA-B0702 contra estos seis epítomos hTERT identificados, se inmunizaron ratones transgénicos HLA-B*0702 con ADNc que codificaba hTERT, cuarenta días después de evaluar las respuestas CTL específicas de péptido en las células esplénicas de ratones individuales. Como se muestra en la Figura 2, se indujeron CTL específicos de péptido hTERT en la mayoría de los ratones inmunizados (M), del 50 al 80% de los ratones para p4, p68, p1, p277 y p351. En contraste, pueden inducirse CTL específicos de p342 en aproximadamente el 15% de los ratones ensayados. También se indujeron respuestas CTL no significativas específicas de hTERT en ratones vírgenes no inmunizados. Por tanto, estos seis epítomos hTERT se procesan eficazmente de forma intracelular. Además, se presentan péptidos naturales similares en términos de secuencia de aminoácidos o estructura a los sintéticos, por las correspondientes moléculas HLA-B*0702 en la superficie celular.
- Además, estos datos muestran que puede inducirse especificidad múltiple de CTL de forma simultánea contra varios epítomos hTERT en un único ratón y validan nuestro modelo de ratón transgénico HLA-clase I para su potencial en el ensayo de vacunas candidatas.

3. Inducción de respuestas CTL primarias de donantes sanos por péptidos hTERT.

- Se estudió si los péptidos hTERT serían eficaces para provocar CTL restringidos a HLA-B7, usando PBMC de donantes sanos HLA-B0702 en un protocolo de inmunización *in vitro*. Se generaron respuestas CTL en ocho de diez individuos (d₁ a d₈), y se obtuvieron respuestas CTL específicas de péptido en al menos el 50% de los donantes, excepto para p342 (20%) (Figura 3). El reconocimiento del epítomo hTERT por CTL generados *in vitro* varía entre los donantes, dependiendo de su fondo genético (Figura 3). Por lo tanto, por ensayo aleatorio de donantes sanos HLA-B0702, se estableció claramente que estos péptidos hTERT son inmunogénicos en seres humanos, lo que implica que no se delecionan precursores CTL específicos para hTERT en el repertorio adulto periférico. Por lo tanto, nos preguntamos si las líneas CTL generadas a partir de donantes sanos serían capaces de eliminar células tumorales hTERT⁺ de HLA coincidente.

4. Los CTL específicos para hTERT fueron capaces de lisar tumores de diferentes orígenes

- Se ensayaron CTL específicos para hTERT de donantes para su capacidad de lisar líneas celulares de tumor humano de diferentes orígenes. Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran que las líneas CTL generadas *in vitro* a partir de donantes sanos eliminaban células tumorales HLA-B0702⁺, mientras que no se detectaba citotoxicidad contra tumores HLA-B0702⁻. (Véase, por ejemplo, CTLp351 en d₁, d₂ y d₃ en la diana KU L268 o 293-UT (respectivamente 52, 25, 20 y 34, 41 y 19%) frente a la diana T1 o BBG1 (respectivamente 9, 2, 6 y 0, 0, 2%.)) Se observaron diferencias en el reconocimiento de tumores de acuerdo con la especificidad de CTL; esto podría explicarse por una presentación diferencial de péptidos hTERT en la superficie de las células tumorales. De forma importante, las líneas CTL específicas de p351 generadas de diferentes donantes reconocen la mayoría de las líneas celulares de tumor ensayadas (Tabla 2). En contraste, ninguna de las líneas CTL específicas para p4 lisa ninguno de los tipos de tumor ensayados. Las líneas CTL, específicas para los péptidos p1 y p68, solamente reconocen las dianas T1-B7. Las líneas CTL específicas para p342 reconocen solamente células de melanoma (diana LB 34 y KU 268). Finalmente, las líneas CTL específicas para p277 reconocen cáncer renal (293 UT) pero ninguna célula de melanoma ni de tumor linfóide. Por otro lado, las PBMC normales y las células B activadas por CD40 no se lisaron por estas líneas CTL específicas de péptido hTERT, independientemente del tipo HLA (las dos últimas líneas de la Tabla 2).

- Como se muestra en la Figura 4, la actividad citotóxica de la línea CTLp351 hacia células tumorales HLA-B7⁺ está inhibida por un mAb anti-clase I anti-HLA-B0702, pero no por un mAb anti-HLADR (MHC clase II). Se obtuvieron datos similares con otras líneas CTL específicas de péptido (datos no mostrados) y sugieren que las líneas CTL ejercen citotoxicidad contra células tumorales hTERT⁺ de un modo restringido a HLA-B0702. De forma colectiva,

estos resultados muestran que estos seis péptidos derivados de hTERT no se expresan equitativamente de forma natural en la superficie de células tumorales y que los CTL específicos de péptido hTERT pueden discriminar entre células tumorales y células normales, a través del reconocimiento del péptido hTERT en el contexto de moléculas HLA-B0702.

5. La vacunación con vector lentiviral que codifica hTERT induce respuestas eficaces de células T específicas de péptido en ratones.

A continuación se ensayaron vacunas candidatas, que comprenden un gen hTERT de longitud completa o un gen hTERT no funcional, insertado en un vector de ADN solapa derivado de VIH (Figura 7). Los datos previos han demostrado que vectores lentivirales de este tipo abordan células dendríticas *in vitro* e *in vivo*, e inducen fuertes respuestas CTL anti-tumorales poli-específicas en animales. Por lo tanto, se inmunizaron ratones transgénicos HLA-*B0702 con Lv-hTERT recombinante o con pTRIP-CMV-ΔhTERT. Doce días después, se evaluaron las células esplénicas de los ratones individuales mediante un ensayo ELISPOT *ex vivo*.

Como se muestra en la figura 5A, se obtuvieron respuestas de células T CD8⁺ específicas de péptido contra epítomos hTERT restringidos a HLA-B0702, en comparación con ratones que recibieron vector de control Lv-GFP. El análisis funcional de las células CD8⁺ específicas de péptido inducidas en ensayo de liberación de cromo después de estimulación *in vitro* confirmó los datos de ELISPOT *ex vivo* (Tabla 3) y demuestra que se genera una respuesta CTL específica y eficaz contra estos seis péptidos en aproximadamente el 50-70% de los ratones después de una única inyección de Lv-hTERT y en el 100% de los ratones después de un refuerzo con TRIPLv-hTERT (figura 6). Esto también se asoció con fuertes respuestas CTL responses en todos los ratones (Tabla 3). Además, como se muestra en la Tabla 3, la inmunización de ratones HHD transgénicos para HLA-A2.1 con el mismo vector indujo potentes respuestas CTL específicas para dos epítomos restringidos a HLA-A2.1.1 previamente clasificados como dominante (p540) y críptico (p572). Colectivamente, estos resultados demuestran claramente que la administración de Lv-hTERT provoca la inducción de respuestas de células T multi-específicas muy eficaces en ratones, apoyando que hTERT podría servir como poliepítopo y TAA polialélico para inmunoterapia contra el cáncer.

Como se muestra en la Figura 8, se detectaron respuestas de células T CD8⁺ específicas de péptido hTERT *ex vivo* en ratones transgénicos HLA-A2 (Tg) después de una única inyección de pTRIP-CMV-ΔhTERT recombinante. Se demostró que se inducían células T CD8⁺ específicas para los epítomos p540 y PY572 al menos en el 50% de los ratones inmunizados (Figura 8). Estos resultados demuestran claramente que se procesaban correctamente de forma endógena dos epítomos y se presentaban en ratones HLA-A2 Tg después de inmunización con pTRIP-CMV-ΔhTERT.

Colectivamente, estos resultados demostraron que una única inyección de TRIP-hTERT provocaba la inducción de una potente respuesta de células T CD8⁺ anti-hTERT multi-específica en ambos grupos de ratones transgénicos HLA.

Tabla 2: Los CTL anti-hTERT de donantes normales lisan células tumorales de diversos tipos

Diana celular	Tipo celular	HLA-B7	Porcentaje de lisis*																	
			CTL p1			CTL p4			CTL p68			CTL p277			CTL p342			CTL p351		
			d1	d6	d8	d1	d6	d8	d1	d6	d8	d1	d6	d8	d1	d6	d8	d1	d6	d8
T1	Híbrido T-B	-	9	10	5	8	6	nd	0	7	6	3	5	9	3	6	4	9	2	6
T1-B7	Híbrido T-B	+	29	26	14	5	7	nd	19	30	4	56	30	12	2	17	5	38	24	31
Sk23mel	Melanoma	-	0	1	0	0	2	0	10	3	4	1	4	0	4	4	3	5	2	1
LB34	Melanoma	+	5	4	0	0	4	2	13	7	11	0	0	2	28	22	14	52	25	20
KUL68	Melanoma	+	9	4	7	6	3	0	0	nd	0	7	4	nd	26	14	9	34	41	19
293-JT	Célula renal	+	2	8	4	1	6	7	3	0	0	36	17	22	9	17	4	28	22	25
BBG1	Célula EBV-B	-	0	4	3	0	0	2	2	0	1	0	0	5	1	1	0	0	0	2
JY	Célula EBV-B	+	2	0	4	0	6	nd	0	0	9	3	0	1	8	10	6	27	18	15
Raji	Linfoma B	-	4	1	nd	5	0	nd	0	0	nd	6	nd	1	0	nd	0	4	0	nd
PBMC autóloga	Célula normal	+	0	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	1
Célula B autóloga CD40§	Célula normal	+	0	0	0	3	0	2	2	0	0	0	0	6	0	2	3	0	0	4

*. Las líneas CTL específicas de péptido hTERT (CTLp1, CTLp4, CTLp68, CTLp277, CTLp342, CTLp351) se obtuvieron de donantes sanos que eran respondedores después de posterior inmunización *in vitro* como se ha descrito en materiales y métodos. La citotoxicidad se midió en un ensayo convencional de liberación de marcaje con ⁵¹Cr. Lisis específica: se muestra para una proporción efector:diana de 30:1 §. Los linfocitos B autólogos de donantes normales se activaron durante 48 h con un CD40 L trimérico (40 µg/ml).

Tabla 3: Inducción de respuestas CTL después de inmunización con Lv-hTERT

Inmunización con ADN solapa + Lv-hTERT					
Ratones HLA-B7 Tg			Ratones HHD		
Péptido de re-estimulación	R/T	Lisis específica (%)	Péptido de re-estimulación	R/T	Lisis específica (%)
p1	4/8	27, 30, 29, 32	P540	2/6	21, 18
p4	6/8	18, 25, 54, 33, 16	pY572	5/6	22, 19, 14, 35, 24
p68	4/8	15, 64, 24, 16,			
p277	5/8	21, 25, 23, 52, 33			
p342	4/8	18, 24, 20, 37			
p351	5/8	17, 20, 18, 36, 19			

III- Conclusión

- 5 Se han identificado nuevos epítomos hTERT, que son inmunogénicos *in vivo* y se procesan en ratones transgénicos HLA-B0702 knockout para H-2-clase I. Además, *in vitro*, la inmunización con péptido hTERT usando PBL HLA-B702⁺ de donantes sanos induce respuestas CTL específicas que reconocen tumores hTERT⁺ de diversos orígenes, lo que implica que no hay deleción en el repertorio de células T humanas para estos epítomos. Además, se demostró que dependiendo de los orígenes de los tumores, el repertorio de péptidos expresado en la superficie celular podría ser cualitativamente diferente, subrayando la utilidad de caracterizar hTERT como poliepítomo de antígenos asociados a tumor para esquivar la variabilidad antigénica de las células cancerosas. Finalmente, se usaron ratones transgénicos HLA-*B0702 y HLA-A2 1 humanizados, para ensayar una vacuna candidata que consta de un gen de telomerasa no funcional insertado en una nueva generación de vectores de ADN solapa derivados de lentivirus. Se observaron fuertes respuestas de células T CD8⁺ específicas de hTERT en todos los ratones transgénicos para HLA. Estos datos apoyan el uso para vacunación terapéutica en pacientes con cáncer y extiende la aplicabilidad potencial de hTERT como diana terapéutica para cubrir una gran población de paciente con cáncer.

Bibliografía

- 20 Schroers R, Huang XF, Hammer J, Zhang J, Chen SY Identification of HLA DR7- restricted epitopes from human telomerase reverse transcriptase recognized by CD4⁺ T- helper cells. Cancer Res. 1 de mayo de 2002; 62 (9): 2600-5.
- 25 Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8⁺ T lymphocytes. Clin Cancer Res. 1 de febrero de 2004; 10 (3) : 828- 39.
- 30 Gross DA, Graff- Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur- Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K. High vaccination efficiency of low- affinity epitopes in antitumor immunotherapy. J Clin Invest. Feb 2004; 113 (3): 425- 33.
- 35 Scardino A, Gross DA, Alves P, Schultze JL, Graff- Dubois S, Faure O, Tourdot S, Chouaib S, Nadler LM, Lemonnier FA, Vonderheide RH, Cardoso AA, Kosmatopoulos K. HER- 2/neu and hTERT cryptic epitopes as novel targets for broad spectrum tumor immunotherapy. J Immunol. 1 de junio de 2002; 168 (11): 5900- 6.
- 40 Vonderheide RH, Schultze JL, Anderson KS, Maecker B, Butler MO, Xia Z, Kuroda MJ, von Bergwelt- Baildon MS, Bedor MM, Hoar KM, Schnipper DR, Brooks MW, Letvin NL, 'Stephans KF, Wucherpfennig KW, Hahn WC, Nadler LM. Equivalent induction of telomerase- specific cytotoxic T lymphocytes from tumor- bearing patients and healthy individuals. Cancer Res. 1 de diciembre de 2001; 61 (23): 8366- 70.
- 45 Vonderheide RH, Anderson KS, Hahn WC, Butler MO, Schultze JL, Nadler LM. Characterization of HLA- A3- restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. Clin Cancer Res. Nov 2001; 7 (11): 3343- 8.
- 50 Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor- associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. Immunity. Jun 1999; 10 (6): 673- 9.
- 55 Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade- Demoyen P, Zanetti M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 25 de abril de 2000; 97 (9): 4796- 801.
- Hernandez J, Garcia- Pons F, Lone YC, Firat H, Schmidt JD, Langlade- Demoyen P, Zanetti M. Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 de septiembre de 2002; 99 (19): 12275- 80. Epub 6 de septiembre de 2002.

Arai J, Yasukawa M, Ohminami H, Kakimoto M, Hasegawa A, Fujita S. Identification of human telomerase reverse transcriptase- derived peptides that induce HLA- A24- restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1 de mayo de 2001; 97 (9): 2903- 7.

5 Rohrich PS, Cardinaud S, Lule J, Montero- Julian FA, Prodhomme V, Firat H, Davignon JL, Perret E, Monseaux S, Necker A, Michelson S, Lemonnier FA, Charneau P, Davrinche C. Use of a lentiviral vector encoding a HCMV- chimeric IE1- pp65 protein for epitope identification in HLA- Transgenic mice and for ex vivo stimulation and expansion of CD8 (+) cytotoxic T cells from human peripheral blood cells. *Hum Immunol*. May 2004; 65 (5): 514- 22.

10 Firat H, Zennou V, Garcia- Pons F, Ginhoux F, Cochet M, Danos O, Lemonnier FA, Langlade- Demoyen P, Charneau P. Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. *Perspectives for immunotherapy. J Gene Med*. Ene-Feb 2002; 4 (1): 38- 45.

15 Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, Lienard D, Cerottini JC, Romero P, Levy F, Speiser DE, Valmori D. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540- 548- specific CD8 (+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol*. Sep 2001; 31 (9): 2642- 51.

20 Esslinger C, Chapatte L, Finke D, Miconnet I, Guillaume P, Levy F, MacDonald HR. In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8 (+) T cell responses. *J Clin Invest*. Jun 2003; 111 (11): 1673- 81.

Esslinger C, Romero P, MacDonald HR. Efficient transduction of dendritic cells and induction of a T- cell response by third- generation lentivectors. *Hum Gene Ther*. 10 de junio de 2002; 13 (9): 1091- 100.

25 Parkhurst MR, Riley JP, Igarashi T, Li Y, Robbins PF, Rosenberg SA. Immunization of patients with the hTERT: 540- 548 peptide induces peptide- reactive T lymphocytes that do not recognize tumors endogenously expressing telomerase. *Clin Cancer Res*. 15 de Julio de 2004; 10 (14): 4688- 98.

30 Firat H, Garcia- Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung G, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade- Demoyen P. H- 2 class I knockout, HLA- A2.1- transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol*. Oct 1999; 29 (10): 3112- 21.

35 Frolkis M, Fischer MB, Wang Z, Lebkowski JS, Chiu CP, Majumdar AS. Dendritic cells reconstituted with human telomerase gene induce potent cytotoxic T- cell response against different types of tumors. *Cancer Gene Ther*. Mar 2003; 10 (3): 239- 49.

40 Vonderheide RH. Telomerase as a universal tumor- associated antigen for cancer immunotherapy. *Oncogene*. 21 de enero de 2002; 21 (4) : 674- 9. Revisión.

Sun B, Huang Q, Liu S, Chen M, Hawks CL, Wang L, Zhang C, Hornsby PJ. Progressive loss of malignant behavior in telomerase- negative tumorigenic adrenocortical cells and restoration of tumorigenicity by human telomerase reverse transcriptase. *Cancer Res*. 1 de septiembre de 2004; 64 (17): 6144- 51.

45 Tajima K, Ito Y, Demachi A, Nishida K, Akatsuka Y, Tsujimura K, Hida T, Morishima Y, Kuwano H, Mitsudomi T, Takahashi T, Kuzushima K. Interferon- gamma differentially regulates susceptibility of lung cancer cells to telomerase- specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer*. 20 de junio de 2004; 110 (3): 403- 12.

50 Su Z, Vieweg J, Weizer AZ, Dahm P, Yancey D, Turaga V, Higgins J, Boczkowski D, Gilboa E, Dannull J. Enhanced induction of telomerase- specific CD4 (+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. *Cancer Res*. 1 de septiembre de 2002; 62 (17): 5041- 8.

55 Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T- cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res*. 15 de abril de 2001; 61 (8): 3388- 93.

Breckpot K, Dullaers M, Bonehill A, van Meirvenne S, Heirman C, de Greef C, van der Bruggen P, Thielemans K. Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med*. Ago 2003; 5 (8): 654- 67.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE)

65 <120> POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN EPÍTOPOS DE HTERT RESTRINGIDOS AL MHC DE

CLASE 1, ANÁLOGOS DE LOS MISMOS O POLIEPÍTOPOS

<130> B6273A-AD/LV/SDU (PASTEUR & INSERM)

5 <140> PCT/IB2006/XXXXXX
<141> 31-07-2006

<150> EP05291627.7
<151> 29-07-2005

10 <160> 41

<170> PatentIn versión 3.3
15 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> hTERT

<400> 1

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu
1 5

25 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> hTERT

<400> 2

Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser
1 5

<210> 3
40 <211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
45 <223> hTERT

<400> 3

Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys
1 5

50 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

55 <220>
<223> hTERT

<400> 4

ES 2 440 768 T3

		Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu
		1 5
5		<210> 5 <211> 9 <212> PRT <213> artificial
10		<220> <223> hTERT <400> 5
		Val Tyr Gly Phe Val Arg Ala Cys Leu
		1 5
15		<210> 6 <211> 9 <212> PRT <213> artificial
20		<220> <223> polipéptido p1 <400> 6
		Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala
		1 5
30		<210> 7 <211> 10 <212> PRT <213> artificial
35		<220> <223> polipéptido p4 <400> 7
		Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu
		1 5 10
40		<210> 8 <211> 10 <212> PRT <213> artificial
45		<220> <223> polipéptido p68 <400> 8
		Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu
		1 5 10
50		<210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> artificial
55		<220> <223> polipéptido p277

<400> 9

Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu
1 5

5 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> polipéptido p342
<400> 10

Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu
1 5

15 <210> 11
<211> 10
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> polipéptido p351
25 <400> 11

Arg Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu
1 5 10

30 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> polipéptido p444
<400> 12

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

40 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
45 <213> artificial

<220>
<223> polipéptido p464
50 <400> 13

Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu
1 5

55 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> polipéptido p966

<400> 14

5 Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu
 1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
10 <213> artificial

<220>
<223> polipéptido p1107

15 <400> 15

 Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu
 1 5

<210> 16
20 <211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
25 <223> polipéptido p1123

<400> 16

 Leu Pro Ser Pro Lys Phe Thr Ile Leu
 1 5

30 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> péptido p444*

<400> 17

40 Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
 1 5

<210> 18
45 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> hTERT

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (8)
<223> Xaa= cualquier aminoácido

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en A, L, I, M, V, F, W e Y
 5
 <400> 18

 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

 10
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> hTERT

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25
 <222> (3) .. (9)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en A, L, I, M, V, F, W e Y

 <400> 19

 Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 35
 <210> 20
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40
 <220>
 <223> hTERT

 45
 <400> 20

 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val
 1 5 10 15

 Arg Ser Leu Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Arg Pro Ala
 20 25 30

 Glu Glu Ala Thr Ser Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg
 35 40 45

 Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu
 50 55

 <210> 21
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polinucleótido n1

 <400> 21
 atgccgcgcg ctcgccgctg ccgagcc 27

10 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polinucleótido n4

 <400> 22
 gctccccgct gccgagccgt gcgctccctg 30

20 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polinucleótido n68

 <400> 23
 gccccctcct tccgccaggt gtcctgcctg 30

 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> polinucleótido n277

40 <400> 24
 agaccgcgcg aagaagccac ctctttg 27

 <210> 25
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> polinucleótido n342

50 <400> 25
 cggccctcct tcctactcag ctctctg 27

 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polinucleótido n351

 <400> 26
 aggccagcc tgactggcgc tcggaggctc 30

60 <210> 27
 <211> 27

65 <210> 27
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> polinucleótido n444

 <400> 27
 gacccccgtc gcctggtgca gctgctc 27

 10 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> polinucleótido n464

 <400> 28
 ttcgtgcggg cctgcctgcg ccggctg 27
 20
 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> polinucleótido n966

 <400> 29
 30 gctgggagga acatgcgtcg caaactc 27

 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> polinucleótido n1107

 40 <400> 30
 ctcccgggga cgacgctgac tgcctg 27

 <210> 31
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> polinucleótido n1123
 50
 <400> 31
 ctgccctcag actcaagac catcctg 27

 <210> 32
 55 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> polinucleótido n444*

 <400> 32
 gcccccgctc gcctggtgca gctgctc 27

 65 <210> 33
 <211> 10

ES 2 440 768 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> R10TV
 <400> 33

10
 Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val
 1 5 10

15
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 34

25
 Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu
 1 5

30
 <210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> núcleo 128-140 de virus de la hepatitis B
 <400> 35

40
 Thr Pro Pro Ala Thr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
 1 5 10

45
 <210> 36
 <211> 4015
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (4015)
 <223> gen que codifica la proteína hTERT y secuencia de aminoácidos correspondiente

55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (56) .. (3454)
 <223> secuencia codificante

60
 <400> 36

gcagcgctgc gtcctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgcg atg	58
Met	
1	
ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc cac	106
Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser His	
5 10 15	
tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg ccc	154
Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly Pro	
20 25 30	
cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc gcg	202
Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala	
35 40 45	
ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg ccc	250
Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro Pro	
50 55 60 65	
ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg gtg	298
Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu Val	
70 75 80	
gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg ctg	346
Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val Leu	
85 90 95	
gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc gag	394
Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro Glu	
100 105 110	
gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc gac	442
Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr Asp	
115 120 125	
gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg ggc	490
Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val Gly	
130 135 140 145	
gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg ctg	538
Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val Leu	
150 155 160	
gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac cag	586
Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr Gln	
165 170 175	
ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga ccc	634
Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly Pro	
180 185 190	
cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg gag	682
Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg Glu	
195 200 205	
gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc ggg	730
Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg Gly	
210 215 220 225	
ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt ggc	778

Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg	Gly	
				230					235						240	
gct	gcc	cct	gag	ccg	gag	cgg	acg	ccc	gtt	ggg	cag	ggg	tcc	tgg	gcc	826
Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp	Ala	
			245					250					255			
cac	ccg	ggc	agg	acg	cgt	gga	ccg	agt	gac	cgt	ggt	ttc	tgt	gtg	gtg	874
His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val	Val	
			260				265					270				
tca	cct	gcc	aga	ccc	gcc	gaa	gaa	gcc	acc	tct	ttg	gag	ggt	gcg	ctc	922
Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala	Leu	
	275					280					285					
tct	ggc	acg	cgc	cac	tcc	cac	cca	tcc	gtg	ggc	cgc	cag	cac	cac	gcg	970
Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His	Ala	
290					295					300					305	
ggc	ccc	cca	tcc	aca	tcg	cgg	cca	cca	cgt	ccc	tgg	gac	acg	cct	tgt	1018
Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro	Cys	
				310					315					320		
ccc	ccg	gtg	tac	gcc	gag	acc	aag	cac	ttc	ctc	tac	tcc	tca	ggc	gac	1066
Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly	Asp	
			325					330					335			
aag	gag	cag	ctg	cgg	ccc	tcc	ttc	cta	ctc	agc	tct	ctg	agg	ccc	agc	1114
Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	
		340					345					350				
ctg	act	ggc	gct	cgg	agg	ctc	gtg	gag	acc	atc	ttt	ctg	ggt	tcc	agg	1162
Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	Arg	
	355					360					365					
ccc	tgg	atg	cca	ggg	act	ccc	cgc	agg	ttg	ccc	cgc	ctg	ccc	cag	cgc	1210
Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln	Arg	
370					375					380				385		
tac	tgg	caa	atg	cgg	ccc	ctg	ttt	ctg	gag	ctg	ctt	ggg	aac	cac	gcg	1258
Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His	Ala	
				390					395					400		
cag	tgc	ccc	tac	ggg	gtg	ctc	ctc	aag	acg	cac	tgc	ccg	ctg	cga	gct	1306
Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg	Ala	
			405					410					415			
gcg	gtc	acc	cca	gca	gcc	ggt	gtc	tgt	gcc	cgg	gag	aag	ccc	cag	ggc	1354
Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	Gly	
		420					425					430				
tct	gtg	gcg	gcc	ccc	gag	gag	gag	gac	aca	gac	ccc	cgt	cgc	ctg	gtg	1402
Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	
	435					440					445					
cag	ctg	ctc	cgc	cag	cac	agc	agc	ccc	tgg	cag	gtg	tac	ggc	ttc	gtg	1450
Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	Val	
450					455					460				465		
cgg	gcc	tgc	ctg	cgc	cgg	ctg	gtg	ccc	cca	ggc	ctc	tgg	ggc	tcc	agg	1498
Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	Arg	

470	475	480	
cac aac gaa cgc cgc ttc ctc agg aac acc aag aag ttc atc tcc ctg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser Leu 485 490 495			1546
ggg aag cat gcc aag ctc tcg ctg cag gag ctg acg tgg aag atg agc Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met Ser 500 505 510			1594
gtg cgg gac tgc gct tgg ctg cgc agg agc cca ggg gtt ggc tgt gtt Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys Val 515 520 525			1642
ccg gcc gca gag cac cgt ctg cgt gag gag atc ctg gcc aag ttc ctg Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe Leu 530 535 540 545			1690
cac tgg ctg atg agt gtg tac gtc gtc gag ctg ctc agg tct ttc ttt His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe Phe 550 555 560			1738
tat gtc acg gag acc acg ttt caa aag aac agg ctc ttt ttc tac cgg Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg 565 570 575			1786
aag agt gtc tgg agc aag ttg caa agc att gga atc aga cag cac ttg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu 580 585 590			1834
aag agg gtg cag ctg cgg gag ctg tcg gaa gca gag gtc agg cag cat Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His 595 600 605			1882
cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc ccc Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro 610 615 620 625			1930
aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg gga Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly 630 635 640			1978
gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg agg Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg 645 650 655			2026
gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc ccc Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro 660 665 670			2074
ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg gcc Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala 675 680 685			2122
tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct gag Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu 690 695 700 705			2170
ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc ccc Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro 710 715 720			2218

cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag aac	2266
Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn	
725 730 735	
acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat ggg	2314
Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly	
740 745 750	
cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac ctc	2362
His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp Leu	
755 760 765	
cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc ccg	2410
Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro	
770 775 780 785	
ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag gcc	2458
Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala	
790 795 800	
agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac gcc	2506
Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala	
805 810 815	
gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg cag	2554
Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln	
820 825 830	
ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac atg	2602
Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met	
835 840 845	
gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg cgt	2650
Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu Arg	
850 855 860 865	
ttg gtg gat gat ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg aaa	2698
Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys	
870 875 880	
acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg	2746
Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val	
885 890 895	
gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag gcc	2794
Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala	
900 905 910	
ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc	2842
Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro	
915 920 925	
tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc gac	2890
Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp	
930 935 940 945	
tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc aac	2938
Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn	
950 955 960	

cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val 965 970 975	2986
ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser 980 985 990	3034
ctc cag acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala 995 1000 1005	3082
tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln 1010 1015 1020	3127
gtt tgg aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr 1025 1030 1035	3172
gcc tcc ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met 1040 1045 1050	3217
tcg ctg ggg gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala 1055 1060 1065	3262
gtg cag tgg ctg tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg 1070 1075 1080	3307
cac cgt gtc acc tac gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala 1085 1090 1095	3352
cag acg cag ctg agt cgg aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala 1100 1105 1110	3397
ctg gag gcc gca gcc aac ccg gca ctg ccc tca gac ttc aag acc Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr 1115 1120 1125	3442
atc ctg gac tga tggccaccg cccacagcca ggccgagagc agacaccagc Ile Leu Asp 1130	3494
agccctgtca cgccgggctc tacgtcccag ggagggaggg gcggcccaca cccaggcccg	3554
caccgctggg agtctgaggc ctgagtgagt gtttggccga ggccctgcatg tccggctgaa	3614
ggctgagtgt ccggctgagg cctgagcgag tgtccagcca agggctgagt gtccagcaca	3674
cctgccgtct tcacttcccc acaggctggc gtcgggtcc accccagggc cagcttttcc	3734
tcaccaggag cccggettcc actccccaca taggaatagt ccatccccag attcgccatt	3794
gttcaccctt cgccctgccc tcccttgccct tccaccccca ccatccaggt ggagaccctg	3854
agaaggaccc tgggagctct gggaatttgg agtgacaaa ggtgtgccct gtacacaggc	3914

gaggaccctg cacctggatg ggggtccctg tgggtcaaat tggggggagg tgctgtggga 3974
gtaaaatact gaatatatga gtttttcagt tttgaaaaaa a 4015

<210> 37
<211> 1132
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 40 45
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100 105 110
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
115 120 125
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130 135 140
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145 150 155 160
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
165 170 175
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu

435		440		445
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe				
450		455		460
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser				
465		470		475 480
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser				
	485		490	495
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met				
	500		505	510
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys				
	515		520	525
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe				
	530		535	540
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe				
545		550		555 560
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr				
	565		570	575
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His				
	580		585	590
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln				
	595		600	605
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile				
	610		615	620
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val				
625		630		635 640
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser				
	645		650	655
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg				
	660		665	670
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg				
	675		680	685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
 725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
 755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
 770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
 785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
 805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
 820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
 835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
 850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
 865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
 885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
 900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
 915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gl
995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly
1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
1085 1090 1095

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp
1130

<210> 38

<211> 4009

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Gen que codifica una forma delecionada no funcional de HTERT (restos de aminoácidos 867 a 869)

<220>
 <221> CDS
 <222> (59) .. (3448)

5

<400> 38

```

caggcagcgc tgcgtcctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcg      58

atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc      106
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1          5          10          15

cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg      154
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
          20          25          30

ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc      202
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
          35          40          45

gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg      250
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
          50          55          60

ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg      298
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65          70          75          80

gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg      346
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
          85          90          95

ctg gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc      394
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
          100          105          110

gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc      442
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
          115          120          125

gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg      490
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
          130          135          140

ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg      538
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
          145          150          155          160

ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac      586
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
          165          170          175

cag ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga      634
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
          180          185          190

```

ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg 195 200 205	682
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg 210 215 220	730
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg 225 230 235 240	778
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp 245 250 255	826
gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val 260 265 270	874
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala 275 280 285	922
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His 290 295 300	970
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro 305 310 315 320	1018
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly 325 330 335	1066
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro 340 345 350	1114
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser 355 360 365	1162
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln 370 375 380	1210
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His 385 390 395 400	1258
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg 405 410 415	1306
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln 420 425 430	1354
ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg	1402

Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	
		435					440					445				
gtg	cag	ctg	ctc	cgc	cag	cac	agc	agc	ccc	tgg	cag	gtg	tac	ggc	ttc	1450
Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	
	450					455					460					
gtg	cgg	gcc	tgc	ctg	cgc	cgg	ctg	gtg	ccc	cca	ggc	ctc	tgg	ggc	tcc	1498
Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
465					470					475					480	
agg	cac	aac	gaa	cgc	cgc	ttc	ctc	agg	aac	acc	aag	aag	ttc	atc	tcc	1546
Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
			485						490					495		
ctg	ggg	aag	cat	gcc	aag	ctc	tgc	ctg	cag	gag	ctg	acg	tgg	aag	atg	1594
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
			500					505					510			
agc	gtg	cgg	gac	tgc	gct	tgg	ctg	cgc	agg	agc	cca	ggg	gtt	ggc	tgt	1642
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
		515					520					525				
gtt	ccg	gcc	gca	gag	cac	cgt	ctg	cgt	gag	gag	atc	ctg	gcc	aag	ttc	1690
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530					535					540					
ctg	cac	tgg	ctg	atg	agt	gtg	tac	gtc	gtc	gag	ctg	ctc	agg	tct	ttc	1738
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
545					550					555					560	
ttt	tat	gtc	acg	gag	acc	acg	ttt	caa	aag	aac	agg	ctc	ttt	ttc	tac	1786
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
			565					570						575		
cgg	aag	agt	gtc	tgg	agc	aag	ttg	caa	agc	att	gga	atc	aga	cag	cac	1834
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
			580					585					590			
ttg	aag	agg	gtg	cag	ctg	cgg	gag	ctg	tgc	gaa	gca	gag	gtc	agg	cag	1882
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
		595					600					605				
cat	cgg	gaa	gcc	agg	ccc	gcc	ctg	ctg	acg	tcc	aga	ctc	cgc	ttc	atc	1930
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
		610				615					620					
ccc	aag	cct	gac	ggg	ctg	cgg	ccg	att	gtg	aac	atg	gac	tac	gtc	gtg	1978
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
625					630					635					640	
gga	gcc	aga	acg	ttc	cgc	aga	gaa	aag	agg	gcc	gag	cgt	ctc	acc	tgc	2026
Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
			645					650						655		
agg	gtg	aag	gca	ctg	ttc	agc	gtg	ctc	aac	tac	gag	cgg	gcg	cgg	cgc	2074
Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
			660					665					670			
ccc	ggc	ctc	ctg	ggc	gcc	tct	gtg	ctg	ggc	ctg	gac	gat	atc	cac	agg	2122
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	

675	680	685	
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro 690 695 700			2170
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile 705 710 715 720			2218
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln 725 730 735			2266
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His 740 745 750			2314
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp 755 760 765			2362
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser 770 775 780			2410
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu 785 790 795 800			2458
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His 805 810 815			2506
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro 820 825 830			2554
cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp 835 840 845			2602
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu 850 855 860			2650
cgt ttg ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg aaa acc ttc Arg Leu Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe 865 870 875 880			2698
ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg gtg aac Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn 885 890 895			2746
ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag gcc ctg ggt Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly 900 905 910			2794
ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc tgg tgc Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys 915 920 925			2842

ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc gac tac tcc Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser 930 935 940	2890
agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc aac cgc ggc Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly 945 950 955 960	2938
ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc ttg cgg Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg 965 970 975	2986
ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc ctc cag Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln 980 985 990	3034
acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg tac agg Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg 995 1000 1005	3082
ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa gtt tgg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp 1010 1015 1020	3127
aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc tcc Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser 1025 1030 1035	3172
ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg tgc ctg Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu 1040 1045 1050	3217
ggg gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln 1055 1060 1065	3262
tgg ctg tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg 1070 1075 1080	3307
gtc acc tac gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr 1085 1090 1095	3352
cag ctg agt cgg aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu 1100 1105 1110	3397
gcc gca gcc aac ccg gca ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu 1115 1120 1125	3442
gac tga tggccacccg cccacagcca ggccgagagc agacaccagc agccctgtca Asp 3498	
cgccgggctc tacgtcccag ggagggaggg gcggcccaca cccaggcccg caccgctggg 3558	
agtctgaggc ctgagtgagt gtttggccga ggctgcatg tccggctgaa ggctgagtg 3618	

ccggctgagg cctgagcgag tgtccagcca agggctgagt gtccagcaca cctgccgtct 3678
 tcacttcccc acaggctggc gctcggtcc accccagggc cagcttttcc tcaccaggag 3738
 cccggcttcc actccccaca taggaatagt ccatccccag attcgccatt gttcaccctt 3798
 cgccctgccc tcttttgctt tccaccccca ccatccaggt ggagaccctg agaaggaccc 3858
 tgggagctct gggaatttgg agtgaccaaa ggtgtgccct gtacacaggc gaggaccctg 3918
 cacctggatg ggggtccctg tgggtcaaat tggggggagg tgctgtggga gtaaaatact 3978
 gaatatatga gtttttcagt tttgaaaaaa a 4009

<210> 39
 <211> 1129
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 39

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

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
 165 170 175
 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
 180 185 190
 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His

385		390		395		400
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg	405		410		415	
Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln	420		425		430	
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu	435		440		445	
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe	450		455		460	
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser	465		470		475	480
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser	485		490		495	
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met	500		505		510	
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys	515		520		525	
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe	530		535		540	
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe	545		550		555	560
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr	565		570		575	
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His	580		585		590	
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln	595		600		605	
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile	610		615		620	
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val	625		630		635	640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
850 855 860

Arg Leu Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe
865 870 875 880

Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn
 885 890 895
 Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly
 900 905 910
 Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys
 915 920 925
 Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser
 930 935 940
 Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly
 945 950 955 960
 Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg
 965 970 975
 Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln
 980 985 990
 Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg
 995 1000 1005
 Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp
 1010 1015 1020
 Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser
 1025 1030 1035
 Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu
 1040 1045 1050
 Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln
 1055 1060 1065
 Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg
 1070 1075 1080
 Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr
 1085 1090 1095
 Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu
 1100 1105 1110

Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu
1115 1120 1125

Asp

<210> 40
<211> 3991
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Gen que codifica una forma delecionada no funcional HTERT (restos de aminoácidos 864 a 872)

<220>
<221> CDS
<222> (59) .. (3430)

<400> 40

caggcagcgc tgcgtcctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcg	58
atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc	106
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser	
1 5 10 15	
cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg	154
His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly	
20 25 30	
ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc	202
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg	
35 40 45	
gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg	250
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro	
50 55 60	
ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg	298
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg	346
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val	
85 90 95	
ctg gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc	394
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro	
100 105 110	
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc	442
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr	
115 120 125	
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg	490
Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val	
130 135 140	

ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val 145 150 155 160	538
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr 165 170 175	586
cag ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly 180 185 190	634
ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg 195 200 205	682
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg 210 215 220	730
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg 225 230 235 240	778
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp 245 250 255	826
gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val 260 265 270	874
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala 275 280 285	922
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His 290 295 300	970
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro 305 310 315 320	1018
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly 325 330 335	1066
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro 340 345 350	1114
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser 355 360 365	1162
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln 370 375 380	1210
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac	1258

Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His	
385					390					395					400	
gcg	cag	tgc	ccc	tac	ggg	gtg	ctc	ctc	aag	acg	cac	tgc	ccg	ctg	cga	1306
Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg	
				405					410					415		
gct	gcg	gtc	acc	cca	gca	gcc	ggg	gtc	tgt	gcc	cgg	gag	aag	ccc	cag	1354
Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	
			420					425					430			
ggc	tct	gtg	gcg	gcc	ccc	gag	gag	gag	gac	aca	gac	ccc	cgt	cgc	ctg	1402
Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	
		435					440					445				
gtg	cag	ctg	ctc	cgc	cag	cac	agc	agc	ccc	tgg	cag	gtg	tac	ggc	ttc	1450
Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	
	450					455					460					
gtg	cgg	gcc	tgc	ctg	cgc	cgg	ctg	gtg	ccc	cca	ggc	ctc	tgg	ggc	tcc	1498
Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
465					470					475					480	
agg	cac	aac	gaa	cgc	cgc	ttc	ctc	agg	aac	acc	aag	aag	ttc	atc	tcc	1546
Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
				485					490					495		
ctg	ggg	aag	cat	gcc	aag	ctc	tgc	ctg	cag	gag	ctg	acg	tgg	aag	atg	1594
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
			500					505					510			
agc	gtg	cgg	gac	tgc	gct	tgg	ctg	cgc	agg	agc	cca	ggg	gtt	ggc	tgt	1642
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
		515					520					525				
gtt	ccg	gcc	gca	gag	cac	cgt	ctg	cgt	gag	gag	atc	ctg	gcc	aag	ttc	1690
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530					535					540					
ctg	cac	tgg	ctg	atg	agt	gtg	tac	gtc	gtc	gag	ctg	ctc	agg	tct	ttc	1738
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
545					550					555					560	
ttt	tat	gtc	acg	gag	acc	acg	ttt	caa	aag	aac	agg	ctc	ttt	ttc	tac	1786
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
			565						570					575		
cgg	aag	agt	gtc	tgg	agc	aag	ttg	caa	agc	att	gga	atc	aga	cag	cac	1834
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
			580					585					590			
ttg	aag	agg	gtg	cag	ctg	cgg	gag	ctg	tgc	gaa	gca	gag	gtc	agg	cag	1882
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
		595					600					605				
cat	cgg	gaa	gcc	agg	ccc	gcc	ctg	ctg	acg	tcc	aga	ctc	cgc	ttc	atc	1930
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
	610					615					620					
ccc	aag	cct	gac	ggg	ctg	cgg	ccg	att	gtg	aac	atg	gac	tac	gtc	gtg	1978
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	

625	630	635	640	
gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser	645	650	655	2026
agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg	660	665	670	2074
ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg	675	680	685	2122
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro	690	695	700	2170
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile	705	710	715	2218
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln	725	730	735	2266
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His	740	745	750	2314
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp	755	760	765	2362
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser	770	775	780	2410
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu	785	790	795	2458
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His	805	810	815	2506
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro	820	825	830	2554
cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp	835	840	845	2602
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc gtg Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Val	850	855	860	2650
aca cct cac ctc acc cac gcg aaa acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg	865	870	875	2698
			880	

ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg	2746
Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val	
885 890 895	
aac ttc cct gta gaa gac gag gcc ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag	2794
Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln	
900 905 910	
atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc	2842
Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr	
915 920 925	
cgg acc ctg gag gtg cag agc gac tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc	2890
Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser	
930 935 940	
atc aga gcc agt ctc acc ttc aac cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac	2938
Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn	
945 950 955 960	
atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg	2986
Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu	
965 970 975	
ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc ctc cag acg gtg tgc acc aac atc	3034
Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile	
980 985 990	
tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg	3082
Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu	
995 1000 1005	
cag ctc cca ttt cat cag caa gtt tgg aag aac ccc aca ttt ttc	3127
Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe	
1010 1015 1020	
ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc tcc ctc tgc tac tcc atc ctg	3172
Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu	
1025 1030 1035	
aaa gcc aag aac gca ggg atg tgc ctg ggg gcc aag ggc gcc gcc	3217
Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala	
1040 1045 1050	
ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag tgg ctg tgc cac caa gca	3262
Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala	
1055 1060 1065	
ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt gtc acc tac gtg cca ctc	3307
Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu	
1070 1075 1080	
ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg cag ctg agt cgg aag ctc	3352
Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu	
1085 1090 1095	
ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag gcc gca gcc aac ccg gca	3397
Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala	
1100 1105 1110	

```

ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg gac tga tggccacccg      3440
Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
    1115                      1120

cccacagcca ggccgagagc agacaccagc agccctgtca cggcgggctc tacgtcccag      3500
ggagggaggg gcggcccaca cccaggcccg caccgctggg agtctgaggc ctgagtgagt      3560
gtttggccga ggccctgcatg tccggctgaa ggctgagtgt ccggctgagg cctgagcgag      3620
tgtccagcca agggctgagt gtccagcaca cctgcctgtc tcacttcccc acaggctggc      3680
gctcggctcc accccagggc cagcttttcc tcaccaggag cccggcttcc actccccaca      3740
taggaatagt ccatccccag attogccatt gttcacccct cggcctgccc tcctttgcct      3800
tccacccccca ccatccaggt ggagaccctg agaaggaccc tgggagctct gggaatttgg      3860
agtgacaaaa ggtgtgccct gtacacaggc gaggaccctg cacctggatg ggggtccctg      3920
tgggtcaaat tggggggagg tgctgtggga gtaaaatact gaatatatga gtttttcagt      3980
tttgaaaaaa a                                                    3991

```

<210> 41
 <211> 1123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 41

```

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1           5           10           15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
          20           25           30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35           40           45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50           55           60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65           70           75           80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
          85           90           95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
          100          105          110

```

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
 115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
 130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
 165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
 180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu
 435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe
 450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser
 465 470 475 480

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser
 485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met
 500 505 510

Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys
 515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe
 530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe
 545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr
 565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
 580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
660 665 670

Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp

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

ES 2 440 768 T3

Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu
 1085 1090 1095

Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala
 1100 1105 1110

Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
 1115 1120

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica un epítipo hTERT (telomerasa transcriptasa inversa humana) restringido a HLA-B7 elegido entre el grupo que consiste en:

- a. MPRAPRCRA (p1),
- b. APRCRAVRSL (p4),
- c. APSFRQVSCL (p68),
- d. RPAEEATSL (p277),
- e. RPSFLLSSL (p342),
- f. RPSLTGARRL (p351),
- g. DPRRLVQLL (p444),
- h. APRRLVQLL (p444*),
- i. FVRACLRL (p464),
- j. LPGTTLTAL (p1107), y
- k. LPSPKFTIL (p1123)

para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

2. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 que consta de una unidad polinucleotídica seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a. ATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCC (n1),
- b. GCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTG (n4),
- c. GCCCCCTCCTTCCGCCAGGTGTCCTGCCTG (n68),
- d. AGACCCGCCGAAGAAGCCACCTCTTTG (n277),
- e. CGGCCCTCCTTCTACTCAGCTCTCTG (n342),
- f. AGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC (n351),
- g. GACCCCGCTCGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444),
- h. GCCCCCGTGCCTGGTGCAGCTGCTC (n444*),
- i. TTCGTGCGGGCCTGCCTGCGCCGGCTG (n464),
- j. CTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTG (n1107), y
- k. CTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTG (n1123),

para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

3. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido definido en la reivindicación 1 ó 2, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

4. Un vector de expresión, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 3, que es el vector pTRIP-CMV- Δ hTERT depositado en la CNCM con el número CNCM I-3660 el 28 de julio de 2006, en que la secuencia hTERT delecionada se ha sustituido por un polinucleótido definido en la reivindicación 1 ó 2.

5. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

6. Una célula hospedadora genéticamente transformada con un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

7. Una célula hospedadora, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, que es una célula presentadora de antígeno (APC).

8. Una célula hospedadora, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 7 que es una célula dendrítica (DC).

9. Una célula hospedadora, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 8 que es una DC madurada completamente *ex vivo*.

10. Una célula hospedadora, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, que es una célula de mamífero no humana.

11. Una célula hospedadora, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que es una célula humana aislada.

5 12. Un polipéptido codificado por un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

13. Un epítipo hTERT elegido entre el grupo que consiste en:

- 10 a. MPRAPRCRA (p1),
b. APRCRAVRSL (p4),
c. APSFRQVSCL (p68),
d. RPAEEATSL (p277),
e. RPSFLLSSL (p342),
15 f. RPSLTGARRL (p351),
g. DPRRLVQLL (p444),
h. APRRLVQLL (p444*),
i. FVRACLRRRL (p464),
j. LPGTTLTAL (p1107), y
20 k. LPSPKFTIL (p1123),

para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

25 14. Una composición que comprende al menos un componente elegido entre el grupo que consiste en:

- a. un polinucleótido definido en la reivindicación 1 ó 2,
b. un vector definido en la reivindicación 3 ó 4,
30 c. una célula hospedadora definida en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, y
d. un polipéptido o péptido definido en la reivindicación 12 ó 13,

para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer mediante la inducción de una respuesta inmune restringida a HLA-B7 contra la telomerasa humana hTERT.

35 15. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 14, que es adecuada para administración *in vivo*.

40 16. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho polinucleótido codifica adicionalmente al menos un epítipo hTERT o poliepítipo, restringido a un alelo de MHC clase I diferente del de HLA-B7.

45 17. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende adicionalmente otras moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un epítipo hTERT o poliepítipo, restringido a un alelo de MHC clase I diferente del de HLA-B7.

18. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, donde dicho alelo de MHC clase I diferente es HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 o HLA-A24.

50 19. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde dicho polinucleótido codifica al menos un epítipo hTERT restringido a MHC clase II.

55 20. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, que comprende adicionalmente otras moléculas de ácido nucleico que codifican al menos un epítipo hTERT restringido a MHC clase II.

21. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde dicho polinucleótido codifica adicionalmente al menos un antígeno específico de tumor (TSA).

60 22. Una composición, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde dicho polinucleótido codifica adicionalmente al menos un antígeno asociado a tumor (TAA).

65 23. Una composición terapéutica, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, que comprende adicionalmente adyuvantes, un vehículo y/o un medio farmacéutico aceptable.

24. Una composición terapéutica, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, de acuerdo con la reivindicación 23, que comprende adicionalmente al menos un componente que facilita la captación de dicho polinucleótido o polinucleótidos por las células.

5

25. Un polinucleótido definido en la reivindicación 1 ó 2, un vector definido en la reivindicación 3 ó 4, una célula hospedadora definida en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, un polipéptido o péptido definido en la reivindicación 12 ó 13 o una composición definida en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer, en pacientes que tienen al menos un alelo HLA-B0702.

10

gcagcgtgc gtcctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccaccc ccgcg atg	58
	Met
	1
ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc cac	106
Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser His	
5 10 15	
tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg ccc	154
Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly Pro	
20 25 30	
cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc gcg	202
Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala	
35 40 45	
ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg ccc	250
Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro Pro	
50 55 60 65	
ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg gtg	298
Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu Val	
70 75 80	
gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg ctg	346
Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val Leu	
85 90 95	
gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc gag	394
Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro Glu	
100 105 110	
gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc gac	442
Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr Asp	
115 120 125	
gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg ggc	490
Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val Gly	
130 135 140 145	
gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg ctg	538
Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val Leu	
150 155 160	
gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac cag	586
Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr Gln	
165 170 175	
ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga ccc	634
Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly Pro	
180 185 190	
cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg gag	682
Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg Glu	
195 200 205	

Figura 1A

gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc ggg	730
Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg Gly	
210 215 220 225	
ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt ggc	778
Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg Gly	
230 235 240	
gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg gcc	826
Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp Ala	
245 250 255	
cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg gtg	874
His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val Val	
260 265 270	
tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg ctc	922
Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala Leu	
275 280 285	
tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac gcg	970
Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His Ala	
290 295 300 305	
ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct tgt	1018
Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro Cys	
310 315 320	
ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc gac	1066
Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly Asp	
325 330 335	
aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc agc	1114
Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser	
340 345 350	
ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc agg	1162
Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser Arg	
355 360 365	
ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag cgc	1210
Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln Arg	
370 375 380 385	
tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac gcg	1258
Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His Ala	
390 395 400	
cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga gct	1306
Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg Ala	
405 410 415	
gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag ggc	1354
Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln Gly	
420 425 430	

Figura 1B

tct	gtg	gcg	gcc	ccc	gag	gag	gag	gac	aca	gac	ccc	cgt	cgc	ctg	gtg	1402
Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu	Val	
435						440					445					
cag	ctg	ctc	cgc	cag	cac	agc	agc	ccc	tgg	cag	gtg	tac	ggc	ttc	gtg	1450
Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe	Val	
450					455					460					465	
cgg	gcc	tgc	ctg	cgc	cgg	ctg	gtg	ccc	cca	ggc	ctc	tgg	ggc	tcc	agg	1498
Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	Arg	
				470				475						480		
cac	aac	gaa	cgc	cgc	ttc	ctc	agg	aac	acc	aag	aag	ttc	atc	tcc	ctg	1546
His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	Leu	
			485					490					495			
ggg	aag	cat	gcc	aag	ctc	tcg	ctg	cag	gag	ctg	acg	tgg	aag	atg	agc	1594
Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	Ser	
	500					505						510				
gtg	cgg	gac	tgc	gct	tgg	ctg	cgc	agg	agc	cca	ggg	gtt	ggc	tgt	gtt	1642
Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	Val	
	515					520					525					
ccg	gcc	gca	gag	cac	cgt	ctg	cgt	gag	gag	atc	ctg	gcc	aag	ttc	ctg	1690
Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	Leu	
530					535					540					545	
cac	tgg	ctg	atg	agt	gtg	tac	gtc	gtc	gag	ctg	ctc	agg	tct	ttc	ttt	1738
His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	Phe	
				550					555					560		
tat	gtc	acg	gag	acc	acg	ttt	caa	aag	aac	agg	ctc	ttt	ttc	tac	cgg	1786
Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	Arg	
			565					570				575				
aag	agt	gtc	tgg	agc	aag	ttg	caa	agc	att	gga	atc	aga	cag	cac	ttg	1834
Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	Leu	
	580					585					590					
aag	agg	gtg	cag	ctg	cgg	gag	ctg	tcg	gaa	gca	gag	gtc	agg	cag	cat	1882
Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	His	
	595					600					605					
cgg	gaa	gcc	agg	ccc	gcc	ctg	ctg	acg	tcc	aga	ctc	cgc	ttc	atc	ccc	1930
Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	
610					615					620					625	
aag	cct	gac	ggg	ctg	cgg	ccg	att	gtg	aac	atg	gac	tac	gtc	gtg	gga	1978
Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	Gly	
				630				635						640		
gcc	aga	acg	ttc	cgc	aga	gaa	aag	agg	gcc	gag	cgt	ctc	acc	tcg	agg	2026
Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	Arg	
			645					650					655			

Figura 1C

gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc ccc	2074
Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro	
660 665 670	
ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg gcc	2122
Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala	
675 680 685	
tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct gag	2170
Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu	
690 695 700 705	
ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc ccc	2218
Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile Pro	
710 715 720	
cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag aac	2266
Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln Asn	
725 730 735	
acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat ggg	2314
Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His Gly	
740 745 750	
cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac ctc	2362
His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp Leu	
755 760 765	
cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc ccg	2410
Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser Pro	
770 775 780 785	
ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag gcc	2458
Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu Ala	
790 795 800	
agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac gcc	2506
Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala	
805 810 815	
gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg cag	2554
Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln	
820 825 830	
ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac atg	2602
Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met	
835 840 845	
gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg cgt	2650
Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu Arg	
850 855 860 865	
ttg gtg gat gat ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg aaa	2698
Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys	
870 875 880	

Figura 1D

acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg	2746
Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val	
885 890 895	
gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag gcc	2794
Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala	
900 905 910	
ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc	2842
Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro	
915 920 925	
tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc gac	2890
Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp	
930 935 940 945	
tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc aac	2938
Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn	
950 955 960	
cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc	2986
Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val	
965 970 975	
ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc	3034
Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser	
980 985 990	
ctc cag acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg	3082
Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala	
995 1000 1005	
tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa gtt	3130
Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val	
1010 1015 1020 1025	
tgg aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc tcc	3178
Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser	
1030 1035 1040	
ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg tgc ctg ggg	3226
Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly	
1045 1050 1055	
gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag tgg ctg	3274
Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu	
1060 1065 1070	
tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt gtc acc tac	3322
Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr	
1075 1080 1085	
gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg cag ctg agt cgg	3370
Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg	
1090 1095 1100 1105	

Figura 1E

```

aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag gcc gca gcc aac ccg 3418
Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro
          1110          1115          1120

gca ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg gac tga tggccacccg 3464
Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp
          1125          1130

cccacagcca ggccgagagc agacaccagc agccctgtca cgccgggctc tacgtcccag 3524
ggaggggaggg gcggcccaca cccaggcccg caccgctggg agtctgaggc ctgagtgagt 3584
gtttggccga ggcctgcatg tccggctgaa ggctgagtgt ccggctgagg cctgagcgag 3644
tgtccagcca agggctgagt gtccagcaca cctgcccgtc tcacttcccc acaggctggc 3704
gctcggctcc accccagggc cagcttttcc tcaccaggag cccggcttcc actccccaca 3764
taggaatagt ccatccccag attcgccatt gtccaccctc cgccctgccc tcctttgcct 3824
tccacccccca ccatccaggt ggagaccctg agaaggaccc tgggagctct gggaatttgg 3884
agtgaccaaaa ggtgtgccct gtacacaggc gaggaccctg cacctggatg ggggtccctg 3944
tgggtcaaat tgggggggagg tgctgtggga gtaaaatact gaatatatga gtttttcagt 4004
tttgaaaaaa a 4015

```

Figura 1F

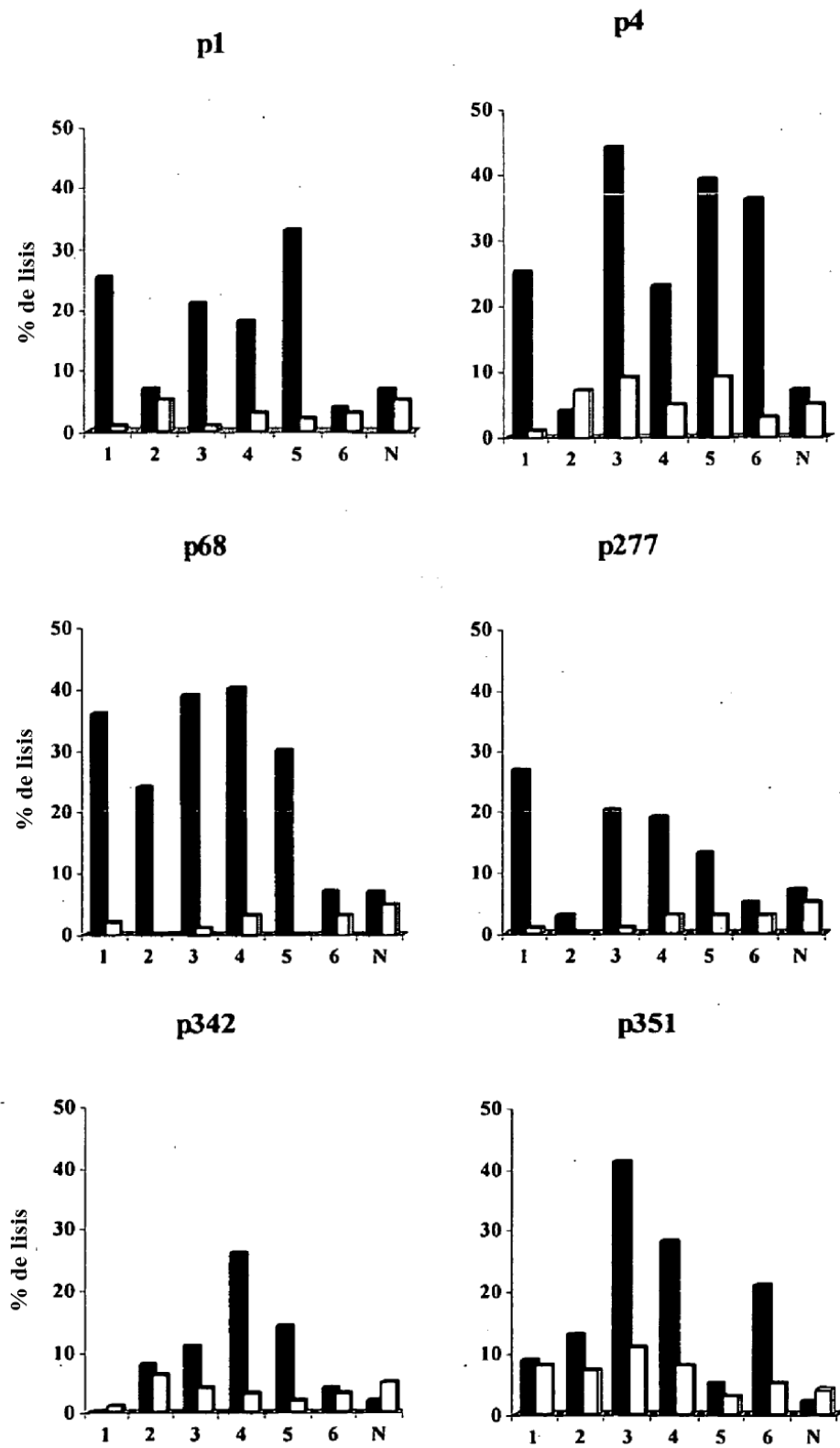


Figura 2

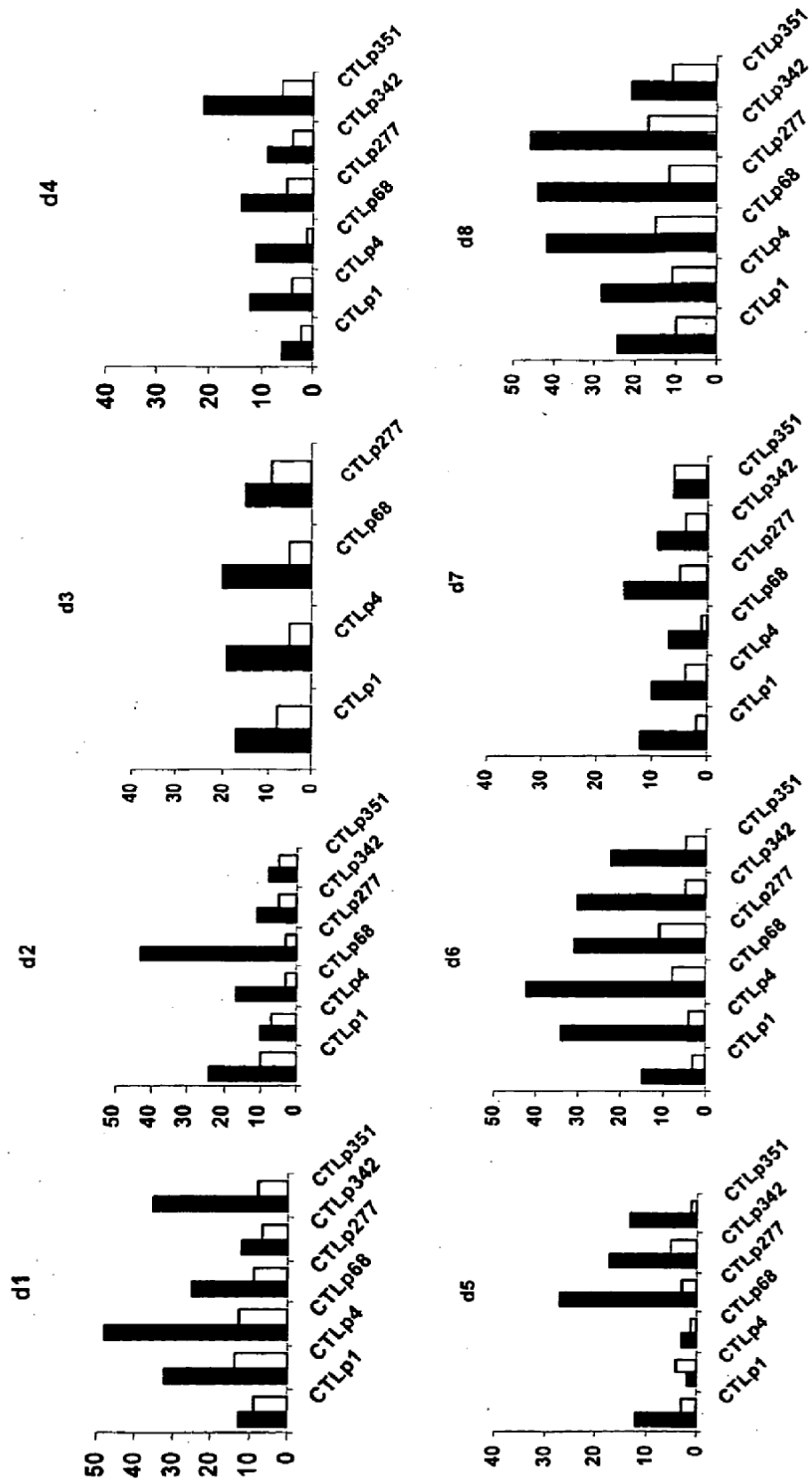


Figura 3

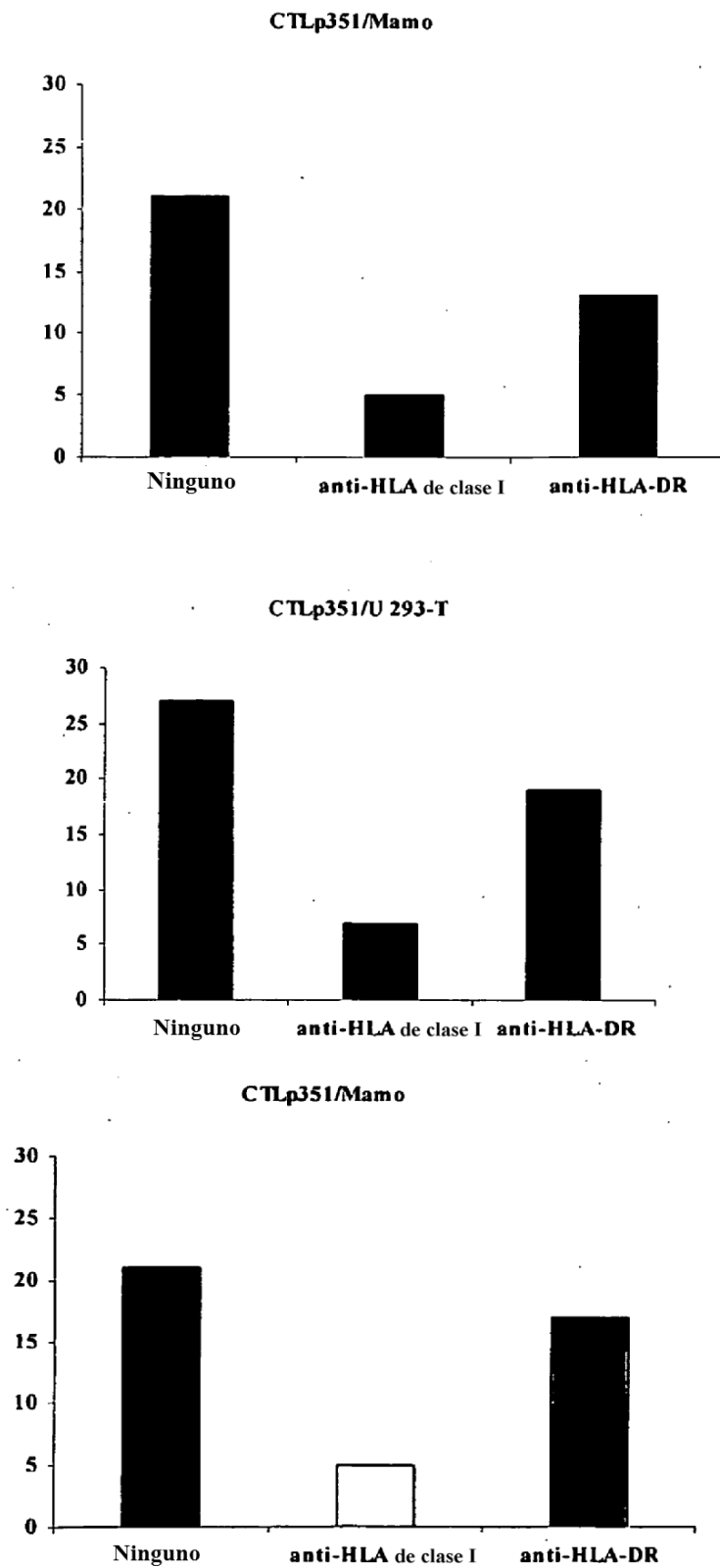
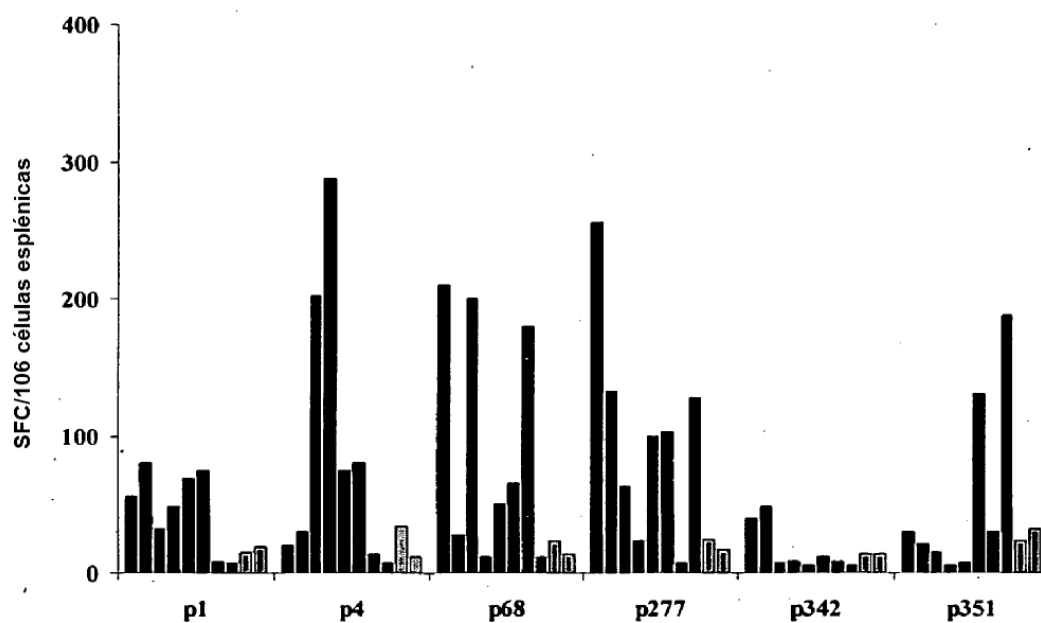


Figura 4

A.



B.

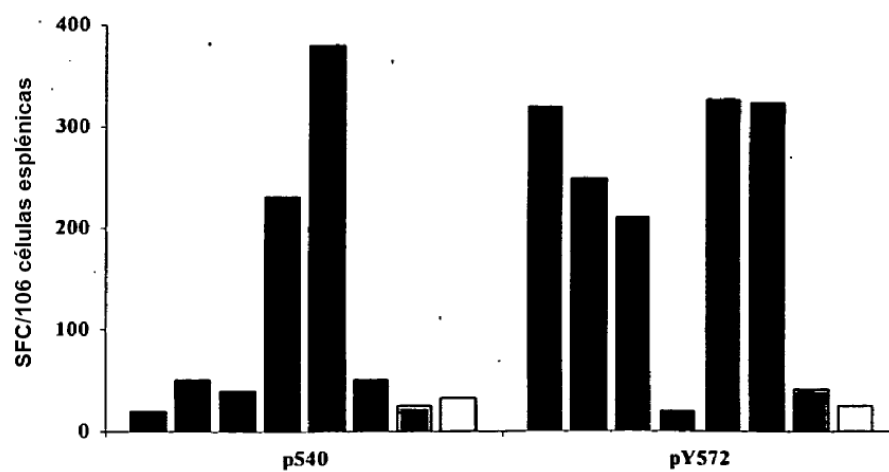


Figura 5

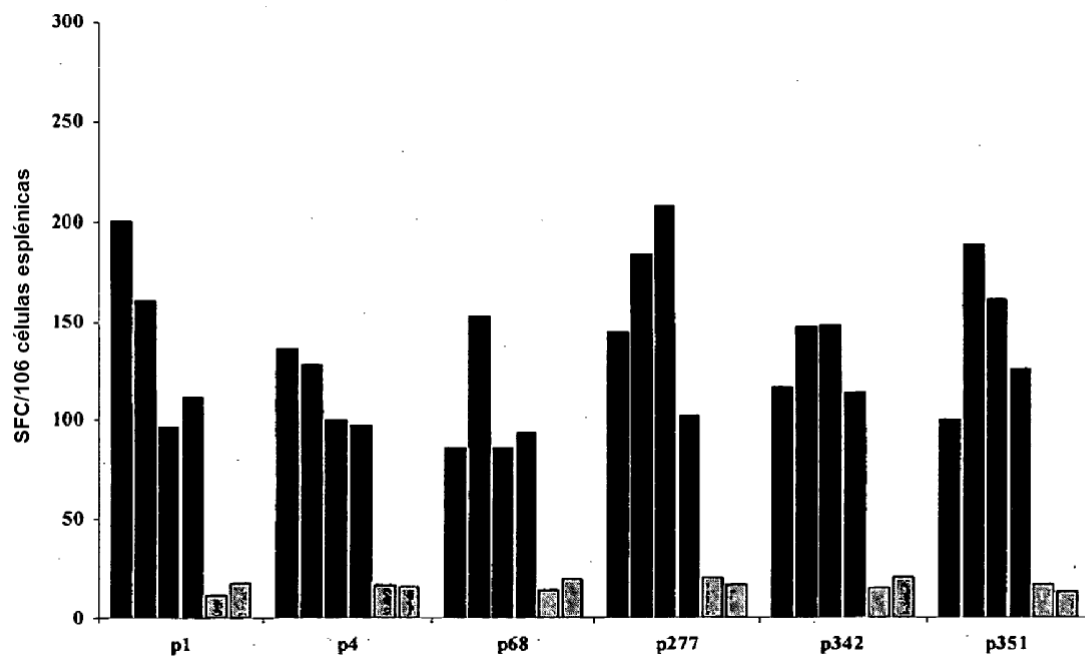


Figura 6

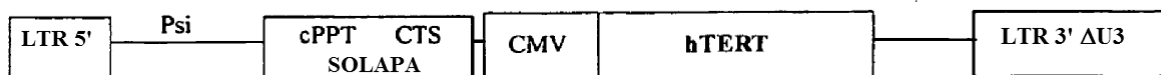


Figura 7

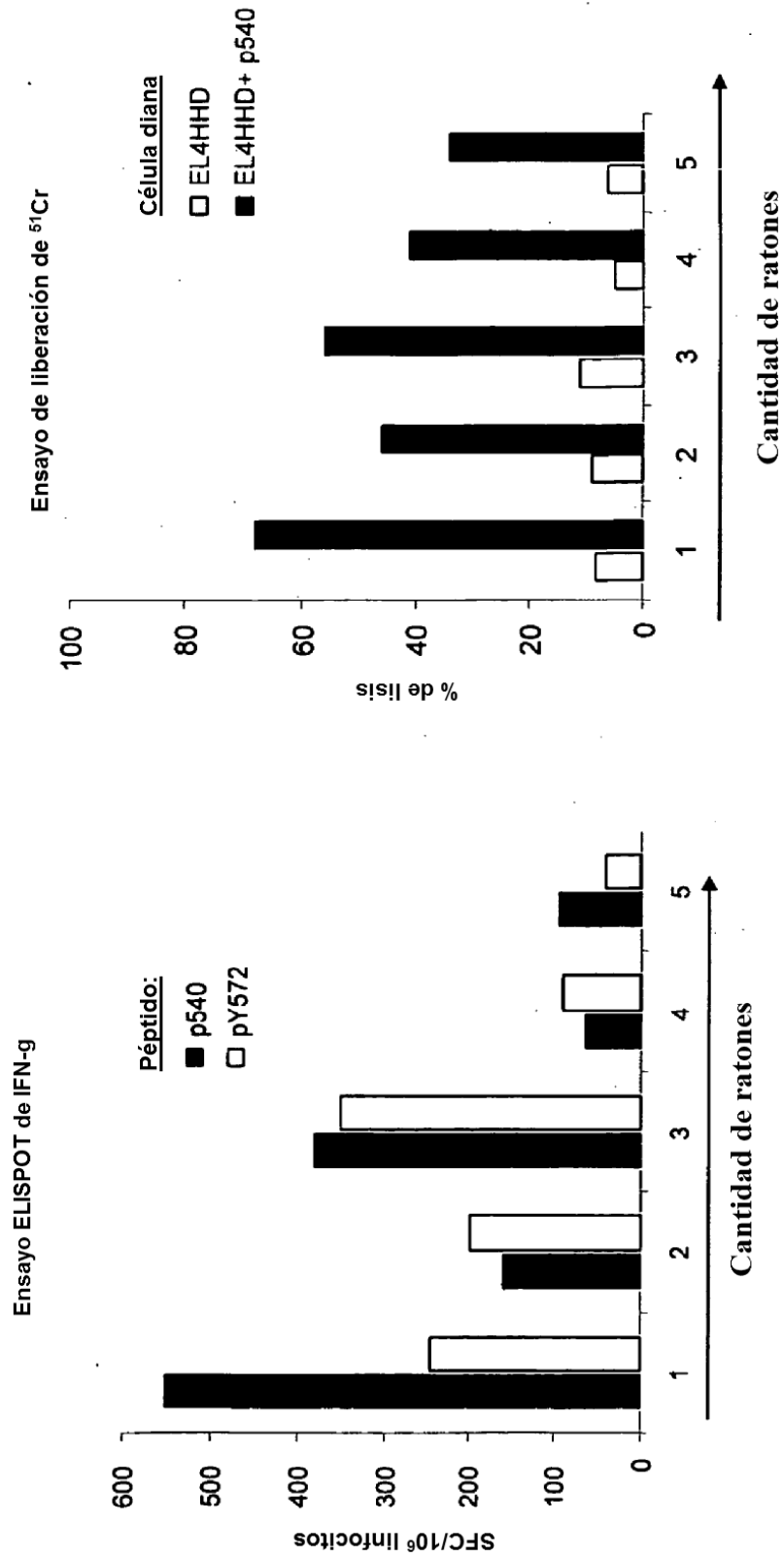


Figura 8

caggcagcgc tgcgtctctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcg	58
<u>atg</u> ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser 1 5 10 15	106
cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly 20 25 30	154
ccc cag gcc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg 35 40 45	202
gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro 50 55 60	250
ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu 65 70 75 80	298
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc gcc gcg aag aac gtg Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val 85 90 95	346
ctg gcc ttc gcc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg gcc ccc ccc Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro 100 105 110	394
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr 115 120 125	442
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val 130 135 140	490
ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val 145 150 155 160	538
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr 165 170 175	586
cag ctc gcc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly 180 185 190	634
ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg 195 200 205	682
gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg 210 215 220	730

Figura 9A

ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg 225 230 235 240	778
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp 245 250 255	826
gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val 260 265 270	874
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala 275 280 285	922
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His 290 295 300	970
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro 305 310 315 320	1018
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly 325 330 335	1066
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro 340 345 350	1114
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser 355 360 365	1162
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln 370 375 380	1210
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His 385 390 395 400	1258
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg 405 410 415	1306
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln 420 425 430	1354
ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu 435 440 445	1402

Figura 9B

gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc	1450
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe	
450 455 460	
gtg cgg gcc tgc ctg cgc cgg ctg gtg ccc cca ggc ctc tgg ggc tcc	1498
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser	
465 470 475 480	
agg cac aac gaa cgc cgc ttc ctc agg aac acc aag aag ttc atc tcc	1546
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser	
485 490 495	
ctg ggg aag cat gcc aag ctc tcg ctg cag gag ctg acg tgg aag atg	1594
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met	
500 505 510	
agc gtg cgg gac tgc gct tgg ctg cgc agg agc cca ggg gtt ggc tgt	1642
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys	
515 520 525	
gtt ccg gcc gca gag cac cgt ctg cgt gag gag atc ctg gcc aag ttc	1690
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe	
530 535 540	
ctg cac tgg ctg atg agt gtg tac gtc gtc gag ctg ctc agg tct ttc	1738
Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe	
545 550 555 560	
ttt tat gtc acg gag acc acg ttt caa aag aac agg ctc ttt ttc tac	1786
Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr	
565 570 575	
cgg aag agt gtc tgg agc aag ttg caa agc att gga atc aga cag cac	1834
Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His	
580 585 590	
ttg aag agg gtg cag ctg cgg gag ctg tcg gaa gca gag gtc agg cag	1882
Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln	
595 600 605	
cat cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc	1930
His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile	
610 615 620	
ccc aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg	1978
Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val	
625 630 635 640	
gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg	2026
Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser	
645 650 655	
agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc	2074
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg	
660 665 670	

Figura 9C

ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg 675 680 685	2122
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro 690 695 700	2170
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile 705 710 715 720	2218
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln 725 730 735	2266
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His 740 745 750	2314
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp 755 760 765	2362
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser 770 775 780	2410
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu 785 790 795 800	2458
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His 805 810 815	2506
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro 820 825 830	2554
cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp 835 840 845	2602
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc ctg Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu 850 855 860	2650
cgt ttg ttc ttg ttg gtg aca cct cac ctc acc cac gcg aaa acc ttc Arg Leu Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe 865 870 875 880	2698
ctc agg acc ctg gtc cga ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg gtg aac Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn 885 890 895	2746

Figura 9D

ttg cgg aag aca gtg gtg aac ttc cct gta gaa gac gag gcc ctg ggt Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly 900 905 910	2794
ggc acg gct ttt gtt cag atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc tgg tgc Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys 915 920 925	2842
ggc ctg ctg ctg gat acc cgg acc ctg gag gtg cag agc gac tac tcc Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser 930 935 940	2890
agc tat gcc cgg acc tcc atc aga gcc agt ctc acc ttc aac cgc ggc Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly 945 950 955 960	2938
ttc aag gct ggg agg aac atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc ttg cgg Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg 965 970 975	2986
ctg aag tgt cac agc ctg ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc ctc cag Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln 980 985 990	3034
acg gtg tgc acc aac atc tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg tac agg Thr Val Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg 995 1000 1005	3082
ttt cac gca tgt gtg ctg cag ctc cca ttt cat cag caa gtt tgg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp 1010 1015 1020	3127
aag aac ccc aca ttt ttc ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc tcc Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser 1025 1030 1035	3172
ctc tgc tac tcc atc ctg aaa gcc aag aac gca ggg atg tgc ctg Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu 1040 1045 1050	3217
ggg gcc aag ggc gcc gcc ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln 1055 1060 1065	3262
tgg ctg tgc cac caa gca ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg 1070 1075 1080	3307
gtc acc tac gtg cca ctc ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr 1085 1090 1095	3352
cag ctg agt cgg aag ctc ccg ggg acg acg ctg act gcc ctg gag Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu 1100 1105 1110	3397

Figura 9E

```

gcc gca gcc aac ccg gca ctg ccc tca gac ttc aag acc atc ctg 3442
Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu
1115 1120 1125

gac tga tggccacccg cccacagcca ggccgagagc agacaccagc agccctgtca 3498
Asp

cgccgggctc tacgtcccag ggagggaggg gcggcccaca cccaggcccg caccgctggg 3558
agtctgaggc ctgagtgagt gtttggccga ggccctgcatg tccggctgaa ggctgagtgt 3618
ccggctgagg cctgagcgag tgtccagcca agggctgagt gtccagcaca cctgccgtct 3678
tcacttcccc acaggctggc gctcggctcc accccagggc cagcttttcc tcaccaggag 3738
cccggttcc actccccaca taggaatagt ccatccccag attcgccatt gttcaccct 3798
cgccctgccc tcctttgcct tccaccccca ccatccaggt ggagaccctg agaaggaccc 3858
tgggagctct ggggaatttg agtgaccaa ggtgtgccct gtacacaggc gaggaccctg 3918
cacctggatg ggggtccctg tgggtcaaat tggggggagg tgctgtggga gtaaaatact 3978
gaatatatga gttttcagt ttgaaaaa a 4009

```

Figura 9F

caggcagcgc tgcgtcctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcg	58
atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser 1 5 10 15	106
cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly 20 25 30	154
ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg 35 40 45	202
gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro 50 55 60	250
ccc ccc gcc gcc ccc tcc ttc cgc cag gtg tcc tgc ctg aag gag ctg Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu 65 70 75 80	298
gtg gcc cga gtg ctg cag agg ctg tgc gag cgc ggc gcg aag aac gtg Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val 85 90 95	346
ctg gcc ttc ggc ttc gcg ctg ctg gac ggg gcc cgc ggg ggc ccc ccc Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro 100 105 110	394
gag gcc ttc acc acc agc gtg cgc agc tac ctg ccc aac acg gtg acc Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr 115 120 125	442
gac gca ctg cgg ggg agc ggg gcg tgg ggg ctg ctg ctg cgc cgc gtg Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val 130 135 140	490
ggc gac gac gtg ctg gtt cac ctg ctg gca cgc tgc gcg ctc ttt gtg Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val 145 150 155 160	538
ctg gtg gct ccc agc tgc gcc tac cag gtg tgc ggg ccg ccg ctg tac Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr 165 170 175	586
cag ctc ggc gct gcc act cag gcc cgg ccc ccg cca cac gct agt gga Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly 180 185 190	634
ccc cga agg cgt ctg gga tgc gaa cgg gcc tgg aac cat agc gtc agg Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg 195 200 205	682

Figura 10A

gag gcc ggg gtc ccc ctg ggc ctg cca gcc ccg ggt gcg agg agg cgc Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg 210 215 220	730
ggg ggc agt gcc agc cga agt ctg ccg ttg ccc aag agg ccc agg cgt Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg 225 230 235 240	778
ggc gct gcc cct gag ccg gag cgg acg ccc gtt ggg cag ggg tcc tgg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp 245 250 255	826
gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val 260 265 270	874
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala 275 280 285	922
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His 290 295 300	970
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro 305 310 315 320	1018
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly 325 330 335	1066
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro 340 345 350	1114
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser 355 360 365	1162
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln 370 375 380	1210
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His 385 390 395 400	1258
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg 405 410 415	1306
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln 420 425 430	1354

Figura 10B

ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu 435 440 445	1402
gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe 450 455 460	1450
gtg cgg gcc tgc ctg cgc cgg ctg gtg ccc cca ggc ctc tgg ggc tcc Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser 465 470 475 480	1498
agg cac aac gaa cgc cgc ttc ctc agg aac acc aag aag ttc atc tcc Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser 485 490 495	1546
ctg ggg aag cat gcc aag ctc tcg ctg cag gag ctg acg tgg aag atg Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met 500 505 510	1594
agc gtg cgg gac tgc gct tgg ctg cgc agg agc cca ggg gtt ggc tgt Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys 515 520 525	1642
gtt ccg gcc gca gag cac cgt ctg cgt gag gag atc ctg gcc aag ttc Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe 530 535 540	1690
ctg cac tgg ctg atg agt gtg tac gtc gtc gag ctg ctc agg tct ttc Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe 545 550 555 560	1738
ttt tat gtc acg gag acc acg ttt caa aag aac agg ctc ttt ttc tac Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr 565 570 575	1786
cgg aag agt gtc tgg agc aag ttg caa agc att gga atc aga cag cac Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His 580 585 590	1834
ttg aag agg gtg cag ctg cgg gag ctg tcg gaa gca gag gtc agg cag Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln 595 600 605	1882
cat cgg gaa gcc agg ccc gcc ctg ctg acg tcc aga ctc cgc ttc atc His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile 610 615 620	1930
ccc aag cct gac ggg ctg cgg ccg att gtg aac atg gac tac gtc gtg Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val 625 630 635 640	1978
gga gcc aga acg ttc cgc aga gaa aag agg gcc gag cgt ctc acc tcg Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser 645 650 655	2026

Figura 10C

agg gtg aag gca ctg ttc agc gtg ctc aac tac gag cgg gcg cgg cgc	2074
Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg	
660 665 670	
ccc ggc ctc ctg ggc gcc tct gtg ctg ggc ctg gac gat atc cac agg	2122
Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg	
675 680 685	
gcc tgg cgc acc ttc gtg ctg cgt gtg cgg gcc cag gac ccg ccg cct	2170
Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro	
690 695 700	
gag ctg tac ttt gtc aag gtg gat gtg acg ggc gcg tac gac acc atc	2218
Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile	
705 710 715 720	
ccc cag gac agg ctc acg gag gtc atc gcc agc atc atc aaa ccc cag	2266
Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln	
725 730 735	
aac acg tac tgc gtg cgt cgg tat gcc gtg gtc cag aag gcc gcc cat	2314
Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His	
740 745 750	
ggg cac gtc cgc aag gcc ttc aag agc cac gtc tct acc ttg aca gac	2362
Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp	
755 760 765	
ctc cag ccg tac atg cga cag ttc gtg gct cac ctg cag gag acc agc	2410
Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser	
770 775 780	
ccg ctg agg gat gcc gtc gtc atc gag cag agc tcc tcc ctg aat gag	2458
Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu	
785 790 795 800	
gcc agc agt ggc ctc ttc gac gtc ttc cta cgc ttc atg tgc cac cac	2506
Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His	
805 810 815	
gcc gtg cgc atc agg ggc aag tcc tac gtc cag tgc cag ggg atc ccg	2554
Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro	
820 825 830	
cag ggc tcc atc ctc tcc acg ctg ctc tgc agc ctg tgc tac ggc gac	2602
Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp	
835 840 845	
atg gag aac aag ctg ttt gcg ggg att cgg cgg gac ggg ctg ctc gtg	2650
Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Val	
850 855 860	
aca cct cac ctc acc cac gcg aaa acc ttc ctc agg acc ctg gtc cga	2698
Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg	
865 870 875 880	

Figura 10D

ggt gtc cct gag tat ggc tgc gtg gtg aac ttg cgg aag aca gtg gtg	2746
Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val	
885 890 895	
aac ttc cct gta gaa gac gag gcc ctg ggt ggc acg gct ttt gtt cag	2794
Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln	
900 905 910	
atg ccg gcc cac ggc cta ttc ccc tgg tgc ggc ctg ctg ctg gat acc	2842
Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr	
915 920 925	
cgg acc ctg gag gtg cag agc gac tac tcc agc tat gcc cgg acc tcc	2890
Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser	
930 935 940	
atc aga gcc agt ctc acc ttc aac cgc ggc ttc aag gct ggg agg aac	2938
Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn	
945 950 955 960	
atg cgt cgc aaa ctc ttt ggg gtc ttg cgg ctg aag tgt cac agc ctg	2986
Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu	
965 970 975	
ttt ctg gat ttg cag gtg aac agc ctc cag acg gtg tgc acc aac atc	3034
Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile	
980 985 990	
tac aag atc ctc ctg ctg cag gcg tac agg ttt cac gca tgt gtg ctg	3082
Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu	
995 1000 1005	
cag ctc cca ttt cat cag caa gtt tgg aag aac ccc aca ttt ttc	3127
Gln Leu Pro Phe His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe	
1010 1015 1020	
ctg cgc gtc atc tct gac acg gcc tcc ctc tgc tac tcc atc ctg	3172
Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu	
1025 1030 1035	
aaa gcc aag aac gca ggg atg tcg ctg ggg gcc aag ggc gcc gcc	3217
Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala	
1040 1045 1050	
ggc cct ctg ccc tcc gag gcc gtg cag tgg ctg tgc cac caa gca	3262
Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala	
1055 1060 1065	
ttc ctg ctc aag ctg act cga cac cgt gtc acc tac gtg cca ctc	3307
Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu	
1070 1075 1080	
ctg ggg tca ctc agg aca gcc cag acg cag ctg agt cgg aag ctc	3352
Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu	
1085 1090 1095	

Figura 10E

ccg ggg	acg acg	ctg act	gcc	ctg gag	gcc gca	gcc	aac ccg	gca	3397
Pro Gly	Thr Thr	Leu Thr	Ala	Leu Glu	Ala Ala	Ala	Asn Pro	Ala	
1100			1105			1110			
ctg ccc	tca gac	ttc aag	acc	atc ctg	gac tga	tggtccacccg			3440
Leu Pro	Ser Asp	Phe Lys	Thr	Ile Leu	Asp				
1115			1120						
cccacagcca	ggccgagagc	agacaccagc	agccctgtca	cgccggggctc	tacgtcccag				3500
ggaggggaggg	gcggcccaca	cccaggccccg	caccgctggg	agtctgagggc	ctgagtgagt				3560
gtttggccga	ggcctgcatg	tccggctgaa	ggctgagtggt	ccggctgagg	cctgagcgag				3620
tgtccagcca	agggctgagt	gtccagcaca	cctgccgtct	tcacttcccc	acaggctggc				3680
gctcggctcc	accccagggc	cagcttttcc	tcaccaggag	cccggcttcc	actccccaca				3740
taggaatagt	ccatccccag	attcgccatt	gttcacccct	cgccctgccc	tcctttgcct				3800
tccacccccca	ccatccaggt	ggagaccctg	agaaggaccc	tggtgagctct	gggaatttgg				3860
agtgacaaaa	ggtgtgccct	gtacacaggc	gaggaccctg	cacctggatg	gggggtccctg				3920
tggtgtcaaat	tggtggggagg	tgctgtggga	gtaaaatact	gaatatatga	gtttttcagt				3980
tttgaaaaaaa	a								3991

Figura 10F