

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 772**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08831632 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2200634**

54 Título: **El interferón dirigido demuestra potentes actividades apoptóticas y antitumorales**

30 Prioridad:

21.09.2007 US 994717 P

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

28.05.2015

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**MORRISON, SHERIE L.;
HUANG, TZU-HSUAN y
XUAN, CAIYUN**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 536 772 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

El interferón dirigido demuestra potentes actividades apoptóticas y antitumorales

5 Antecedentes de la invención

[0001] Aunque las respuestas inmunes espontáneas contra los antígenos asociados a tumores (TAA) (Hrouda *et al.* (1999) *Semin. Oncol.* 26: 455-471) se pueden detectar (Disis *et al.* (1997) *J. Clin. Oncol.* 15: 3363-3367), las células malignas que causan la enfermedad no generan una respuesta inmune que conduzca al rechazo. Muchos estudios han demostrado que es posible mejorar la inmunogenicidad de las células tumorales mediante la introducción de moléculas inmunoestimulantes tales como citocinas y moléculas coestimulantes en las mismas (Dranoff y Mulligan (1995) *Adv. Immunol.* 58: 417-454; Hrouda *et al.* (1999) *Semin. Oncol.* 26: 455-471; Hurford *et al.* (1995) *Nat. Genet.* 10: 430-435). Sin embargo, la transferencia génica eficaz sigue siendo todo un reto. Además, la erradicación de las células cancerosas residuales puede requerir la dirección de depósitos tumorales micrometastásicos muy dispersos que no son accesibles a la transferencia directa de genes.

[0002] Las respuestas inmunes tanto innata como adaptativa son esenciales para proporcionar protección contra los patógenos infecciosos y los tumores. La comunicación entre la inmunidad innata y la adaptativa está regulada por las interacciones entre las células y las citocinas. Las citocinas producidas por las células del sistema inmune innato pueden, directa o indirectamente, activar las células de la respuesta inmune adaptativa, y pueden desempeñar un papel importante en la generación de la inmunidad antitumoral protectora (Belardelli y Ferrantini (2002) *Trends Immunol.* 23: 201-208). Para la activación del sistema inmune innato es primordial la detección de productos bacterianos o señales de "peligro" que conduzcan a la liberación de citocinas proinflamatorias tales como IFN- α , TNF- α e IL-1.

[0003] El IFN- α es una citocina proinflamatoria con potentes actividades antivirales e inmunomoduladoras, y es un estimulador de la diferenciación y la actividad de las células dendríticas (DC) (Santini *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 191: 1777-1788). Los IFN de tipo I (IFN- α y IFN- β) tienen múltiples efectos en la respuesta inmune (Theofilopoulos *et al.* (2005) *Annu. Rev. Immunol.* 23: 307-336). El IFN- α desempeña un papel en la diferenciación de los linfocitos Th1 (Finkelman *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174: 1179-1188) y la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T CD8+ en respuesta a determinados antígenos (Tough *et al.* (1996) *Science* 272: 1947-1950).

[0004] Múltiples estudios han demostrado que los IFN también son capaces de ejercer efectos antitumorales, tanto en modelos animales (Ferrantini *et al.* (1994) *J. Immunol.* 153: 4604-4615) como en los pacientes con cáncer (Gutterman *et al.* (1980) *Ann. Intern. Med.* 93: 399-406). Además de mejorar la respuesta inmunitaria antitumoral adaptativa, el IFN- α puede aumentar la expresión del gen supresor tumoral p53 (Takaoka *et al.* (2003) *Nature* 424: 516-523), inhibir la angiogénesis (Sidky y Borden (1987) *Cancer Res.* 47: 5155-5161) y potenciar la apoptosis (Rodríguez-Villanueva y McDonnell (1995) *Int. J. Cancer* 61: 110-111 417) en las células tumorales. Aunque estas propiedades sugieren que el IFN- α debería ser un eficaz agente terapéutico para el tratamiento del cáncer, su corta semivida y la toxicidad sistémica han limitado su uso. Huang ("Dissertation", 1 de enero de 2006, páginas 1-120) proporcionó IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN α de para el tratamiento del linfoma de linfocitos B.

Resumen de la invención

[0005] La invención es como se proporciona en las reivindicaciones.

[0006] En diversas realizaciones, la presente divulgación se refiere al descubrimiento de que al unir un interferón a un resto de dirección (por ejemplo, una molécula que se une específica y/o preferentemente a un marcador en o asociado con una célula) se mejora sustancialmente la eficacia terapéutica del interferón y parece que se reduce la toxicidad sistémica. Por consiguiente, en diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona una construcción química que comprende un interferón unido a un anticuerpo que es una inmunoglobulina intacta que se une específicamente a CD20, en la que el anticuerpo se une al interferón mediante un enlazador peptídico resistente a la proteólisis que tiene la secuencia de aminoácidos SGGGS (SEC ID N° 58), y en la que la construcción, cuando se pone en contacto con una célula tumoral produce la muerte o la inhibición del crecimiento o de la proliferación de la célula tumoral. La construcción puede ser para su uso en el tratamiento del cáncer.

[0007] Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la construcción comprende un interferón (por ejemplo, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , etc.) unido a un resto de dirección que se une a un antígeno asociado al tumor (TAA), donde la construcción, cuando entra en contacto con una célula tumoral provoca la muerte o la inhibición del crecimiento o de la proliferación de la célula tumoral. En diversas realizaciones, el interferón es un interferón de tipo 1. En diversas realizaciones, el interferón es un interferón de tipo 2. En diversas realizaciones, el interferón es un interferón- α , un interferón- β o un interferón- γ . El enlazador es un enlazador que es resistente o sustancialmente resistente a la proteólisis. En ciertas realizaciones, la construcción es una proteína de fusión expresada recombinantemente. El anticuerpo se une a CD20. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario que comprende las CDR y/o las regiones variables de un anticuerpo seleccionado del grupo que

consiste en anti-CD20 (Rituximab), Ibritumomab tiuxetan, tositumomab, AME-133v, Ocrelizumab, Ofatumumab, TRU-015, IMMU-106 y similares. El anticuerpo es una IgG (por ejemplo, IgG1, IgG3, etc.) o una IgE.

[0008] También se proporcionan formulaciones farmacéuticas. En diversas realizaciones, las formulaciones comprenden la construcción quimérica según lo descrito anteriormente (y/o más adelante en el presente documento). En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación de dosificación unitaria. En ciertas realizaciones, la formulación es una fórmula para la administración parenteral. En ciertas realizaciones, la formulación es una fórmula para la administración por una vía seleccionada del grupo que consiste en la administración oral, administración intravenosa, administración intramuscular, administración tumoral directa, inhalación, administración rectal, administración vaginal, administración transdérmica y administración de depósito subcutáneo.

[0009] También se proporciona la construcción descrita anteriormente para su uso en métodos de inhibición del crecimiento y/o de la proliferación de una célula cancerosa. Por lo general, los métodos implican poner en contacto la célula cancerosa con una construcción quimérica como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula metastásica y/o una célula que está en un tumor sólido. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula cancerosa de mama. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es un linfoma de linfocitos B. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula producida por un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un linfoma de linfocitos B, cáncer de pulmón, un cáncer de bronquios, un cáncer colorrectal, un cáncer de próstata, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un cáncer de estómago, un cáncer de ovario, un cáncer de la vejiga urinaria, un cáncer del sistema nervioso central o cerebro, un cáncer del sistema nervioso periférico, un cáncer de esófago, un cáncer cervical, un melanoma, un cáncer uterino o endometrial, un cáncer de la cavidad oral o la faringe, un cáncer de hígado, un cáncer de riñón, un cáncer de las vías biliares, un cáncer del intestino delgado o del apéndice, un cáncer de la glándula salival, un cáncer de la glándula tiroides, un cáncer de la glándula suprarrenal, un osteosarcoma, un condrosarcoma, un liposarcoma, un cáncer de testículos y una histiocitoma fibroso maligno. En diversas realizaciones, la puesta en contacto comprende administrar sistémicamente el resto quimérico a un mamífero. En ciertas realizaciones, la puesta en contacto comprende administrar el resto quimérico directamente en un sitio tumoral. En ciertas realizaciones, la puesta en contacto comprende la administración intravenosa del resto quimérico. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula cancerosa de un ser humano o un mamífero no humano.

[0010] También se desvelan ácidos nucleicos que codifican las construcciones quiméricas descritas en el presente documento. El ácido nucleico puede codificar una proteína de fusión según lo descrito anteriormente. El interferón codificado por el ácido nucleico puede ser un interferón de tipo I. El interferón puede ser IFN- α o interferón- β . El ácido nucleico codifica un enlazador peptídico (por ejemplo, como el descrito en el presente documento) que une el anticuerpo al interferón. El ácido nucleico puede codificar las CDR y/o las regiones variables para anti-CD20 (rituximab).

[0011] También se desvela una célula que comprende un ácido nucleico según lo descrito anteriormente, que codifica una construcción quimérica. La célula puede expresar la construcción quimérica.

[0012] También se proporciona una construcción quimérica según lo descrito en el presente documento para su uso en la inhibición del crecimiento y/o de la proliferación de una célula cancerosa.

[0013] En ciertas realizaciones, las construcciones descritas en el presente documento se pueden usar en el tratamiento de patologías tales como la esclerosis múltiple, la vasculitis mediada por el VHC, y similares.

Definiciones

[0014] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. El término también incluye variantes en el enlace peptídico tradicional que unen los aminoácidos que constituyen el polipéptido. Los "péptidos", los "polipéptidos" y las "proteínas" son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos α están ligados a través de enlaces peptídicos. Por lo tanto, el aminoácido terminal de un extremo de la cadena (amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal del otro extremo de la cadena (carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como se usa en el presente documento, la expresión "extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo α -amino libre de un aminoácido del extremo amino de un péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación del péptido. Del mismo modo, la expresión "extremo carboxi" se refiere al grupo carboxilo libre del extremo carboxi de un péptido o el grupo carboxilo de un aminoácido de cualquier otra ubicación del péptido. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido incluyendo, pero sin limitación, miméticos de péptidos tales como aminoácidos unidos por un éter en lugar de un enlace de amida.

[0015] Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante κ , λ , α , γ , δ , ϵ y μ , así como millares de genes de región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican bien como κ o λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ , o ϵ , que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

[0016] Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones "cadena ligera variable (V_L)" y "cadena pesada variable (V_H)" se refieren a estas regiones de las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

[0017] Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas o expresadas *de novo*. Así pues, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro de la región bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que, en sí mismo, es una cadena ligera unida a V_H - C_H1 por un enlace de disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región bisagra convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, Nueva York (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto apreciará que dichos fragmentos Fab' se pueden sintetizar *de novo* bien químicamente o mediante la utilización de la metodología del ADN recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo bien producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante, incluyendo, pero sin limitación, $F(ab)_2$, IgG, IgM, IgA, IgE, scFv, dAb, nanocuerpos, unicuerpos y diacuerpos. En diversas realizaciones, los anticuerpos preferidos incluyen, pero sin limitación, IgG, IgM, IgA y IgE.

[0018] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos usados en las construcciones de la presente invención pueden ser biespecíficos. Los anticuerpos o fragmentos biespecíficos pueden ser de varias configuraciones. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden parecer a los anticuerpos individuales (o fragmentos de anticuerpos), pero tener dos sitios de unión al antígeno (regiones variables) diferentes. En diversas realizaciones, se pueden producir anticuerpos biespecíficos mediante técnicas químicas (Kranz *et al.* (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 78: 5807), mediante técnicas de "polidoma" (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.474.893) o mediante técnicas de ADN recombinante. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes, siendo al menos uno de ellos un antígeno asociado al tumor. En diversas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos también pueden ser heteroanticuerpos. Los heteroanticuerpos son dos o más anticuerpos, o fragmentos de unión al anticuerpo (por ejemplo, Fab) unidos entre sí, teniendo cada anticuerpo o fragmento una especificidad diferente.

[0019] Un "sitio de unión al antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por restos de aminoácidos de las regiones variables ("V") N-terminales de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones hipervariables", que están intercalados entre los tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural entre y adyacentes a regiones hipervariables de inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas unas con respecto a otras en un espacio tridimensional para formar una "superficie" de unión al antígeno. Esta superficie media el reconocimiento y la unión del antígeno diana. Las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", y han sido caracterizadas, por ejemplo, por Kabat *et al.* "Sequences of proteins of immunological interest", IV ed. U.S. Dept. Health and Human Services, Public Health Services, Bethesda, MD (1987).

[0020] El término "interferón" se refiere a un interferón de longitud completa o a un fragmento de interferón (interferón truncado) o mutante de interferón, que conserva sustancialmente la actividad biológica del interferón de tipo silvestre de longitud completa (por ejemplo, conserva al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, 98 % o 99 % del anticuerpo de longitud completa). Los interferones incluyen interferones de tipo I (por ejemplo, interferón- α e interferón- β), así como interferones de tipo II (por ejemplo, interferón- γ). El interferón (por ejemplo, IFN- α) puede ser esencialmente de cualquier especie de mamífero. En ciertas realizaciones preferidas, el interferón es de una especie seleccionada del grupo que consiste en humano, equino, bovino, de roedor, porcino, lagomorfo, felino, canino, murino, caprino, ovino, un primate no humano, y similares. En diversas realizaciones, el interferón mutado comprende una o más sustituciones, inserciones y/o delecciones de aminoácidos.

[0021] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o animal no humano, incluyendo, pero sin limitación, un gato, perro, caballo, cerdo, vaca, oveja, cabra, conejo, ratón, rata o mono.

- 5 **[0022]** "CD20" es una fosfoproteína no glucosilada expresada en la superficie de los linfocitos B maduros (véase, por ejemplo, Cragg *et al.* (2005) *Curr. Dir. Autoimmun.*, 8: 140-174). También se encuentra en los linfomas de linfocitos B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B sobre células madre de cáncer de piel/de melanoma, y similares.
- 10 **[0023]** La expresión "inhibición y/o proliferación del crecimiento" de una célula cancerosa se refiere a la reducción de la velocidad del crecimiento y/o la velocidad de la proliferación de una célula cancerosa. En ciertas realizaciones, esto incluye la muerte de una célula cancerosa (por ejemplo, mediante apoptosis). En ciertas realizaciones dicha expresión también se refiere a la inhibición del crecimiento y/o la proliferación de un tumor sólido y/o la inducción de la reducción del tamaño del tumor o la eliminación del tumor.
- 15 **[0024]** La expresión "marcador de cáncer" se refiere a biomoléculas tales como proteínas, hidratos de carbono, glucoproteínas, y similares, que se expresan exclusiva o preferente o diferencialmente en una célula cancerosa y/o se encuentran en asociación con una célula cancerosa y, por lo tanto, proporcionan dianas preferidas o específicas para el cáncer. En diversas realizaciones la expresión preferida puede ser la expresión preferida en comparación
- 20 con cualquier otra célula del organismo, o la expresión preferida de una determinada zona del organismo (por ejemplo, de un determinado órgano o tejido).

Breve descripción de las figuras

- 25 **[0025]** Las Figuras 1A-1O muestran las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para diversas construcciones descritas en el presente documento. La Fig. 1A muestra las secuencias de aminoácidos para cadena pesada de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN α (SEC ID N° 1) y cadena ligera de IgG3 anti-HER2/*neu* (SEC ID N° 2). El subrayado sencillo es enlazador, el doble subrayado es IFN- α murino, sin subrayado es anti-HER2/*neu*. Fig. 1B: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 3), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) de la cadena ligera de α CD20; Fig. 1C: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 5), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 6) del enlazador Gly₄Ser de α CD20-IgG3-mulFN α ; Fig. 1D: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 7), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 8) del enlazador α helicoidal de α CD20-IgG3-mulFN α ; Fig. 1E: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 9), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 10) del enlazador Gly₄Ser de α CD20-IgG3-hulFN α ; Fig. 1F: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 11), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 12) del enlazador α helicoidal de α CD20-IgG3-hulFN α ; Fig. 1G: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 13), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 14) del enlazador Gly₄Ser de α CD20-IgG1-mulFN α ; Fig. 1H: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 15), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 16) del enlazador α helicoidal de α CD20-IgG1-mulFN α ; Fig. 1I: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 17), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 18) del enlazador Gly₄Ser de α CD20-IgG1-hulFN α ; Fig. 1J: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 19), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 20) del enlazador α helicoidal de α CD20-IgG1-hulFN α ; Fig. 1K: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 21), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 22) de la cadena ligera de α Her2/*neu*; Fig. 1L: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 23), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 24) del enlazador glyser de α Her2/*neu*-IgG1-mulFN α ; Fig. 1M: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 25), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 26) del enlazador α helicoidal α Her2/*neu*-IgG1-mulFN α ; Fig. 1N: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 27), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 28) del enlazador glyser de α Her2/*neu*-IgG1-hulFN α ; Fig. 1O: Secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 29), secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 30) del enlazador α helicoidal de α Her2/*neu*-IgG1-hulFN α . Se apreciará que aunque las construcciones de la presente figura se muestran con enlazadores particulares, en ciertas realizaciones, se pueden sustituir con otros enlazadores como se describe en el presente documento.
- 50 **[0026]** Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D ilustran la construcción y caracterización de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN α . Figura 2A: Diagrama esquemático de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α . Las zonas rellenas representan las regiones variables de anti-HER2/*neu*. Las zonas sin rellenar representan las regiones constantes κ e IgG3 humana. Las regiones circulares blancas representan IFN- α murino. Figura 2B: SDS-PAGE de IgG3 anti-HER2/*neu* purificada (carriles 1 y 4), IgG3-IFN- α (carriles 2 y 5) y IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α (carriles 3 y 6) en condiciones no reductoras (carriles 1-3) o reductoras (carriles 4-6). A la izquierda de cada gel, se muestran las proteínas marcadoras del peso molecular. Figura 2C: IgG3 anti-HER2/*neu* e IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α se unen a HER2/*neu*. Se hizo reaccionar CT26/HER2, una línea celular de colon murino que expresa altos niveles de HER2/*neu* humano, con IgG3 anti-HER2/*neu*, IgG3-IFN- α o IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α con o sin heparina seguida IgG anti-humana de conejo marcada con PE. Las líneas discontinuas representan la señal de las células sin la adición de proteína recombinante. Figura 2D: Actividad protectora del patrón de IFN- α y diferentes proteínas de fusión IFN- α contra VSV. Se prepararon diluciones de 1 U de patrón de IFN- α , 0,21 ng (10 pM) de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α , 0,21 ng (10 pM) de IgG3-IFN- α o 0,17 ng (10 pM) de IgG3 anti-HER2/*neu* en 100 μ l y se añadieron a células L-929. Tras una incubación de 24 h, se añadieron 4.000 PFU de VSV. Cuarenta y ocho horas más tarde, se tiñeron las células viables con el colorante cristal violeta, se disolvieron por metanol y se detectó el tinte solubilizado usando un lector de ELISA a 570 nm.

[0027] Las Figuras 3A y 3B muestran la actividad antitumoral *in vivo* de diferentes proteínas de fusión IFN- α y rIFN- α . Se desafiaron ratones C3H/HeN s.c con 1×10^3 células 38C13/HER2 y se trataron i.p. bien con 2,5 μ g (Fig. 3A) o 1 μ g (Fig. 3B) de las proteínas indicadas en los días 1, 3 y 5 después de la exposición del tumor. Se midió el volumen del tumor de cada ratón. Los animales se observaron hasta que el diámetro del tumor s.c. hubo alcanzado 15 mm.

[0028] Las Figuras 4A y 4B muestran que la fusión de IgG3 con IFN- α mejoró su actividad antitumoral y aumentó su semivida *in vivo*. Figura 4A: Se trataron los ratones con 9.600 U de rIFN- α o 9.600 U (4 μ g) de IgG3-IFN- α en los días 1 y 3 después de la exposición del tumor. Se hizo un seguimiento de la supervivencia de los animales y se sacrificaron cuando el diámetro del tumor s.c. alcanzó 15 mm. Figura 4B: Grupos de tres ratones C3H/HeN recibieron por inyección i.p. 66 μ Ci de rIFN- α marcado con 125 I, IgG3-IFN- α o IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α . A varios intervalos de la inyección de las proteínas marcadas con 125 I, se midió la radiactividad residual usando un contador de cuerpo entero murino. Los resultados representan la media de tres ratones. Barras, D.E.

[0029] Las Figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran que las proteínas de fusión IFN- α inhibieron la proliferación celular e indujeron la apoptosis en células 38C13/HER2 *in vitro*. Las proteínas de fusión IFN- α inhibieron la proliferación de las células tumorales. Tras la incubación durante 48 h con diferentes dosis de las diferentes proteínas de fusión, se midieron las células 38C13/HER2 viables (Fig. 5A) o 38C13 (Fig. 5B) usando el ensayo de MTS. Estos experimentos se realizaron tres veces por triplicado; barras de error, D.E. de las mediciones. Figura 5C: Las proteínas de fusión IFN- α inducen la apoptosis en células 38C13/HER2. En resumen, se incubaron 1×10^6 células 38C13/HER2 con 1 nM de las proteínas indicadas durante 72 h. A continuación, se lavaron las células, se tiñeron con Alexa Fluor 488, anexina V y PI, y se analizaron por citometría de flujo. En la esquina, se indica el porcentaje de células situadas en cada cuadrante. Figura 5D: Las proteínas de fusión IFN- α inhibieron la proliferación de células 38C13/HER2 supervivientes. En resumen, se marcaron 1×10^6 células 38C13/HER2 con CFSE 2,5 μ M y se fijaron de inmediato (línea discontinua) o se trataron con PBS (línea fina de color negro) o 1 nM bien de IgG3 anti-HER2/*neu* (línea fina de color negro, se solapa con el control de PBS), IgG3-IFN- α (línea gruesa de color negro) o IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α (zona de color negro) durante 48 h. A continuación, se lavaron las células y se analizaron por citometría de flujo. El histograma se obtuvo con la ventana de análisis en la población de células vivas.

[0030] Figuras 6A, 6B y 6C muestran que las proteínas de fusión IFN- α indujeron la activación de STAT1 en las células 38C13/HER2. En resumen, se trataron 1×10^7 células 38C13/HER2 con 1.000 U/ml bien de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α (Fig. 6A) o IgG3-IFN- α (Fig. 6B) durante los tiempos indicados. Se separaron los lisados celulares mediante SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-phosphoSTAT1. Para confirmar la igualdad de carga de las muestras de proteínas, se sondaron las transferencias con un Ac policlonal de ratón conjugado con HRP contra GAPDH. Figura 6C: Se normalizó la intensidad de antiphosphoSTAT1 con la intensidad de anti-GAPDH para cada punto temporal indicado, y se dividieron los valores obtenidos entre el valor en el punto temporal 0 para obtenerse las veces de activación para STAT1. Estos experimentos se realizaron dos veces; barras de error, D.E. de las mediciones. *, único punto donde los dos grupos difieren con una $p < 0,05$.

[0031] Figura 7. Las proteínas de fusión IFN- α inhiben el crecimiento del tumor establecido. Ratones C3H/HeN recibieron por inyección s.c. 1×10^3 células 38C13/HER2. Después de 12 días, se trataron los ratones i.p. con 5 μ g de la proteína indicada durante 3 días consecutivos. Se midió el volumen del tumor de cada ratón. Los animales se sacrificaron cuando el diámetro del tumor s.c. hubo alcanzado 15 mm.

[0032] La Figura 8 muestra la unión de anticuerpos recombinantes con células humanas que expresan CD20. Se incubaron células Daudi bien con IgG3 recombinante o Rituximab seguidos por IgG anti-humana de rata biotinilada y estreptavidina marcada con PE, y se analizaron por citometría de flujo. A, células con solo el anticuerpo secundario; B, células con IgG3 recombinante; C, células con Rituximab.

[0033] La Figura 9 muestra un diagrama de la cadena pesada del anticuerpo-proteína de fusión IFN- α . En particular, la figura ilustra que el acortamiento de (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N° 31) hasta un enlazador Gly₄Ser (SEC ID N° 32) permite la producción de α CD20-IgG3-mIFN α de longitud completa.

[0034] La Figura 10 muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la proteína A sefarosa. Se hicieron pasar los sobrenadantes de cultivo de las células que expresaban IgG3 anti-CD-20-IFN- α con el enlazador (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N° 31) a través de la proteína A sefarosa y la proteína de fusión unida antes de la elución. A. Las proteínas se procesaron sin reducción. Carril 1, IgG3; carriles 2-6, fracciones eluidas de la proteína A sefarosa. B. Las proteínas se redujeron antes del análisis. Carril 2, IgG3; Carriles 3-7, fracciones eluidas de la proteína A sefarosa.

[0035] La Figura 11 muestra el análisis SDS-PAGE de las proteínas producidas mediante la expresión transitoria en células HEK293T. Carril 1, IgG3 anti-CD20-huIFN- α con enlazador (Gly₄Ser)₃ extendido (SEC ID N° 31); Carril 2, IgG3 anti-CD20-huIFN- α con enlazador Gly₄Ser acortado (SEC ID N° 32); Carril 3, IgG3 anti-CD20-muIFN- α con enlazador (Gly₄Ser)₃ extendido (SEC ID N° 31); Carril 4, IgG3 anti-CD20-muIFN- α con enlazador Gly₄Ser acortado;

Carril 5, IgG3 anti-CD20.

[0036] La Figura 12 muestra un análisis de la proteína de unión a las células Daudi usando citometría de flujo. Se tiñeron 1×10^6 células Daudi con $1 \mu\text{g}$ de proteína de fusión que contenía IFN- α humano o Rituxan.

[0037] La Figura 13 muestra un análisis de la unión de la proteína a 38C13/CD20 por citometría de flujo.

[0038] Figura 14. Se incubaron células Daudi con varias concentraciones de IFN- α , anticuerpo o proteína de fusión durante 72 h. Se evaluó la inhibición del crecimiento usando el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 Aqueous.

[0039] Figura 15. Se trataron células Daudi con 10 pM de las proteínas indicadas durante 72 horas. Se determinaron la viabilidad celular y la apoptosis tras la tinción con anexina V y PI, y el análisis por citometría de flujo.

[0040] Figura 16. Se trataron células 38C13/CD20 con 10 pM de las proteínas indicadas durante 48 horas. Se determinaron la viabilidad celular y la apoptosis tras la tinción con anexina V y PI, y el análisis por citometría de flujo.

[0041] Figura 17. Inhibición de la proliferación celular después del tratamiento con distintas proteínas a concentraciones variables. Se trataron las células 38C13-CD20 con las proteínas indicadas a concentraciones variables durante 48 horas. Después del tratamiento, se monitorizó el grado de proliferación usando el ensayo de MTS.

[0042] Figura 18. Se trataron células 38C13/CD20 con las diferentes concentraciones de las proteínas indicadas durante 48 horas. Se determinaron la viabilidad celular y la apoptosis tras la tinción con anexina V y PI, y el análisis por citometría de flujo.

[0043] Figura 19. Se incubaron células Daudi durante 72 horas con diferentes concentraciones de la proteína de fusión. Se determinaron la viabilidad celular y la apoptosis tras la tinción con anexina V y PI, y el análisis por citometría de flujo.

[0044] Figura 20. Se trataron células Daudi durante 72 horas con diversas concentraciones de proteínas de fusión. Se añadió solución MTS para cuantificar la viabilidad celular.

[0045] Figura 21. Se incubaron células Daudi durante 72 horas con 1 pM de IgG3 anti-CD20-hIFN α con el enlazador Gly₄Ser (32) (enlazador Gly-Ser) o con 1 pM de IgG3 anti-CD20-hIFN α con el enlazador α helicoidal (enlazador helicoidal α). Se determinaron la viabilidad celular y la apoptosis tras la tinción con anexina V y PI, y el análisis por citometría de flujo.

[0046] La Figura 22 muestra la supervivencia de ratones inoculados con 5.000 células 38C13-CD20 y tratados en los días 1, 2 y 3 con HBSS o las cantidades indicadas de las proteínas de fusión anti-CD20-IFN- α .

[0047] La Figura 23 muestra la supervivencia de ratones inoculados con 5.000 células 38C13-CD20 y tratados en los días 5, 6 y 7 con $10 \mu\text{g}$ de IgG1 anti-CD20, IgG3 anti-CD20, Rituximab o IgG3 anti-CD20-mIFN α .

[0048] Figura 24. Supervivencia de los ratones inoculados con 5.000 células 38C13-CD20 y tratados en los días 5, 6 y 7 con $10 \mu\text{g}$ de IgG3 anti-CD20, IgG3 anti-CD20 + IFN α , IgG3 anti-DNS o IgG3 anti-CD20-mIFN α .

[0049] Figura 25. Grupos de ocho ratones recibieron por inyección 5.000 células 38C13-CD20 en los días 0. En los días 8, 9 y 10 se trataron con HBSS o $100 \mu\text{g}$ de IgG3 anti-CD20-mIFN α . Se monitorizó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

[0050] Figura 26. Grupos de ocho ratones recibieron por inyección 5.000 células 38C13-CD20 en los días 0. En los días 8, 9 y 10, se trataron con HBSS o $100 \mu\text{g}$ de IgG3 anti-CD20-mIFN α . Se controló la supervivencia a lo largo del tiempo.

Descripción detallada

[0051] El interferón α (IFN- α) es una citocina importante en la iniciación de la respuesta inmune innata y también demuestra un amplio espectro de actividades antitumorales. No obstante, el uso clínico del interferón (por ejemplo, IFN- α) como fármaco contra el cáncer se ve obstaculizado por su corta semivida, lo que compromete significativamente su efecto terapéutico. En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere al descubrimiento de que es posible mejorar el índice terapéutico del interferón uniéndolo a un resto de dirección que se una específica/preferentemente a un marcador en o asociado con la célula diana (por ejemplo, una célula tumoral). Esto permite la administración de dosis más elevadas de interferón en el sitio diana con menos complicaciones sistémicas. Esto se ilustró mediante la construcción y el uso de una proteína de fusión que consiste en una IgG3 anti-HER2/*neu* e IFN- α (IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α) y mediante la construcción y el uso de una proteína

de fusión anti-CD20-IFN- α .

[0052] La eficacia de las construcciones de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α se ensayó en un linfoma de linfocitos B murino, 38C13, transducido con HER2/*neu* humano. La proteína de fusión IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α presenta un potente efecto en la inhibición del crecimiento de tumores 38C13/HER2 *in vivo*, e incluso la administración de 1 μ g de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α produjo un 88 % de supervivientes a largo plazo tras la exposición del tumor.

[0053] Sorprendentemente, IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α demostró una potente actividad contra tumores 38C13/HER2 establecidos, observándose la remisión completa del tumor en el 88 % de los ratones tratados. Esta espectacular actividad antitumoral fue mediada por la apoptosis inducida por IFN- α , y la dirección de IFN- α a células tumorales 38C13/HER2 por el anticuerpo IgG3 anti-HER2/*neu* fue esencial para potenciar estos efectos.

[0054] Se observaron resultados similares para la construcción de IgG3 anti-CD20-IFN- α (véase, Ejemplo 2). Estos resultados indican que la unión (por ejemplo, la fusión) de un interferón (por ejemplo, IFN- α) con un resto de dirección (por ejemplo, con un anticuerpo específico del tumor) produce un agente terapéutico eficaz que se puede usar para inhibir el crecimiento y/o la proliferación o incluso para matar a la/s célula/s diana. Así pues, por ejemplo, las construcciones ejemplares descritas en el presente documento se pueden usar fácilmente para el tratamiento del linfoma de linfocitos B y otros tipos de cáncer en el entorno clínico.

[0055] Por lo tanto, la presente invención proporciona una construcción quimérica que comprende un interferón unido a un anticuerpo que es una inmunoglobulina intacta que se une específicamente a CD20, en la que el anticuerpo se une al interferón mediante un enlazador peptídico resistente a la proteólisis que tiene la secuencia de aminoácidos SGGGS (SEC ID N° 58), y en la que la construcción, cuando se pone en contacto con una célula tumoral, produce la muerte o la inhibición del crecimiento o de la proliferación de la célula tumoral. También se desvelan ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión, así como células transfectadas con los ácidos nucleicos para expresar las proteínas de fusión. También se desvelan métodos de inhibición del crecimiento y de la proliferación de células cancerosas, así como kits que comprenden, por ejemplo, los restos quiméricos descritos en el presente documento, para el tratamiento de diversos cánceres.

I. Construcciones quiméricas que comprenden un resto de dirección unido a un interferón

[0056] Fue un descubrimiento sorprendente que las construcciones quiméricas que comprenden un resto de dirección (por ejemplo, un anticuerpo marcador antitumoral) unido a un IFN nativo (de tipo silvestre) o modificado (por ejemplo, IFN- α) se pueden usar con eficacia para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células cancerosas diana que expresan o se asocian con el marcador al que se dirige el resto de dirección. En ciertas realizaciones, los restos de dirección se conjugan químicamente con el interferón, mientras que, en otras realizaciones, el resto de dirección se expresa como una proteína de fusión con el IFN- α . Cuando se produce en forma de una proteína de fusión, el componente de resto de dirección (por ejemplo, el anticuerpo) se puede fusionar directamente con el IFN- α o unirse por medio de un enlazador peptídico (por ejemplo, un enlazador (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N°: 31), un enlazador GlyGlyGlyGlySer (SEC ID N°: 32), un AEAAAKEAAKA (SEC ID N°: 33), y similares.

A) Restos de dirección

[0057] El resto de dirección es una molécula que se une específica o preferentemente a un marcador expresado por (por ejemplo, en la superficie de) o asociado con la/s célula/s diana. Aunque la dirección se puede realizar esencialmente hacia cualquier célula, ciertas células preferidas incluyen aquellas asociadas con una patología caracterizada por la hiperproliferación de una célula (es decir, un trastorno hiperproliferativo). Los trastornos hiperproliferativos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, soriasis, neutrofilia, policitemia, trombocitosis y cáncer.

[0058] Los trastornos hiperproliferativos caracterizados como cáncer incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos tales como cáncer de mama, del tracto respiratorio, de cerebro, de órganos reproductores, del tracto digestivo, del tracto urinario, ocular, de hígado, de piel, de cabeza y cuello, de tiroides, de paratiroides y su metástasis a distancia. Estos trastornos también incluyen linfomas, sarcomas y leucemias. Los ejemplos de cáncer de mama incluyen, pero sin limitación, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobular *in situ*. Los ejemplos de cánceres del tracto respiratorio incluyen, pero sin limitación, carcinoma de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, así como adenoma bronquial y blastoma pleuropulmonar. Los ejemplos de cánceres cerebrales incluyen, pero sin limitación, del tallo cerebral y glioma hipotalámico, astrocitoma cerebeloso y cerebral, meduloblastoma, ependimoma, así como tumor neuroectodérmico y pineal. Los tumores de los órganos reproductores masculinos incluyen, pero sin limitación, cáncer de próstata y testicular. Los tumores de los órganos reproductores femeninos incluyen, pero sin limitación, cáncer endometrial, cervical, ovárico, vaginal y vulvar, así como sarcoma del útero. Los tumores del tracto digestivo incluyen, pero sin limitación, anal, de colon, colorrectal, de esófago, de vesícula biliar, gástrico, pancreático, rectal, del intestino delgado y de las glándulas salivales. Los tumores del tracto urinario incluyen, pero sin limitación, cáncer de vejiga, pene, riñón, pelvis renal, uréter y uretral. Los cánceres oculares incluyen, pero sin limitación, melanoma intraocular y retinoblastoma. Los ejemplos de cánceres de hígado incluyen, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular (carcinomas de células hepáticas con o

sin variante fibrolamelar), colangiocarcinoma (carcinoma del conducto biliar intrahepático) y colangiocarcinoma hepatocelular mixto. Los cánceres de piel incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, cáncer de piel de células de Merkel y cáncer de piel no melanoma. Los cánceres de cabeza y cuello incluyen, pero sin limitación, de laringe/hipofaringe/nasofaringe/orofaringe, y cáncer de labio y cavidad oral. Los linfomas incluyen, pero sin limitación, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de no Hodgkin, linfoma cutáneo de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin y linfoma del sistema nervioso central. Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, sarcoma de los tejidos blandos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, linfosarcoma y rhabdomyosarcoma. Las leucemias incluyen, pero sin limitación, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas.

10

[0059] Estos trastornos se han caracterizado bien en seres humanos, pero también existen con una etiología similar en otros mamíferos, y se pueden tratar mediante la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

15 **[0060]** Un resto de dirección es un resto que se une a un marcador de cáncer (por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor). Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de marcadores del cáncer. Los marcadores no necesitan ser únicos para las células cancerosas, sino que también pueden ser eficaces cuando la expresión del marcador está elevada en una célula cancerosa (en comparación con las células sanas normales) o cuando el marcador no está presente a niveles comparables en los tejidos circundantes (especialmente cuando la fracción quimérica se administra a nivel local).

20 **[0061]** Los marcadores del cáncer incluyen, por ejemplo, el marcador tumoral reconocido por el anticuerpo monoclonal ND4. Este marcador se encuentra en el cáncer colorrectal poco diferenciado, así como en tumores neuroendocrinos gastrointestinales (véase, por ejemplo, Tobi *et al.* (1998) "Cancer Detection and Prevention", 22(2): 147-152). Otras dianas importantes para la inmunoterapia del cáncer son las glucoproteínas reguladoras del complemento unido a la membrana: CD46, CD55 y CD59, que se ha encontrado que se expresan en la mayoría de las células tumorales *in vivo* e *in vitro*. Las mucinas humanas (por ejemplo, MUC1) son conocidos marcadores tumorales, como lo son gp100, tirosinasa y MAGE, que se encuentran en el melanoma. El gen del tumor de Wilms de tipo silvestre WT1 se expresa a altos niveles, no solo en la mayoría de las leucemias mielocíticas agudas, 30 linfocíticas agudas y mielocíticas crónicas, sino también en diversos tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de pulmón.

[0062] La leucemia linfocítica aguda ha sido caracterizada por los TAA HLA-Dr, CD1, CD2, CD5, CD7, CD19 y CD20. La leucemia mielógena aguda ha sido caracterizada por los TAA HLA-Dr, CD7, CD13, CD14, CD15, CD33 y 35 CD34. El cáncer de mama ha sido caracterizado por los marcadores EGFR, HER2, MUC1, Tag-72. Diversos carcinomas han sido caracterizados por los marcadores de MUC1, TAG-72 y CEA. La leucemia linfocítica crónica ha sido caracterizada por los marcadores CD3, CD19, CD20, CD21, CD25 y HLA-DR. La leucemia de células pilosas ha sido caracterizada por los marcadores CD19, CD20, CD21, CD25. La enfermedad de Hodgkin ha sido caracterizada por el marcador Leu-M1. Varios melanomas han sido caracterizados por el marcador HMB 45. Los 40 linfomas de no Hodgkins han sido caracterizados por el marcador CD20, CD19 e Ia. Y diversos tipos de cáncer de próstata han sido caracterizados por los marcadores PSMA y SE10.

[0063] Además, muchos tipos de células tumorales muestran antígenos inusuales que son inapropiados para el tipo de célula y/o su entorno, o que normalmente solo están presentes durante el desarrollo de los organismos (por 45 ejemplo, antígenos fetales). Los ejemplos de dichos antígenos incluyen el glucoesfingolípido GD2, un disialogangliósido que normalmente solo se expresa a un nivel significativo en las membranas de la superficie externa de las células neuronales, donde su exposición al sistema inmune está limitada por la barrera hematoencefálica. GD2 se expresa en las superficies de una amplia selección de células tumorales, incluyendo neuroblastoma, meduloblastomas, astrocitomas, melanomas, cáncer de pulmón de células pequeñas, 50 osteosarcomas y otros sarcomas de tejidos blandos. Por lo tanto, GD2 es una diana específica del tumor conveniente para las inmunoterapias.

[0064] Otros tipos de células tumorales muestran receptores de la superficie celular que son raros o están ausentes en las superficies de las células sanas, y que son responsables de la activación de vías de señalización 55 celulares que causan el crecimiento y la división no regulados de la célula tumoral. Los ejemplos incluyen (ErbB2). HER2/*neu*, un receptor de superficie celular constitutivamente activo que se produce a niveles anormalmente elevados en la superficie de las células tumorales del cáncer de mama.

[0065] En la Tabla 1, se proporciona una lista de marcadores tumorales. Los anticuerpos frente a estos y otros 60 marcadores del cáncer son conocidos por los expertos en la materia, y se pueden obtener en el mercado o producir fácilmente, por ejemplo, usando la tecnología de presentación de fagos.

Tabla 1. Marcadores del cáncer y referencias asociadas

Marcador	Referencia
5 α reductasa	Délos <i>et al.</i> (1998) <i>Int J Cancer</i> , 75:6 840-846
α -fetoproteína	Esteban <i>et al.</i> (1996) <i>Tumour Biol.</i> , 17(5): 299-305
AM-1	Harada <i>et al.</i> (1996) <i>Tohoku J Exp Med.</i> , 180(3): 273-288
APC	Dihlmann <i>et al.</i> (1997) <i>Oncol Res.</i> , 9(3) 119-127
APRIL	Sordat <i>et al.</i> (1998) <i>J Exp Med.</i> , 188(6): 1185-1190
BAGE	Böel <i>et al.</i> (1995) <i>Immunity</i> , 2: 167-175.
β -catenina	Hugh <i>et al.</i> (1999) <i>Int J Cancer</i> , 82(4): 504-11
Bcl2	Koty <i>et al.</i> (1999) <i>Lung Cancer</i> , 23(2): 115-127
bcr-abl (b3a2)	Verfaillie <i>et al.</i> (1996) <i>Blood</i> , 87(11): 4770-4779
CA-125	Bast <i>et al.</i> (1998) <i>Int J Biol Markers</i> , 13(4): 179-187
CASP-8/FLICE	Mandruzzato <i>et al.</i> (1997) <i>J Exp Med.</i> , 186(5): 785-793.
Catepsinas	Thomssen <i>et al.</i> (1995) <i>Clin Cancer Res.</i> , 1(7): 741-746
CD19	Scheuermann <i>et al.</i> (1995) <i>Leuk Lymphoma</i> , 18(5-6): 385-397
CD20	Knox <i>et al.</i> (1996) <i>Clin Cancer Res.</i> , 2(3): 457-470
CD21, CD23	Shubinsky <i>et al.</i> (1997) <i>Leuk Lymphoma</i> , 25(5-6): 521-530
CD22, CD38	French <i>et al.</i> (1995) <i>Br J Cancer</i> , 71(5): 986-994
CD33	Nakase <i>et al.</i> (1996) <i>Am J Clin Pathol.</i> , 105(6): 761-768
CD35	Yamakawa <i>et al.</i> (1994) <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD44	Naot <i>et al.</i> (1997) <i>Adv Cancer Res.</i> , 71: 241-319
CD45	Buzzi <i>et al.</i> (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(14): 4027-4035
CD46	Yamakawa <i>et al.</i> (1994) <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD5	Stein <i>et al.</i> (1991) <i>Clin Exp Immunol.</i> , 85(3): 418-423
CD52	Ginaldi <i>et al.</i> (1998) <i>Leuk Res.</i> , 22(2): 185-191
CD55	Spendlove <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 2282-2286.
CD59 (791Tgp72)	Jarvis <i>et al.</i> (1997) <i>Int J Cancer</i> , 71(6): 1049-1055
CDC27	Wang <i>et al.</i> (1999) <i>Science</i> , 284(5418): 1351-1354
CDK4	Wölfel <i>et al.</i> (1995) <i>Science</i> , 269(5228): 1281-1284
CEA	Kass <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(3): 676-683
c-myc	Watson <i>et al.</i> (1991) <i>Cancer Res.</i> , 51(15): 3996-4000
Cox-2	Tsujii <i>et al.</i> (1998) <i>Cell</i> , 93: 705-716

Marcador	Referencia
DCC	Gotley <i>et al.</i> (1996) <i>Oncogene</i> , 13(4): 787-795
DcR3	Pitti <i>et al.</i> (1998) <i>Nature</i> , 396: 699-703
E6/E7	Steller <i>et al.</i> (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56(21): 5087-5091
EGFR	Yang <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(6): 1236-1243.
EMBP	Shiina <i>et al.</i> (1996) <i>Prostate</i> , 29(3): 169-176.
Ena78	Arenberg <i>et al.</i> (1998) <i>J. Clin. Invest.</i> , 102: 465-472.
FGF8b y FGF8a	Dorkin <i>et al.</i> (1999) <i>Oncogene</i> , 18(17): 2755-2761
FLK-1/KDR	Annie y Fong (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 99-106
Receptor de ácido fólico	Dixon <i>et al.</i> (1992) <i>J Biol Chem.</i> , 267(33): 24140-72414
G250	Divgi <i>et al.</i> (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(11): 2729-2739
Familia GAGE	De Backer <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(13): 3157-3165
gastrina 17	Watson <i>et al.</i> (1995) <i>Int J Cancer</i> , 61(2): 233-240
Hormona liberadora de gastrina (bombesina)	Wang <i>et al.</i> (1996) <i>Int J Cancer</i> , 68(4): 528-534
GD2/GD3/GM2	Wiesner y Sweeley (1995) <i>Int J Cancer</i> , 60(3): 294-299
GnRH	Bahk <i>et al.</i> (1998) <i>Urol Res.</i> , 26(4): 259-264
GnTV	Hengstler <i>et al.</i> (1998) <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85
gp100/Pme117	Wagner <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> , 44(4): 239- 247
gp-100-in4	Kirkin <i>et al</i> (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
gp15	Maeurer <i>et al.</i> (1996) <i>Melanoma Res.</i> , 6(1): 11-24
gp75/TRP-1	Lewis <i>et al.</i> (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
hCG	Hoermann <i>et al.</i> (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(6): 1520-1524
Heparanasa	Vlodavsky <i>et al.</i> (1999) <i>Nat Med.</i> , 5(7): 793-802
HER2/ <i>neu</i>	Lewis <i>et al</i> (1995) <i>Semin Cancer Biol</i> , 6(6): 321-327
Her3	
HMTV	Kahl <i>et al.</i> (1991) <i>Br J Cancer</i> , 63(4): 534-540
Hsp70	Jaattela <i>et al.</i> (1998) <i>EMBO J.</i> , 17(21): 6124-6134
hTERT (telomerasa)	Vonderheide <i>et al</i> (1999) <i>Immunity</i> , 10: 673-679. 1999.
IGFR1	Ellis <i>et al.</i> (1998) <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> , 52: 175-184

Marcador	Referencia
IL-13R	Murata <i>et al.</i> (1997) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 238(1): 90-94
iNOS	Klotz <i>et al.</i> (1998) <i>Cancer</i> , 82(10): 1897-1903
Ki 67	Gerdes <i>et al.</i> (1983) <i>Int J Cancer</i> , 31: 13-20
KIAA0205	Guéguen <i>et al.</i> (1998) <i>J Immunol.</i> , 160(12): 6188-6194
K-ras, H-ras, N-ras	Abrams <i>et al.</i> (1996) <i>Semin Oncol</i> , 23(1): 118-134
KSA (CO17-1A)	Zhang <i>et al.</i> (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(2): 295-302
LDLR-FUT	Caruso <i>et al.</i> (1998) <i>Oncol Rep.</i> , 5(4): 927-930
Familia MAGE (MAGE1, MAGE3, etc.)	Marchand <i>et al.</i> (1999) <i>Int J Cancer</i> , 80(2): 219-230
Mammaglobina	Watson <i>et al.</i> (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 13 3028-3031
MAP17	Kocher <i>et al.</i> (1996) <i>Am J Pathol.</i> , 149(2): 493-500
Melan-A/ MART-1	Lewis y Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
mesotelina	Chang <i>et al.</i> (1996) <i>Proc. Nati. Acad. Sci. EE.UU.</i> , 93(1): 136-140
MICA/B	Groh <i>et al.</i> (1998) <i>Science</i> , 279: 1737-1740
MT-MMP tales como MMP2, MMP3,	Sato y Seiki (1996) <i>J Biochem (Tokio)</i> , 119(2): 209-215
MMP7, MMP9	
Mox1	Candia <i>et al.</i> (1992) <i>Development</i> , 116(4): 1123-1136
Mucina tal como MUC-1, MUC-2, MUC-3 y MUC-4	Lewis y Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
MUM-1	Kirkin <i>et al.</i> (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
NY-ESO-1	Jager <i>et al.</i> (1998) <i>J. Exp. Med.</i> , 187: 265-270
Osteonectin	Graham <i>et al.</i> (1997) <i>Eur J Cancer</i> , 33(10): 1654-1660
P15	Yoshida <i>et al.</i> (1995) <i>Cancer Res.</i> , 55(13): 2756-2760
P170/MDR1	Trock <i>et al.</i> (1997) <i>J Natl Cancer Inst.</i> , 89(13): 917-931
p53	Roth <i>et al.</i> (1996) <i>Proc. Nati. Acad. Sci. EE.UU.</i> , 93(10): 4781-4786.

Marcador	Referencia
p97/melanotransferrina	Furukawa <i>et al.</i> (1989) <i>J Exp Med.</i> , 169(2): 585-590
PAI-1	Grøndahl-Hansen <i>et al.</i> (1993) <i>Cancer Res.</i> , 53(11): 2513-2521
PDGF	Vassbotn <i>et al.</i> (1993) <i>Mol Cell Biol.</i> , 13(7): 4066-4076
Plasminógeno (uPA)	Naitoh <i>et al.</i> (1995) <i>Jpn J Cancer Res.</i> , 86(1): 48-56
PRAME	Kirkin <i>et al.</i> (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
Probasina	Matuo <i>et al.</i> (1985) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 130(1): 293- 300
Progenipoyetina	-----
PSA	Sanda <i>et al.</i> (1999) <i>Urology</i> , 53(2): 260-266.
PSM	Kawakami <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57(12): 2321-2324
RAGE-1	Gaugler <i>et al.</i> (1996) <i>Immunogenetics</i> , 44(5): 323-330
Rb	Dosaka-Akita <i>et al.</i> (1997) <i>Cancer</i> , 79(7): 1329-1337
RCAS1	Sonoda <i>et al.</i> (1996) <i>Cancer</i> , 77(8): 1501-1509.
SART-1	Kikuchi <i>et al.</i> (1999) <i>Int J Cancer</i> , 81(3): 459-466
Familia de genes SSX	Gure <i>et al.</i> (1997) <i>Int J Cancer</i> , 72(6): 965-971
STAT3	Bromberg <i>et al.</i> (1999) <i>Cell</i> , 98(3): 295-303
STn (asociado con mucina) .	Sandmaier <i>et al.</i> (1999) <i>J Immunother.</i> , 22(1): 54-66
TAG-72	Kuroki <i>et al.</i> (1990) <i>Cancer Res.</i> , 50(16): 4872-4879
TGF- α	Imanishi <i>et al.</i> (1989) <i>Br J Cancer</i> , 59(5): 761-765
TGF- β	Picon <i>et al.</i> (1998) <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i> , 7(6): 497- 504
Timosina β 15	Bao <i>et al.</i> (1996) <i>Nature Medicine</i> . 2(12), 1322-1328
IFN- α	Moradi <i>et al.</i> (1993) <i>Cancer</i> , 72(8): 2433-2440
TPA	Maulard <i>et al.</i> (1994) <i>Cancer</i> , 73(2): 394-398
TPI	Nishida <i>et al.</i> (1984) <i>Cancer Res</i> 44(8): 3324-9
TRP-2	Parkhurst <i>et al.</i> (1998) <i>Cancer Res.</i> , 58(21) 4895-4901
Tirosinasa	Kirkin <i>et al.</i> (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
VEGF	Hyodo <i>et al.</i> (1998) <i>Eur J Cancer</i> , 34(13): 2041-2045
ZAG	Sánchez <i>et al.</i> (1999) <i>Science</i> , 283(5409): 1914-1919

Marcador	Referencia
P16INK4	Quelle <i>et al.</i> (1995) <i>Oncogene</i> , 17 de agosto de 1995; 11(4): 635-645
Glutathiona S-transferasa	Hengstler (1998) <i>et al. Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85

[0066] CD20 es la diana para las construcciones de la presente invención

Anticuerpos

5

[0067] El anticuerpo se une específica o preferentemente a CD20. Los anticuerpos anti-CD20 son bien conocidos por los expertos, e incluyen, pero sin limitación, rituximab, ibritumomab tiuxetan y tositumomab, AME-133v (Applied Molecular Evolution), Ocrelizumab (Roche), Ofatumumab (Genmab), TRU-015 (Trubion) e IMMU-106 (Immunomedics).

10

B) IFN- α e IFN- α modificado

[0068] Los restos quiméricos de la presente invención comprenden un interferón (por ejemplo, IFN- α) unido al anticuerpo. El interferón puede ser un interferón de tipo silvestre de longitud completa (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc.), un fragmento de interferón (por ejemplo, un fragmento de IFN- α) y/o un interferón mutado. Por lo general, el fragmento de interferón es aquel que posee la actividad endógena preferentemente a un nivel de al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % o 95 %, lo más preferentemente al menos 98 %, 99 %, 100 % o un nivel superior al del interferón de tipo silvestre.

[0069] Los medios de identificación de dichas moléculas de interferón modificadas son habituales para los expertos en la materia. En una metodología ilustrativa, se produce una biblioteca de IFN- α truncados y/o mutados, y se rastrea en cuanto a la actividad de IFN- α . Los métodos de producción de bibliotecas de variantes polipeptídicas son bien conocidos por los expertos en la materia. Así pues, por ejemplo, se puede usar la PCR propensa a errores para crear una biblioteca de IFN- α mutantes y/o truncados (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.365.408).

25

[0070] A continuación, se pueden rastrear los miembros de la biblioteca resultante de acuerdo con métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Así pues, por ejemplo, se puede ensayar la actividad de IFN- α midiendo la actividad antiviral contra un determinado virus de ensayo. Los kits para ensayar la actividad de IFN- α se encuentran disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, el kit del alfabeto iLite™ por Neutekbio, Irlanda).

30

[0071] Estos métodos pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Usando la enseñanza proporcionada en el presente documento, se pueden identificar fácilmente otros interferones modificados adecuados (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , etc. modificados).

35

C. Unión del anticuerpo al IFN- α

[0072] En términos generales, el anticuerpo anti-CD20 se puede unir en cualquier orden. Así pues, por ejemplo, el anticuerpo se puede unir bien con el extremo amino o con el extremo carboxi del interferón. El anticuerpo también se puede unir a una región interna del interferón, o por el contrario, el interferón se puede unir a una ubicación interna o a cualquier extremo del anticuerpo, siempre y cuando la unión no interfiera con la unión del anticuerpo al marcador diana.

40

[0073] El anticuerpo y el interferón (por ejemplo, IFN- α) se pueden unir mediante cualquiera de una serie de medios bien conocidos por los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, el interferón se conjuga, ya sea directamente o través de un enlazador (espaciador), con el anticuerpo. En ciertas realizaciones, sin embargo, es preferible expresar de forma recombinante el resto quimérico en forma de una proteína de fusión.

45

i) Conjugación química del resto de dirección con el interferón

[0074] El anticuerpo se une a la molécula de interferón (por ejemplo, IFN- α) mediante un enlazador resistente a la proteólisis que tiene la secuencia de aminoácidos SGGGS (SEC ID N° 58). Un "enlazador", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se usa para unir el anticuerpo al IFN- α . El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con el IFN- α . En ciertas realizaciones, el/los enlazador/es se puede/n unir a los aminoácidos constituyentes del anticuerpo y/o al IFN- α a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro con cisteína). En ciertas realizaciones preferidas, los enlazadores se unen a los grupos amino y/o carboxilo del carbono α de los aminoácidos terminales del anticuerpo y/o IFN- α .

50

55

[0075] Para formar el conjugado deseado, se puede usar un enlazador bifuncional que tenga un grupo funcional reactivo con un grupo en el anticuerpo y otro grupo reactivo en el IFN- α . Como alternativa, la derivatización puede implicar el tratamiento químico del resto de dirección. Los procedimientos de generación de, por ejemplo, grupos sulfhidrilo libres en polipéptidos, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, son conocidos (véase la patente de Estados Unidos N° 4.659.839).

[0076] Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos, incluyendo quelatos de radionúclidos metálicos, toxinas y fármacos con proteínas tales como anticuerpos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea N° 188.256; las patentes de EE.UU. N° 4.671.958; 4.659.839; 4.414.148; 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47: 4071-4075. En particular, la producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe *et al.*, "Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine", Academic Press, pág. 168-190 (1982); Waldmann (1991) *Science*, 252: 1657; patente de EE.UU. N° 4.545.985 y 4.894.443, y similares.

ii) Producción de proteínas de fusión

[0077] La construcción quimérica se sintetiza usando metodología de ADN recombinante. En general, esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, la colocación del ADN en un casete de expresión bajo el control de un determinado promotor, la expresión de la proteína en un huésped, el aislamiento de la proteína expresada y, si se requiere, la renaturalización de la proteína.

[0078] El ADN que codifica las proteínas de fusión (por ejemplo, anti-CD20-IFN- α , etc.) de la presente invención se puede preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas o la síntesis química directa mediante métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.* (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. N° 4.458.066, y similares.

[0079] La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como molde. Un experto reconocería que aunque la síntesis química de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, es posible obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

[0080] Como alternativa, se pueden clonar subsecuencias y escindir las subsecuencias apropiadas usando enzimas de restricción apropiadas. A continuación, se pueden ligar los fragmentos para producir la secuencia de ADN deseada.

[0081] En ciertas realizaciones, las proteínas de fusión que codifican el ADN se pueden clonar usando métodos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, por ejemplo, el gen para IFN- α se amplifica por PCR, usando un cebador sentido que contiene el sitio de restricción para, por ejemplo, NdeI y un cebador antisentido que contiene el sitio de restricción para HindIII. Esto puede producir un ácido nucleico que codifique la secuencia de IFN- α madura y que tenga sitios de restricción terminales. De manera similar, es posible clonar un anticuerpo que tenga sitios de restricción "complementarios" y luego ligarlo al IFN- α y/o a un enlazador unido al IFN- α . La ligación de las secuencias de ácidos nucleicos y la inserción en un vector produce un vector que codifica IFN- α unido al anticuerpo.

[0082] Sin embargo, fue un descubrimiento sorprendente que ciertos enlazadores no son adecuados para la preparación de proteínas de fusión. Así pues, por ejemplo, el enlazador (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N°: 31) no resultó ser muy adecuado para la producción de una construcción de anti-CD20-IFN- α . Sin estar ligados a ninguna teoría en particular, se cree que el interferón se estaba eliminando de la proteína de fusión por proteólisis. El análisis de transferencia Western usando anti-Fc y anti-interferón, confirmó que ambas bandas superiores eran cadenas pesadas, pero solo la mayor contenía interferón.

[0083] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión se pueden expresar en una variedad de células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas de células COS, CHO y HeLa y las líneas celulares de mieloma. Por lo general, el gen de la proteína recombinante está unido operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli*, este incluye un promotor tal como T7, trp o promotores λ , un sitio de unión al ribosoma y preferentemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferentemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias donantes yceptoras de cortes y empalmes.

[0084] Los plásmidos se pueden transferir a la célula huésped seleccionada mediante métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro de calcio para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por la resistencia a los antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos tales como los genes amp, gpt, neo y hyg.

5

[0085] Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes (1982) "Protein Purification", Springer-Verlag, N. Y.; Deutscher (1990) "Methods in Enzymology" Vol. 182: "Guide to Protein Purification", Academic Press, Inc. N. Y., y similares). Se prefieren composiciones sustancialmente puras del al menos aproximadamente 90 al 95 % de homogeneidad, siendo la más preferida para los usos farmacéuticos, la homogeneidad del 98 al 99 % o superior. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad deseada, los polipéptidos se pueden usar entonces terapéuticamente.

[0086] El experto en la materia reconocería que, tras la síntesis química, la expresión biológica o la purificación, la proteína de fusión (por ejemplo, anti-CD20-IFN- α , etc.) puede poseer una configuración sustancialmente diferente a las configuraciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido, y después hacer que el polipéptido se vuelva a plegar en la configuración preferida. Los métodos de reducción y desnaturalización de proteínas, y de inducción del repliegamiento son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Debinski *et al.* (1993) *J. Biol Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; y Buchner, *et al.* (1992) *Anal Biochem.*, 205: 263-270). Debinski *et al.*, por ejemplo, describen la desnaturalización y reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. La proteína se repliega entonces en un tampón redox que contiene glutatión oxidado y L-arginina.

[0087] Se puede usar un sistema de expresión transitoria para expresar las construcciones quiméricas descritas en el presente documento. Aunque se pueden usar muchas líneas celulares, una línea celular que funciona bien para la expresión transitoria es 293T. Para la expresión transitoria de 293T en el Día 0, se siembran 9 millones de células en 25 ml por cada placa de cultivo de tejido de 150 mm. Se prepara 1 mg/ml de PEI (polietilenimina) usando agua estéril. Para la expresión de un anticuerpo completo o proteína fusión de anticuerpo, se usan 25 μ g de H y 25 μ g de L (50 μ g en total) por placa. Se usa un volumen de 5 ml para la transfección de cada placa de 150 mm. Se mezcla el ADN con DMEM, se añade entonces la PEI y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se usan 1,75 μ g de PEI por cada μ g de ADN. Para la transfección, se retira el medio usado, se desecha y se reemplaza por 20 ml de medio nuevo (Iscoves + suero de ternera al 5 %). Se añade la mezcla de transfección y se hace girar la placa. En el Día 2, se sustituye el medio con 30 ml de medio Iscoves que contiene FBS al 1 % (suero fetal bovino) para reducir al mínimo la cantidad de Ig bovina presente. Se recogen los sobrenadantes de las células en los días 4,6 y 13, eliminando el medio y reemplazándolo por 30 ml de Iscover nuevo que contiene FBS al 1 %.

[0088] En el Ejemplo de referencia del presente documento, se ilustra la clonación y expresión de una proteína de fusión IFN- α anti-HER2/*neu*, mientras que, en el Ejemplo, se muestra la clonación y expresión de una proteína de fusión anti-CD20-IFN- α .

[0089] Un experto reconocería que estos métodos de expresión son ilustrativos y no limitantes. Se pueden hacer modificaciones en las proteínas de fusión descritas en el presente documento sin disminuir su actividad/eficacia. Algunas modificaciones se pueden hacer para facilitar la clonación, la expresión o la incorporación de la molécula de dirección en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción o codones de terminación convenientemente situados.

[0090] Se pueden realizar otras modificaciones para aumentar la semivida y/o biodisponibilidad en suero. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, la incorporación de aminoácidos D (especialmente en el enlazador), el uso de aminoácidos no naturales, la pegilación de la proteína de fusión, y similares.

D. Otros restos de dirección multivalentes

55

[0091] La presente divulgación contempla el uso de restos de dirección multivalentes, preferentemente trivalentes, tetravalentes, pentavalentes o superiores (por ejemplo, anticuerpos anti-CD20, etc.) para dirigir el interferón a una célula diana.

[0092] En ciertas realizaciones, se puede usar la presentación en fagos, la presentación en levaduras, la presentación bacteriana u otros sistemas de presentación para expresar y mostrar múltiples copias (por ejemplo, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 copias, etc.) de un anticuerpo de dirección (por ejemplo, anti-CD20, etc.) y proporcionar eficazmente, de ese modo, un resto de dirección multivalente.

65

II. Usos combinados

[0093] Las construcciones químicas de la presente invención son útiles para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de las células diana (por ejemplo, células cancerosas). En diversas realizaciones, los restos químicos se pueden usar para inhibir la progresión de la enfermedad, para reducir el tamaño del tumor y/o para estabilizar la regresión/remisión.

[0094] Particularmente en el tratamiento del cáncer, las composiciones y los métodos de la invención también pueden incluir agentes terapéuticos y/o farmacológicamente aceptables adicionales. Por ejemplo, las composiciones o los métodos pueden incluir otros agentes para el tratamiento del cáncer. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina (Mustargen), ciclofosfamida (Cytosan, Neosar), ifosfamida (Ifex), mostaza de fenilalanina; melfalán (Alkeran), chlorambucol (Leukeran), mostaza de uracilo, estramustina (Emcyt), tiotepa (Thiopex), busulfán (Myeleran), lomustina (CeeNU), carmustina (BiCNU, BCNU), estreptozocina (Zanosar), dacarbazina (DTIC-Dome), cis-platino, cisplatino (Platinol, Platinol AQ), carboplatino (Paraplatin), altretamina (Hexalen), etc.); antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato (Amethopterin, Folex, Mexate, Rheumatrex), 5-fluorouracilo (Adrucil, Efudex, Fluoroplex), floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina (FUDR), capecitabina (Xeloda), fludarabina: (Fludara), arabinósido de citosina (Cytaribine, Cytosar, ARA-C), 6-mercaptopurina (Purinethol), 6-tioguanina (Thioguanina), gemcitabina (Gemzar), cladribina (Leustatin), desoxicoformicina; pentostatina (Nipent), etc.); antibióticos (por ejemplo, doxorubicina (Adriamycin, Rubex, Doxil, preparación liposomal Daunoxome), daunorubicina (Daunomycin, Cerubidine), idarubicina (Idamycin), valrubicina (Valstar), mitoxantrona (Novantrone), dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegen), mitramicina, plicamicina (Mithracin), mitomicina C (Mutamycin), bleomicina (Blenoxane), procarbazona (Matulane), etc.); inhibidores de la mitosis (egpaclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), sulfato de vinblastina (Velban, Velsar, VLB), sulfato de vincristina (Oncovin, Vincasar PFS, Vincex), sulfato de vinorelbina (Navelbine), etc.); inhibidores de la función de la cromatina (por ejemplo, topotecán (Camptosar), irinotecán (Hycamtin), etopósido (VP-16, VePesid, Toposar), tenipósido (VM-26, Vumon), etc.); hormonas e inhibidores hormonales (por ejemplo, dietilestilbestrol (Stilbesterol, Stilphostrol), estradiol, estrógeno, estrógenos esterificados (Estratab, Menest), estramustina (Emcyt), tamoxifeno (Nolvadex), toremifeno (Fareston) anastrozol (Arimidex), letrozol (Femara), 17-OH-progesterona, medroxiprogesterona, acetato de megestrol (Megace), goserelina (Zoladex), leuprolida (Leupron), testosterona, metiltestosterona, fluoximesterona (Android-F, Halotestin), flutamida (Eulexin), bicalutamida (Casodex), nilutamida (Nilandron), etc.); inhibidores de la síntesis (por ejemplo, aminoglutetimida (Cytadren), ketoconazol (Nizoral), etc.); inmunomoduladores (por ejemplo, rituximab (Rituxan), trastuzumab (Herceptin), denileucina difitox (Ontak), levamisol (Ergamisol), bacilo de Calmette-Guerin, BCG (TheraCys, TICE BCG), interferón α -2a, α -2b (Roferon-A, Intron A), interleucina-2, aldesleucina (Proleukin), etc.) y otros agentes tales como 1-aspariginasa (Elspar, Kidrolase), pegaspasgasa (Oncaspar), hidroxiurea (Hydrea, Doxia), leucovorina (Wellcovorin), mitotano (Lysodren), porfímero (Photofrin), tretinoína (Vesnaid), y similares.

III. Composiciones farmacéuticas

[0095] Se pueden usar uno o más agentes activos (construcciones químicas) para su administración, por ejemplo, a un individuo diagnosticado con un cáncer. El/los agente/s activo/s se puede/n administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados, y similares, siempre que la sal, el éster, la amida, el profármaco o el derivado sea farmacológicamente adecuado, es decir, eficaz en el presente método. Las sales, los ésteres, las amidas, los profármacos y otros derivados de los agentes activos se pueden preparar usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por March (1992) "Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure", IV Ed. N. Y. Wiley-Interscience.

[0096] Por ejemplo, se preparan sales de adición de ácido a partir de la base libre usando la metodología convencional, que normalmente implica la reacción con un ácido adecuado. En general, se disuelve la forma de base del fármaco en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol, y se añade el ácido al mismo. La sal resultante bien precipita o se puede sacar de la solución mediante la adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para la preparación de sales de adición de ácido incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Una sal de adición de ácido se puede reconvertir en la base libre mediante el tratamiento con una base adecuada. Las sales de adición de ácido particularmente preferidas de los agentes activos del presente documento son sales de haluro, tales como las que se pueden preparar usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de la presente invención se preparan de una manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina, o similares. Las sales básicas particularmente preferidas incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, la sal de sodio y las sales de cobre.

[0097] La preparación de ésteres normalmente implica la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que pueden estar presentes dentro de la estructura molecular del fármaco. Por lo general, los ésteres son derivados de grupos alcohol libres sustituidos con acilo, es decir, restos que se obtienen de ácidos carboxílicos de fórmula RCOOH, donde R es alquilo, y preferentemente es alquilo inferior. Los ésteres se pueden reconvertir en los ácidos libres, si se desea, mediante el uso de procedimientos de hidrogenólisis o hidrólisis convencionales.

[0098] También se pueden preparar amidas y profármacos usando técnicas conocidas para los expertos en la materia o descritas en la literatura pertinente. Por ejemplo, se pueden preparar amidas a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados, o se pueden preparar a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido mediante la reacción con amoníaco o una amina de alquilo inferior. Normalmente, los profármacos se preparan mediante la unión covalente de un resto que produce un compuesto que es terapéuticamente inactivo hasta que es modificado por el sistema metabólico de un individuo.

[0099] Los agentes activos identificados en el presente documento son útiles para la administración parenteral, tópica, oral, nasal (o inhalados de otra manera), rectal o local, tal como por aerosol o por vía transdérmica, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una o más de las patologías/indicaciones descritas en el presente documento (por ejemplo, aterosclerosis y/o los síntomas de la misma). Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitaria dependiendo del método de administración. Las formas de dosificación unitaria adecuadas incluyen, pero sin limitación, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, supositorios, parches, aerosoles nasales, inyectables, formulaciones de liberación sostenida implantables, complejos de lípidos, etc.

[0100] Por lo general, los agentes activos de la presente invención se combinan con un vehículo (excipiente) farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacológica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o reducir la absorción del/de los agente/s activo/s. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, hidratos de carbono tales como glucosa, sacarosa o dextranos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión; agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, potenciadores de la protección y las captación tales como lípidos, composiciones que reducen el aclaramiento o la hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones.

[0101] Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes o conservantes dispersantes que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Se conocen bien diversos conservantes, e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la materia apreciaría que la elección del/de los vehículo/s farmacéuticamente aceptable/s, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración del/de los agente/s activo/s y de las características fisicoquímicas particulares del/de los agente/s activo/s.

[0102] Los excipientes son preferentemente estériles y, en general, están exentos de materia no deseada. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas.

[0103] En aplicaciones terapéuticas, las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar para administrarlas a un paciente que padezca, por ejemplo, un cáncer, o que se encuentre en riesgo de padecer cáncer (por ejemplo, tras la extirpación quirúrgica de un tumor primario) en una cantidad suficiente para prevenir y/o curar y/o prevenir o detener al menos parcialmente la enfermedad y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se pueden administrar dependiendo de la dosis y de la frecuencia según sea necesario y sean toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de los agentes activos de las formulaciones de la presente invención para tratar eficazmente (mejorar uno o más síntomas) del paciente.

[0104] La concentración del/de los agente/s activo/s puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Sin embargo, normalmente, las concentraciones se seleccionan para proporcionar dosis que varían de aproximadamente 0,1 o 1 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día y, a veces superiores. Las dosis típicas varían de aproximadamente 3 mg/kg/día a aproximadamente 3,5 mg/kg/día, preferentemente de aproximadamente 3,5 mg/kg/día a aproximadamente 7,2 mg/kg/día, más preferentemente de aproximadamente 7,2 mg/kg/día a aproximadamente 11,0 mg/kg/día, y lo más preferentemente de aproximadamente 11,0 mg/kg/día a aproximadamente 15,0 mg/kg/día. En ciertas realizaciones preferidas, las dosis varían de aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, las dosis varían de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg administrados por vía oral dos veces al día. Se apreciará que es posible variar dichas dosis para optimizar un régimen terapéutico en un determinado sujeto o grupo de sujetos.

[0105] Los agentes activos se pueden administrar por vía oral (por ejemplo, mediante un comprimido) o como un inyectable de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los péptidos también se pueden administrar a través de la piel usando sistemas convencionales de administración transdérmica de fármacos, es decir, "parches" transdérmicos, en los que normalmente el/los agente/s activo/s está/n contenido/s dentro de una estructura laminada que sirve como dispositivo de administración de fármacos para fijarse a la piel. En dicha estructura, la composición farmacológica normalmente está contenida en una capa, o "depósito", subyacente a una capa de soporte superior. Se apreciará que el término "depósito", en el presente contexto, se refiere a una cantidad de "ingrediente/s activo/s" que, en última instancia, queda disponible para la administración en la superficie de la piel. Así pues, por ejemplo, el "depósito" puede incluir el/los ingrediente/s activo/s en un adhesivo sobre una capa de soporte del parche, o en cualquiera de una variedad de diferentes formulaciones de matriz conocidas por los expertos en la materia. El parche puede contener un solo depósito o puede contener múltiples depósitos.

[0106] El depósito puede comprender una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirva para fijar el sistema a la piel durante la administración del fármaco. Los ejemplos de materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos, y similares. Como alternativa, el depósito que contiene el fármaco y el adhesivo de contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente al depósito que, en este caso, puede ser tanto una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente, o puede ser un depósito de líquido o hidrogel, o puede tener alguna otra forma. La capa de soporte de estos laminados que sirve como superficie superior del dispositivo funciona preferentemente como un elemento estructural primario del "parche", y proporciona al dispositivo gran parte de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de soporte es preferentemente sustancialmente impermeable al/a los agente/s activo/s y cualquier otro material que esté presente.

[0107] Es posible mantener la semivida en suero elevada mediante el uso de sistemas de "envase" de proteínas de liberación sostenida. Dichos sistemas de liberación sostenida son bien conocidos para los expertos en la materia. En una realización preferida, el sistema de administración de microesfera biodegradable ProLease™ para proteínas y péptidos (véase, por ejemplo, Tracy (1998) *Biotechnol. Prog.* 14: 108; Johnson *et al.* (1996), *Nature Med.* 2: 795; Herbert *et al.* (1998), *Pharmaceut. Res.* 15, 357), un polvo seco compuesto de microesferas poliméricas biodegradables que contienen el agente activo en una matriz polimérica que se puede componer de una formulación seca con o sin otros agentes.

[0108] El proceso de fabricación de microesferas ProLease™ se diseñó específicamente para lograr una alta eficiencia de encapsulación, a la vez que se mantenía la integridad del agente activo. El proceso consiste en (i) la preparación de partículas de fármaco liofilizadas a granel mediante liofilización por pulverización de la solución de fármaco con excipientes estabilizantes, (ii) la preparación de una suspensión de fármaco-polímero seguida del tratamiento con ultrasonidos o la homogeneización para reducir el tamaño de partícula del fármaco, (iii) la producción de microesferas de fármaco-polímero congeladas por atomización en nitrógeno líquido, (iv) la extracción del disolvente del polímero con etanol, y (v) la filtración y el secado al vacío, generando el producto final de polvo seco. El polvo resultante contiene la forma sólida de los agentes activos, que se dispersa homogénea y rígidamente dentro de partículas de polímero porosas. El polímero más comúnmente usado en el proceso, el poli(láctido-co-glicólico) (PLG), es tanto biocompatible como biodegradable.

[0109] La encapsulación se puede realizar a bajas temperaturas (por ejemplo, -40 °C). Durante la encapsulación, la proteína se mantiene en estado sólido en ausencia de agua, minimizando así la movilidad conformacional de la proteína inducida por el agua, evitando las reacciones de degradación de las proteínas que incluyen agua como reactivo y evitando las superficies de contacto orgánicas acuosas, donde las proteínas se pueden desnaturizar. Un proceso preferido usa disolventes en los que la mayoría de las proteínas son insolubles, produciendo de este modo altas eficiencias de encapsulación (por ejemplo, superiores al 95 %).

[0110] En otra realización, se pueden proporcionar uno o más componentes de la solución como un "concentrado", por ejemplo, en un recipiente de almacenamiento (por ejemplo, en un volumen previamente medido) listo para la dilución o en una cápsula soluble lista para la adición a un volumen de agua.

[0111] Las formulaciones y los métodos de administración anteriores pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Se apreciará que, usando la enseñanza proporcionada en el presente documento, se pueden idear fácilmente otras formulaciones y otros modos de administración adecuados.

IV. Kits

[0112] También se desvelan kits para su uso en el tratamiento de un cáncer primario y/o en una terapia adjunta. Por lo general, los kits comprenden un recipiente que contiene una construcción química de la presente invención. La construcción química puede estar presente en un excipiente farmacológicamente aceptable.

[0113] Además, los kits pueden incluir opcionalmente instrucciones que desvelen el medio de uso de la construcción quimérica (por ejemplo, para tratar un cáncer y/o como un agente terapéutico adjunto). Opcionalmente, las instrucciones también pueden enseñar las dosis preferidas, las contraindicaciones, y similares.

5 [0114] Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que el kit está diseñado y, por lo tanto, comprender además, por ejemplo, medios para la desinfección de una herida, para reducir el dolor, para la fijación de un apósito, y similares.

[0115] Aunque, por lo general, las instrucciones comprenden materiales escritos o impresos, estas no se limitan a los mismos. En la presente invención, se contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarl

15 Ejemplos

[0116] Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo de referencia

20 **La proteína de fusión de IgG3 anti-HER2/*neu* e IFN- α demuestra potentes actividades apoptóticas y antitumorales contra el linfoma de linfocitos B**

[0117] En el presente estudio, se ha construido una proteína de fusión que consiste en IgG3 anti-HER2/*neu* con la región variable de C6MH3-B1 (20) e IFN- α , y se ha investigado su efecto sobre un linfoma de linfocitos B murino, 38C13, que expresaba HER2/*neu* humano (38C13/HER2). Se eligió evaluar IFN- α dirigido hacia un tumor en este modelo debido a la capacidad de respuesta de este linfoma de linfocitos B hacia IFN- α (21). La fusión de IFN- α con un anticuerpo aumentó significativamente su semivida *in vivo*. Se encontró que IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α resultó ser eficaz en la inhibición del crecimiento *in vivo* de tumores 38C13/HER2 tanto pequeños como establecidos sin la observación de signos de toxicidad sistémica a dosis eficaces. IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α inhibió el crecimiento de e indujo la apoptosis en células 38C13/HER2. Estos resultados indican que la fusión de IFN- α con un anticuerpo específico del tumor produce un agente eficaz para el tratamiento del linfoma de linfocitos B.

Materiales y métodos

35 **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

[0118] 38C13 es un linfoma de linfocitos B murino altamente maligno derivado de ratones C3H/HeN. Ya se han descrito con anterioridad la construcción y la caracterización de 38C13 que expresa HER2/*neu* humano (38C13/HER2) (6). Se cultivaron tanto 38C13 como 38C13/HER2 en IMDM (Irvine Scientific) suplementado con L-glutamina 2 mM, 10 U/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomycin (GPS; Sigma-Aldrich) y suero de ternera al 10 % (Atlanta Biologicals). Se cultivaron el mieloma murino P3X63Ag8.653 (Colección americana de cultivos tipo) y sus derivados que expresaban IgG3 anti-HER2-IFN- α o IgG3-IFN- α en IMDM suplementado con suero de ternera al 10 % y GPS. Se cultivaron fibroblastos L929 (Colección americana de cultivos tipo) en IMDM con suero de ternera al 5 % y GPS. Ya se han descrito con anterioridad la construcción y la caracterización de CT26/HER2, una línea celular de adenocarcinoma de colon murino que sobreexpresa HER2/*neu* humano (6). Se cultivó CT26/HER2 en IMDM con suero de ternera al 5 % y GPS.

Construcción de plásmidos

50 [0119] Se insertaron las regiones variables de cadena H y L de C6MH3-B1, un scFv anti-HER2/*neu* humano en los vectores de expresión de cadena H de γ 3 humano (pAH4802) y de cadena L de κ (pAG4622), respectivamente (22), y se usaron para producir IgG3 quimérica de esta especificidad. Para construir la proteína de fusión IgG3 anti-HER2/*neu* humano (C6MH3-B1)-IFN- α , primero se usó la PCR para introducir un sitio de enzima de restricción BamH1 corriente arriba y un sitio de enzima de restricción XbaI corriente abajo del gen de IFN- α murino maduro amplificado por PCR a partir de ADN genómico de ratones BALB/c con el cebador directo 5'-CGC GGA TCC TGT GAC CTG CCT CAG ACT C-3 (SEC ID N°: 55) y el cebador inverso 5'-GCT CTA GAT CAT TTC TCT TCT CTC AGT CTT C-3 (SEC ID N°: 56). Se ligó el producto de PCR final en un vector TA. Se dirigió el vector resultante, tras la secuenciación, con BamH1 y XbaI para liberar el fragmento de ADN que se insertó en el vector pAH9612 que contenía la región constante de IgG3 con la región variable de la cadena H de C6MH3-B1 y un enlazador peptídico GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 57) en el extremo de C_H3. El producto de PCR final, pAH9616, contenía IgG3 anti-HER2/*neu* seguido de un enlazador peptídico GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N°: 57) e IFN- α murino.

Producción y purificación de proteínas recombinantes

[0120] Se transfectó el plásmido que codificaba la cadena H de IgG3 con la región variable de C6MH3-B1 fusionada a IFN- α en células P3X63Ag8.653 que expresaban la cadena L con la región variable de C6MH3-B1 (23) para producir IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α o de la cadena L inespecífica (4D5; Genentech) (6) para producir IgG3-IFN- α por electroporación con un pulso de 960 μ Fd de capacitancia y 0,2 V. Se seleccionaron las transfecciones que produjeron IgG3 anti-HER2/*neu* (C6MH3-B1), IgG3 anti-HER2/*neu* (C6MH3-B1)-IFN- α o IgG3-IFN- α , y se caracterizaron como se ha descrito previamente (6). Se purificó IgG3 anti-HER2/*neu* (C6MH3-B1) de sobrenadantes de cultivo usando la proteína G inmovilizada sobre un flujo rápido de sefarosa 4B (Sigma-Aldrich), y se purificaron IgG3 anti-HER2/*neu* (C6MH3-B1)-IFN- α e IgG3-IFN- α de sobrenadantes de cultivo usando la proteína A inmovilizada sobre flujo rápido de sefarosa 4B (Sigma-Aldrich). Se evaluaron la pureza y la integridad mediante tinción con azul de Coomassie de las proteínas separadas por SDS-PAGE. Se usó el patrón de referencia internacional para IFN- α de ratón proporcionado por los Institutos Nacionales de Salud para determinar la actividad del IFN de las proteínas de fusión. Se obtuvo rIFN- α de PBL Biomedical Laboratories.

Análisis de FPLC de la proteína de fusión IgG3-IFN- α

[0121] Para determinar si existe la proteína de fusión como monómero y/o polímeros en solución, se analizaron 100 μ g de IgG3-IFN- α mezclados con 400 μ g de OVA para proporcionar un control interno mediante filtración en gel en una columna Superose 6 de 30 x 1,5 cm unida en una cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) usando PBS y un caudal de 0,5 ml/min. Se usaron la filtración en gel en la misma columna de IgA2m que existe predominantemente como anticuerpo dímérico con una masa molecular de 350 kDa y una mezcla de IgG Miles de masa molecular de 150 kDa y OVA de masa molecular de 45 kDa para proporcionar patrones de masa molecular.

Análisis de citometría de flujo de la actividad de unión de HER2/*neu*

[0122] Para detectar la reactividad de diversas proteínas de fusión anti-HER2/*neu* con células CT26/HER2, se incubaron 1×10^6 células a 4 °C durante 1 h con 10 pM de la proteína de fusión. Para algunos experimentos, las proteínas de fusión se preincubaron con 900 U de heparina a 4 °C durante 17 h antes de la incubación con células CT26/HER2. A continuación, se hicieron reaccionar las células con IgG anti-humana de rata biotinilada (BD Biosciences) diluida 1/100. Se detectaron los anticuerpos biotinilados unidos con estreptavidina marcada con PE (BD Biosciences) diluida 1/1500 y se analizaron las células por citometría de flujo usando un FACScan (BD Biosciences).

Actividad antiviral de IFN- α

[0123] Se usó la línea celular de fibroblastos L-929 sensible a la infección por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) para cuantificar la actividad biológica de IFN- α . Se sembraron células L-929 en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon; BD Biosciences) a una densidad de 4×10^4 células/pocillo y se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Tras ello, se añadieron diluciones en serie de diferentes proteínas de fusión IFN- α o patrón de IFN- α (patrón de referencia internacional de IFN- α de ratón Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD) y se incubó la placa a 37 °C durante 24 h. A continuación, se añadieron cuatro mil PFU de VSV a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante otras 48 h. Se tiñeron las células adherentes supervivientes con 50 μ l de cristal violeta (0,05 % en etanol al 20 %) durante 10 min. Se lavaron las placas con agua y se disolvió el colorante restante mediante la adición de 100 μ l de metanol al 100 %. Las placas se leyeron usando un lector de ELISA a 595 nm.

Ensayo del efecto antiproliferativo de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α

[0124] En resumen, se sembraron células 38C13 o 38C13/HER2 en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $1,25 \times 10^4$ /pocillo y se añadieron diluciones en serie de diferentes proteínas de fusión. A continuación, se incubaron las placas durante 48 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Se desarrollaron las placas mediante la adición de 20 μ l de solución de MTS (Promega) y se analizaron a 490 nm usando un lector de ELISA. Se calculó la inhibición de la proliferación (porcentaje) como:

$$100 \times [(DO_{\text{exp}} - DO_{\text{blanco}})/(DO_{\text{medio}} - DO_{\text{blanco}})] \times 100.$$

Ensayo de apoptosis

[0125] En resumen, se trataron 1×10^6 células con diferentes proteínas de fusión durante 72 h. Después, se lavaron las células con PBS enfriado con hielo. Se realizó el ensayo de anexina V/ioduro de propidio (PI) siguiendo los procedimientos sugeridos por el fabricante usando el Kit de ensayo de apoptosis 2 Vybrant (Molecular Probes).

Proliferación de células tumorales 38C13/HER2 marcadas con CFSE

- [0126] En resumen, se incubaron 1×10^6 células con CFSE 2,5 μ M (Molecular Probes) durante 10 min a 37 °C. Luego se trataron las células con 1 nM de diferentes proteínas de fusión durante 48 h y se analizaron por citometría de flujo siguiendo los procedimientos sugeridos por el fabricante usando el kit de proliferación celular con CFSE CellTrace (Molecular Probes).

Ratones

- 10 [0127] Se usaron ratones C3H/HeN hembra de 6-8 semanas de vida obtenidas de Taconic Farms. Se alojaron los animales en una instalación usando jaulas de policarbonato con autoclave que contenían camas de virutas. Los animales recibieron comida y agua a voluntad. Se proporcionó luz artificial en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. La temperatura de la instalación era de 20 °C con 10-15 cambios de aire por hora.

Semivida

- [0128] Se yodaron rIFN- α (PBL Biomedical Laboratories), IgG3-IFN- α y IgG3 *anti-HER2/neu*-IFN- α murinos hasta 10 μ Ci/ μ g con 125 I usando perlas de yodo (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ratones recibieron por inyección i.p. 66 μ Ci de proteínas marcadas con 125 I. A varios intervalos después de la inyección de rIFN- α , IgG3-IFN- α o IgG3 *anti-HER2/neu*-IFN- α marcados con 125 I, se midió la radiactividad residual usando un contador de cuerpo entero para ratones (Wm. B. Johnson y Asociados).

Desafío tumoral y terapia con anticuerpos

- 25 [0129] Ratones C3H/HeN recibieron 1.000 células tumorales 38C13/HER2 s.c. El tratamiento se administró mediante inyección intraperitoneal ya sea 1, 3 y 5 días o 12, 13 y 14 días después del desafío tumoral. Se midieron los tumores cada dos días, y el volumen del tumor se calculó aproximadamente (en milímetros cúbicos) usando la siguiente fórmula: [longitud (mm) x anchura (mm) x anchura (mm)]/2 (24). Los animales fueron observados hasta que la longitud del tumor s.c. hubo alcanzado 15 mm, o hasta que se observó que algún ratón sufría o parecía estar moribundo. Los animales en estas condiciones fueron sacrificados humanitariamente de acuerdo a la política institucional.

Análisis de transferencia Western y Ac

- 35 [0130] En resumen, se trataron las células 38C13/HER2 con diferentes proteínas de fusión durante los tiempos indicados, se lavaron con PBS enfriado con hielo y se lisaron en hielo durante 10 min en tampón de lisis (Nonidet P-40 al 0,125 %, Brij 97 al 0,875 %, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M, Na_3VO_4 0,4 mM, NaF 0,4 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 2,5 μ M y aprotinina 2,5 μ M). Se aclararon los lisados celulares a 10.000 xg durante 10 min a 4 °C. A continuación, se hirvieron las muestras de proteína en tampón de muestra antes de la separación en geles de SDS-PAGE al 8 % y se transfirieron a membranas microporosas de fluoruro de polivinilideno (Millipore). Tras bloquear con BSA al 3 % en NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,6; TBS) durante 1 h a temperatura ambiente, se sondaron las transferencias con los anticuerpos primarios indicados durante la noche a 4 °C. Entonces, se lavaron las transferencias tres veces a temperatura ambiente con Tween 20 al 0,05 % en TBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con HRP, y se detectaron mediante un sistema de detección ECL catalizado por peroxidasa (ECL; Pierce). El antiphosphoSTAT1 policlonal de conejo se obtuvo de Cell Signaling Technology. La IgG anti-conejo de burro conjugada con HRP policlonal se obtuvo de Amersham Biosciences. El anti-GAPDH de conejo policlonal se obtuvo de Abcam.

Análisis estadístico

- 50 [0131] Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba t de Student de dos colas para estudios *in vitro* y análisis de rango largo (Mantel-Cox) para las curvas de supervivencia de los animales.

Resultados**Producción y caracterización de IgG3 anti-HER2/neu-IFN- α**

- [0132] Ya se ha descrito con anterioridad (23) la construcción y expresión de IgG3 anti-HER2/neu con la región variable de C6MH3-B1 (20). Se fusionó el extremo amino-terminal de IFN- α murino maduro al extremo carboxi-terminal de IgG3 anti-HER2/neu separada por un enlazador flexible [(Gly₄)Ser]₃ (SEC ID N°: 31) (Fig. 2A). Se construyó una proteína de fusión idéntica, IgG3-IFN- α , carente de especificidad hacia HER2/neu, mediante la sustitución de la cadena L de C6MH3-B1 con la cadena L de 4D5 (rhuMAb HER2, Herceptina; Genentech). Se analizaron las proteínas purificadas de los sobrenadantes de cultivo usando la proteína G mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Fig. 2B). En ausencia de agentes reductores, IgG3 anti-HER2/neu (Fig. 2B, carril 1) migra con una masa molecular de 170 kDa, mientras que IgG3 anti-HER2/neu-IFN- α (Fig. 2B, carril 2) y

IgG3-IFN- α (Fig. 2B, carril 3) son de 210 kDa, el tamaño esperado para una IgG3 completa con dos moléculas de IFN- α murino unidas (Fig. 2A). Tras el tratamiento con el agente reductor, se observan cadenas L que migran con una masa molecular de 25 kDa para estas proteínas (Fig. 2B, carriles 4-6). Sin embargo, el anti-HER2/*neu*-IgG3 tiene una cadena H con una masa molecular de 60 kDa (Fig. 2B, carril 4), mientras que IgG3-IFN- α (Fig. 2B, carril 5) y IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α (Fig. 2B, carril 6) tienen una cadena H con una masa molecular de 80 kDa como se esperaba. La banda inferior 1 del carril 1 (Fig. 2B) es IgG bovina que también se une a la columna de la proteína G; también se observan las cadenas H y L bovinas en el carril 4 (Fig. 2B) y, en menor grado, en los carriles 5 y 6 (Fig. 2B). El análisis FPLC mostró que existía la proteína de fusión IgG3-IFN- α como un monómero en solución (datos no mostrados).

10

Unión a Ag y actividad antiviral de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α

[0133] Tanto IgG3 anti-HER2/*neu* como IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α se unieron a las células CT26/HER2, lo que expresa altos niveles de HER2/*neu* humano, mientras que IgG3-IFN- α se unió a CT26/HER2 débilmente (Fig. 2C). Se ha demostrado que muchas citocinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6 (25) y IFN- α (26) interactúan con la heparina. Para determinar si la interacción débil entre IgG3-IFN- α y CT26/HER2 se debe a la unión a la heparina, se incubaron las proteínas con heparina antes de la adición a CT26/HER2. La heparina inhibió la unión de IgG3-IFN- α a las células CT26/HER2, pero no inhibió la unión de IgG3 anti-HER2/*neu* ni de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α (Fig. 2C).

[0134] Estos resultados demostraron que IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α retuvo su capacidad para unirse a Ag, y que IgG3-IFN- α no reconoce a HER2/*neu*. Se usó la línea celular de fibroblastos L-929 sensible a la infección por VSV para cuantificar la actividad biológica de IFN- α de las proteínas de fusión en comparación con un patrón de IFN- α . Tanto IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α como IgG3-IFN- α mostraron ~2.400 U de actividad de IFN- α /μg de actividad contra la citotoxicidad inducida por VSV en las células L-929, mientras que IgG3 anti-HER2/*neu* no mostró ninguna actividad antiviral (Fig. 2D).

Actividad antitumoral *in vivo* de proteínas de fusión

[0135] Para determinar la actividad antitumoral *in vivo* de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α , se inocularon ratones singénicos s.c. con 1×10^3 células tumorales 38C13/HER2 y se trataron en los días 1, 3 y 5 tras el desafío tumoral mediante administración i.p. de diferentes dosis de proteína (Fig. 3A-3B). Los ratones tratados con 2,5 μg de IgG3-IFN- α mostraron cierta regresión del crecimiento del tumor, con uno (13 %) de los ocho ratones vivos transcurridos 50 días (Fig. 3A). Sin embargo, la dirección *in vivo* de IFN- α a los tumores usando un anticuerpo específico del tumor mejoró espectacularmente su efecto antitumoral. Todos los ratones tratados con 2,5 μg (Fig. 3A) de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α se mantuvieron sin tumor 50 días después del desafío tumoral ($p = 0,0048$ en comparación con el control de PBS), y ninguno de los ratones tratados mostró pruebas de toxicidad. Por lo tanto, la dirección de IFN- α a la superficie de células tumorales produjo una actividad antitumoral significativa en comparación con el IFN- α ligado a un anticuerpo inespecífico ($p = 0,007$). El IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α siguió mostrando una potente actividad antitumoral cuando se usó una dosis inferior. Siete (88 %) de los ocho ratones tratados con 1 μg (Fig. 3B) de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α se mantuvieron sin tumor tras 50 días. En marcado contraste, a esta dosis inferior, los ratones tratados con IgG3-IFN- α mostraron el crecimiento del tumor similar a los ratones tratados con PBS ($p = 0,183$) y solo sobrevivieron uno (13 %) de los ocho ratones. Cuando se aumentó el tratamiento hasta tres dosis de 5 μg, tanto IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α como IgG3-IFN- α fueron eficaces en la prevención del crecimiento tumoral (datos no mostrados), lo que sin duda refleja el hecho de que las células 38C13 son sensibles al tratamiento con IFN- α (21, 27, 28). El crecimiento del tumor en ratones tratados con 5 μg de anticuerpo IgG3 anti-HER2/*neu* resultó ser el mismo que el control de PBS, lo que sugiere que el anticuerpo solo no tiene ningún efecto antitumoral *in vivo* (datos no mostrados). Estos resultados indicaron que la dirección de IFN- α a las células tumorales mediante un anticuerpo específico del tumor puede potenciar drásticamente su eficacia, lo que se observó más claramente cuando se administraron dosis bajas. Es importante destacar que esta actividad antitumoral se puede alcanzar sin ninguna toxicidad evidente.

IFN- α fusionado con un anticuerpo produce una mejor actividad antitumoral en comparación con IFN- α libre

[0136] Como se ha descrito anteriormente, se encontró que IFN- α fusionado con un anticuerpo no específico del tumor presentó actividad antitumoral. Para comparar su actividad antitumoral con la de rIFN- α soluble, los ratones fueron inoculados s.c. con 1×10^3 células tumorales 38C13/HER2 y se trataron 1 y 3 días después del desafío tumoral mediante la administración i.p. de 9.600 U (4 μg) de IgG3-IFN- α o 9.600 U de rIFN- α (Fig. 4A). Todos los ratones tratados con 9.600 U de IgG3-IFN- α mostraron un retraso del crecimiento tumoral y el 75 % de los ratones permanecieron sin tumor 50 días después del desafío tumoral ($p = 0,027$). Por el contrario, los ratones tratados con el mismo número de unidades de rIFN- α no fueron estadísticamente diferentes de los controles de PBS en su patrón de crecimiento del tumor.

[0137] IFN- α tiene una semivida *in vivo* muy corta (29). En el estudio anterior, se ha demostrado que la fusión de los anticuerpos con citocinas aumenta su semivida (6). Se examinó el aclaramiento de rIFN- α , IgG3-IFN- α o IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α marcados con 125 I en ratones C3H/HeN. Los ratones recibieron por inyección i.p. de 66 μCi de

proteínas marcadas con ^{125}I y se midió la radiactividad residual usando un contador de cuerpo entero para ratones. rIFN- α fue rápidamente aclarado con una eliminación del 50 % en $\sim 2,5$ h (Fig. 4B). Por el contrario, tanto IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α como IgG3-IFN- α mostraron un aumento significativo de la semivida *in vivo*, requiriéndose ~ 8 h para la eliminación del 50 % de la radiactividad inyectada. Este aumento de la semivida puede contribuir a la eficacia antitumoral de las proteínas de fusión de IFN- α . Por lo tanto, la fusión de un anticuerpo IgG3 con IFN- α puede mejorar significativamente su actividad antitumoral *in vivo*. Sin embargo, esta actividad antitumoral se puede mejorar aún más mediante la dirección del IFN- α hacia el tumor, haciéndolo eficaz a dosis más bajas.

IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α inhibió la proliferación de células tumorales *in vitro*.

[0138] IFN- α tiene múltiples actividades, incluyendo la activación de la respuesta inmune y la citotoxicidad directa contra los tumores. Para investigar los posibles mecanismos de los efectos antitumorales observados usando IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α o IgG3-IFN- α , los ocho ratones que permanecieron sin tumor (véase la Fig. 3A) se expusieron a 1×10^3 células tumorales 38C13/HER2. Sorprendentemente, todos los ratones se parecían a los ratones no tratados, y desarrollaron rápidamente tumores voluminosos (datos no mostrados). Estos resultados implican que, en estas condiciones experimentales de carga tumoral baja, las proteínas de fusión IFN- α no iniciaron una respuesta inmune adaptativa de protección, sino que, en cambio, la actividad antitumoral potente de las proteínas de fusión IFN- α está mediada bien por el sistema inmune innato o por un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales.

[0139] Para determinar si las proteínas de fusión IFN- α son directamente citotóxicas para las células tumorales, se incubaron células tumorales 38C13/HER2 o 38C13 parentales con diferentes proteínas durante 48 h y se midió la proliferación celular usando el ensayo de MTS. El tratamiento con IgG3 anti-HER2/*neu* no inhibió significativamente la proliferación de las células tumorales 38C13/HER2 ni 38C13 parentales (Fig. 5A y 5B). Aunque tanto IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α como IgG3-IFN- α inhibieron la proliferación de las células tumorales 38C13/HER2, IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α fue más eficaz que IgG3-IFN- α con valores de IP50 de 10 y 100 pM para IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α e IgG3-IFN- α , respectivamente (Fig. 5A). Por el contrario, IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α e IgG3-IFN- α muestran actividad antiproliferativa similar contra las células tumorales 38C13 parentales. Estos resultados proporcionan pruebas de que las proteínas de fusión IFN- α pueden inhibir directamente la proliferación del linfoma de linfocitos B 38C13, y la dirección de IFN- α a las células tumorales potenció este efecto.

IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α indujo la apoptosis en células tumorales *in vitro*

[0140] La señalización de IFN- α puede inducir la apoptosis en algunas líneas de células tumorales. Para determinar si la apoptosis contribuyó al efecto antiproliferativo observado por los presentes inventores, se ensayaron células 38C13/HER2 tratadas con diferentes proteínas para la translocación de la fosfatidilserina desde el foliolo interior hacia el exterior de la membrana plasmática usando el ensayo de afinidad por la anexina V (30). Se tiñeron las células muertas con PI, que entra en las células con una membrana plasmática interrumpida y se une al ADN. En comparación con el control de PBS, no hubo un aumento del número de células muertas (brillo de anexina V/PI, 2 %) o células apoptóticas tempranas (brillo de anexina V, 3 %) tras el tratamiento con IgG3 anti-HER2/*neu* (Fig. 5C). Por el contrario, cuando las células se trataron con IgG3-IFN- α , hubo un aumento significativo del número de células muertas (21 %) y células apoptóticas tempranas (6 %). El tratamiento con IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α produjo un mayor aumento tanto del número de células muertas (33 %) como de las células apoptóticas tempranas (16 %). Estos resultados indican que el IFN- α puede inducir la apoptosis en células tumorales 38C13/HER2, y que la dirección de IFN- α hacia las células tumorales puede aumentar notablemente este efecto.

[0141] Además de inducir la apoptosis, IFN- α puede inhibir directamente la proliferación de las células tumorales (31). Para determinar si tuvieron lugar tanto la inhibición de la proliferación como la apoptosis en las células tumorales tratadas, se trataron células 38C13/HER2 marcadas con CFSE con diferentes proteínas durante 48 h, se seleccionaron las células vivas, y se determinó el nivel de CFSE mediante citometría de flujo. La señal de CFSE en las células tratadas con IgG3 anti-HER2/*neu* (Fig. 5D, línea fina) se superpuso con las células tratadas con PBS, y fue significativamente inferior a la de las células fijadas inmediatamente después del marcaje con CFSE (Fig. 5D, línea de puntos), lo que indica que IgG3 anti-HER2/*neu* no inhibió la proliferación de 38C13/HER2. Por el contrario, IgG3-IFN- α inhibió significativamente la proliferación de las células 38C13/HER2 supervivientes (Fig. 5D, línea gruesa), y la dirección de IFN- α hacia las células 38C13/HER2 mediante IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α potenció este efecto (Fig. 5D, superficie de color negro). Estos resultados indicaron que, aunque el tratamiento con IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α no produjo la muerte celular completa en 48 h, las células supervivientes resultaron tener una capacidad reducida para proliferar.

Las proteínas de fusión IFN- α inducen la activación de STAT1 las en células tumorales

[0142] Aunque la unión del receptor de IFN- α puede iniciar la activación de múltiples proteínas STAT, STAT1 desempeña un papel obligado en la mediación de la señalización dependiente de IFN- α (32). Para investigar si las proteínas de fusión IFN- α inician la señalización de IFN- α en 38C13/HER2 y que la dirección de IFN- α hacia las células tumorales aumenta este efecto, se examinó la fosforilación de STAT1 tras el tratamiento. Como se muestra en las Fig. 6A-6C, tanto IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α como IgG3-IFN- α iniciaron una potente fosforilación de STAT1

en 38C13/HER2, aumentando la fosforilación de STAT1 8 veces en 10 min. Sin embargo, la fosforilación de STAT1 inducida por IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α persistió durante un período de tiempo mayor y se observó una fosforilación de STAT1 superior a los 30, 60 y 90 min en las células tratadas con IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α . Estos resultados indicaron que las proteínas de fusión IFN- α pueden inducir la señalización de IFN- α en células de linfoma 38C13 y la dirección de IFN- α hacia las células tumorales aumenta este efecto.

IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α mostró una potente actividad contra tumores establecidos

[0143] Dado que IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α mostró una potente citotoxicidad contra las células tumorales 38C13/HER2, se investigó si IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α sería eficaz contra los tumores de 38C13/HER2 establecidos. Se inocularon ratones singénicos s.c. con 1×10^3 células tumorales 38C13/HER2 y se trataron i.p. con 5 μ g (Fig. 7) de las proteínas indicadas en los días 12, 13 y 14 tras el desafío tumoral. El tamaño medio tumoral en el día 12 era de 100 mm³, y el tratamiento con PBS o 10 μ g de IgG3 anti-HER2/*neu* (datos no mostrados) no inhibió el crecimiento del tumor. El tratamiento con 5 μ g de IgG3-IFN- α mostró algún efecto en la inhibición del crecimiento del tumor. Sin embargo, todos los ratones desarrollaron tumores voluminosos y ninguno de ellos sobrevivió 32 días después del desafío tumoral. Por el contrario, todos los ratones tratados con 5 μ g de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α tuvieron un retardo del crecimiento tumoral, y tres de los ocho ratones tuvieron una regresión completa del tumor y permanecían sin tumor 50 días después del desafío tumoral (IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α frente a PBS, $p = 0,0001$; IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α frente a IgG3-IFN- α , $p = 0,063$). Así pues, tanto IgG3-IFN- α como IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α mostraron actividad antitumoral, pero IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α fue más eficaz en retrasar el crecimiento del tumor, observándose la remisión completa del tumor solo en los ratones tratados con IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α . Cuando se aumentó la dosis del tratamiento hasta 10 μ g de las proteínas de fusión, casi todos los ratones tratados con IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α o IgG3-IFN- α tuvieron una regresión completa del tumor y se mantenían sin el tumor después de 50 días.

[0144] Se volvieron a desafiar los ratones que se mantenían sin tumor tras el tratamiento con tres dosis de 10 μ g de proteínas de fusión con 1×10^3 células tumorales 38C13/HER2 el día 50. Todos los ratones permanecieron sin tumor (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que se inicia una respuesta inmune adaptativa con memoria inmunológica cuando se tratan los tumores más grandes establecidos con IFN- α fusionado con un anticuerpo.

Discusión

[0145] Aunque rIFN- α ha demostrado actividad contra el linfoma de linfocitos B y el mieloma múltiple, la eficacia y la toxicidad sistémica contradictorias han limitado su utilidad (33). El presente trabajo demuestra que la fusión de IFN- α con un anticuerpo mejora su eficacia contra los tumores, observándose un mayor aumento cuando IFN- α se dirige a las células tumorales mediante un anticuerpo específico de tumor. Esta eficacia antitumoral se observa sin ninguna toxicidad aparente. Estos estudios sugieren que la fusión de IFN- α con el anticuerpo específico del tumor puede producir un agente biológico eficaz para el tratamiento del linfoma de linfocitos B.

[0146] Para probar la hipótesis de que la dirección de IFN- α hacia los sitios tumorales con anticuerpos produciría una mejora de la eficacia, se seleccionó un linfoma de linfocitos B murino bien caracterizado diseñado por ingeniería genética para expresar un TAA común, HER2/*neu*, para el que hay anticuerpos disponibles. IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α parece ser más eficaz en el tratamiento del linfoma de linfocitos B 38C13 que las inmunoterapias descritas anteriormente, aunque, en el presente estudio, la diana fue un Ag foráneo introducido por transducción de genes. El tratamiento con tres dosis de 1 μ g de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α , partiendo 1 día después del desafío tumoral pareció ser tan eficaz en la inhibición del crecimiento del tumor como el tratamiento con 10 μ g de proteína de fusión IgG1 anti-Id-IL-2 durante 5 días, comenzando 1 día después del desafío tumoral (34). Además, IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α fue eficaz contra los tumores establecidos (Fig. 7), mientras que IgG1 anti-Id-IL-2 tuvo poca actividad antitumoral cuando se inició el tratamiento ya sea 3 o 7 días después del desafío tumoral (34). La capacidad para curar tumores establecidos también sugiere que IFN- α dirigido con anticuerpos es un agente terapéutico más potente que GM-CSF (35), CTLA-4 (36) o el ligando CD40 (37) fusionado con el Ag Id, ya que ninguna de estas estrategias de vacunación fue eficaz contra los tumores establecidos. Por lo tanto, la dirección de IFN- α hacia las células tumorales podría ser una metodología prometedora para el tratamiento del linfoma de linfocitos B.

[0147] La dirección de IFN- α hacia las células tumorales con un anticuerpo específico del tumor aumenta la eficacia antitumoral de IFN- α . IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α es más eficaz en la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis (Fig. 5A-5D) en 38C13/HER2 que IgG3-IFN- α , y el tratamiento, ya sea con 2,5 o con 1 μ g de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α fue más eficaz en la inhibición del crecimiento de tumores pequeños *in vivo* que las mismas dosis de IgG3-IFN- α (Fig. 3A y 3B). Estos resultados sugieren que el anticuerpo específico del tumor dirige IFN- α hacia el tumor, mejorando así su índice terapéutico con una toxicidad sistémica reducida.

[0148] Sorprendentemente, IgG3-IFN- α presenta una actividad antitumoral más potente que rIFN- α (Fig. 4A). Aunque rIFN- α es eficaz en el tratamiento de una variedad de tumores (38-40), se requiere un tratamiento prolongado con dosis altas para ver la actividad antitumoral eficaz, en parte, debido a la semivida muy corta de la citocina. En el presente estudio, se ha demostrado que la fusión de un anticuerpo IgG3 con IFN- α aumentó

significativamente su semivida (Fig. 4B), y este aumento de la semivida puede contribuir al aumento de la actividad antitumoral *in vivo* de la proteína de fusión (Fig. 4A). Además, la región Fc de la IgG3-IFN- α puede ayudar a dirigir IFN- α hacia los receptores Fc presentes en los linfocitos B de linfoma y, por consiguiente, aumentar la actividad antitumoral. Por lo tanto, la fusión de IFN- α con un anticuerpo IgG3 puede proporcionar múltiples ventajas en la mejora de la eficacia antitumoral de IFN- α .

[0149] Aunque IFN- α tiene múltiples actividades, incluyendo la activación de la respuesta inmune, parece que la citotoxicidad directa desempeña un papel importante en la potente actividad antitumoral de IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α . Ambas proteínas de fusión IFN- α presentaron actividades apoptóticas y antiproliferativas contra 38C13/HER2, aumentando significativamente estos efectos la dirección hacia el tumor (Fig. 5A-5D). Aunque las proteínas de fusión IFN- α resultaron ser muy eficaces en el tratamiento de tumores pequeños (Fig. 3A y 3B), ninguno de los supervivientes desarrolló una respuesta inmune que les protegiera contra un segundo desafío tumoral, lo que sugiere que la citotoxicidad directa de las proteínas de fusión IFN- α fue muy eficaz en la destrucción de las células tumorales, y que la inmunidad adaptativa no desempeñó un papel cuando hubo una baja carga tumoral. Dado que 38C13 es una línea celular de linfoma B extremadamente maligna y que los ratones inyectados con tan solo 200 células pueden desarrollar tumores voluminosos en el plazo de 20 días (36), las proteínas de fusión IFN- α deben ser muy eficaces en la destrucción de la mayoría de las células tumorales inoculadas, dando lugar a supervivientes a largo plazo. Se ha observado que múltiples mecanismos, entre los que se incluyen la regulación negativa de NF- κ B (41), la inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 (42) y la regulación positiva tanto de TRAIL (43), la inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 (42) y la regulación positiva tanto de TRAIL como de los receptores TRAIL (43), participan en la citotoxicidad mediada por IFN- α contra las células tumorales, y cabría esperar que estos mecanismos contribuyan a la citotoxicidad directa contra las células tumorales observada con las proteínas de fusión de anticuerpo-IFN- α . En consonancia con esto, se observó la activación de STAT1 tras el tratamiento de las células tumorales con las proteínas de fusión (Fig. 6A-6C).

[0150] Aunque las proteínas de fusión IFN- α no iniciaron una respuesta inmune de memoria cuando los ratones se trataron comenzando 1 día después de la inoculación del tumor, las proteínas de fusión IFN- α iniciaron una respuesta inmune que les protegió contra un segundo desafío tumoral cuando los ratones fueron tratados comenzando 12 días después de la inoculación del tumor. Por lo tanto, las proteínas de fusión IFN- α pueden activar la inmunidad adaptativa protectora en presencia de una carga tumoral de tamaño considerable. Dado que IFN- α es capaz de activar la inmunidad adaptativa a través de la estimulación de la diferenciación y la maduración de DC (9), es posible que los tumores establecidos proporcionen más TAA para la activación de DC en presencia de IFN- α . Además, el Ag HER2/*neu* humano foráneo puede contribuir a la inmunidad antitumoral mediante el aumento de la inmunogenicidad de las células tumorales en este modelo.

[0151] CD20, un Ag expresado por los linfocitos B, se expresa en la mayoría de los linfomas de linfocitos B (44), y anti-CD20 (rituximab, Genentech;) es uno de los agente terapéuticos del cáncer con mayor éxito, teniendo una enorme eficacia contra el linfoma con poca toxicidad (45). Aunque IgG3 anti-HER2/*neu*-IFN- α es muy eficaz contra 38C13/HER2, HER2/*neu* normalmente no se expresa en células de linfoma y, por lo tanto, es probable que tenga una limitada aplicación terapéutica en el tratamiento del linfoma, aunque debería ser eficaz en los tratamientos de los cánceres que expresan HER2/*neu*. Por el contrario, se espera que la fusión de IFN- α con anti-CD20 produzca una proteína de fusión eficaz contra el linfoma, incluso con mayor actividad antitumoral mediante la combinación de la actividad contra el linfoma de anti-CD20, y la potente actividad inmunoestimulante y citotóxica de IFN- α en una proteína. Además, IFN- α puede regular positivamente la expresión de CD20 como se observó en los pacientes con linfoma de linfocitos B tras el tratamiento con IFN- α (46). Actualmente, los presentes inventores están estudiando los efectos de las proteínas de fusión anti-CD20-IFN- α en modelos murinos de linfoma de linfocitos B.

[0152] En resumen, los presentes inventores han construido y caracterizado una nueva proteína de fusión en la que el IFN- α se ha ligado con un anticuerpo que reconoce un TAA. Sus resultados indican que la fusión de IFN- α con un anticuerpo específico del tumor puede aumentar drásticamente la eficacia de IFN- α , observándose la actividad antitumoral sin ninguna toxicidad aparente. Sorprendentemente, la proteína de fusión de anticuerpo-IFN- α fue eficaz contra los tumores establecidos. Por lo tanto, IFN (por ejemplo, IFN- α) fusionado con un anticuerpo específico del tumor se muestra prometedor para el tratamiento del linfoma de linfocitos B.

Referencias

[0153]

1. Disis, M. L., S. M. Pupa, J. R. Gralow, R. Dittadi, S. Menard y M. A. Cheever. 1997. "High-titer HER-2/*neu* protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer". *J. Clin. Oncol.* 15: 3363-3367.
2. Dranoff, G. y R. C. Mulligan. 1995. "Gene transfer as cancer therapy". *Adv. Immunol.* 58: 417-154.
3. Hrouda, D., M. Perry y A. G. Dalgleish. 1999. "Gene therapy for prostate cancer". *Semin. Oncol.* 26: 455-471.

4. Hurford, R. K., Jr., G. Dranoff, R. C. Mulligan y R. I. Tepper. 1995. "Gene therapy of metastatic cancer by in vivo retroviral gene targeting". *Nat. Genet.* 10: 430-435.
5. Peng, L. S., M. L. Penichet y S. L. Morrison. 1999. "A single-chain IL- 5 12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity". *J. Immunol.* 163: 250-258.
6. Dela Cruz, J. S., K. R. Trinh, S. L. Morrison y M. L. Penichet. 2000. "Recombinant anti-human HER2/*neu* IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity". *J. Immunol.* 165: 5112-5121.
7. Osenga, K. L., J. A. Hank, M. R. Albertini, J. Gan, A. G. Sternberg, J. Eickhoff, R. C. Seeger, K. K. Matthey, C. P. Reynolds, C. Twist, *et al.* 2006. "A phase I clinical trial of the hUL4.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group". *Clin. Cancer Res.* 12: 1750-1759.
8. Belardelli, F. y M. Ferrantini. 2002. "Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity". *Trends Immunol.* 23: 201-208.
9. Santini, S. M., C. Lapenta, M. Logozzi, S. Parlato, M. Spada, T. Di Pucchio y F. Belardelli. 2000. "Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice". *J. Exp. Med.* 191: 1777-1788.
10. Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, B. Beutler y D. H. Kono. 2005. "Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity". *Annu. Rev. Immunol.* 23: 307-336.
11. Finkelman, F. D., A. Svetic, I. Gresser, C. Snapper, J. Holmes, P. P. Trotta, I. M. Katona y W. C. Gause. 1991. "Regulation by interferon of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice". *J. Exp. Med.* 174: 1179-1188.
12. Tough, D. F., P. Borrow y J. Sprent. 1996. "Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo". *Science* 272: 1947-1950.
13. Ferrantini, M., M. Giovarelli, A. Modesti, P. Musiani, A. Modica, M. Venditti, E. Peretti, P. L. Lollini, P. Nanni, G. Forni, *et al.* 1994. "IFN- α 1 gene expression into a metastatic murine adenocarcinoma (TS/A) results in CD8⁺ T cell-mediated tumor rejection and development of antitumor immunity: comparative studies with IFN- α -producing TS/A cells". *J. Immunol.* 153: 4604-4615.
14. Gutterman, J. U., G. R. Blumenschein, R. Alexanian, H. Y. Yap, A. U. Buzdar, F. Cabanillas, G. N. Hortobagyi, E. M. Hersh, S. L. Rasmussen, M. Harmon, *et al.* 1980. "Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma". *Ann. Intern. Med.* 93: 399-406.
15. Takaoka, A., S. Hayakawa, H. Yanai, D. Stoiber, H. Negishi, H. Kikuchi, S. Sasaki, K. Imai, T. Shibue, K. Honda y T. Taniguchi. 2003. "Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence". *Nature* 424: 516-523.
16. Sidky, Y. A. y E. C. Borden. 1987. "Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses". *Cancer Res.* 47: 5155-5161.
17. Rodriguez-Villanueva, J. y T. J. McDonnell. 1995. "Induction of apoptotic cell death in non-melanoma skin cancer by interferon- γ ". *Int. J. Cancer* 61: 110-114.
18. Akiyama, T., C. Sudo, H. Ogawara, K. Toyoshima y T. Yamamoto. 1986. "The product of the human *c-erbB-2* gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity". *Science* 232: 1644-1646.
19. Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C. C. Benz, L. Dantis, N. T. Sklarin, A. D. Seidman, C. A. Hudis, J. Moore, *et al.* 1996. "Phase II study of weekly intravenous recombinant anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/*neu*-overexpressing metastatic breast cancer". *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744.
20. Schier, R., A. McCall, G. P. Adams, K. W. Marshall, H. Merritt, M. Yim, R. S. Crawford, L. M. Weiner, C. Marks y J. D. Marks. 1996. "Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site". *J. Mol. Biol.* 263: 551-567.

21. Reid, T. R., E. R. Race, B. H. Wolff, R. M. Friedman, T. C. Merigan y T. Y. Basham. 1989. "Enhanced in vivo therapeutic response to interferon in mice with an in vitro interferon-resistant B-cell lymphoma". *Cancer Res.* 49: 4163-4169.
- 5 22. Coloma, M. J., A. Hastings, L. A. Wims y S. L. Morrison. 1992. "Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction". *J. Immunol. Methods* 152: 89-104.
23. Huang, T. H. y S. L. Morrison. 2005. "A trimeric anti-HER2/*neu* ScFv and TNF- α fusion protein induces HER2/*neu* signaling and facilitates repair of injured epithelia". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316: 983-991.
- 10 24. Carlsson, G., B. Gullberg y L. Hafstrom. 1983. "Estimation of liver tumor volume using different formulas: an experimental study in rats". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 105: 20-23.
25. Ramsden, L. y C. C. Rider. 1992. "Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans". *Eur. J. Immunol.* 22: 3027-3031.
- 15 26. Fernandez-Botran, R., J. Yan y D. E. Justus. 1999. "Binding of interferon α by glycosaminoglycans: a strategy for localization and/or inhibition of its activity". *Cytokine* 11:313-325.
- 20 27. Basham, T. Y., M. S. Kaminski, K. Kitamura, R. Levy y T. C. Merigan. 1986. "Synergistic antitumor effect of interferon and anti-idiotypic monoclonal antibody in murine lymphoma". *J. Immunol.* 137: 3019-3024.
28. Basham, T. Y., E. R. Race, M. J. Campbell, T. R. Reid, R. Levy y T. C. Merigan. 1988. "Synergistic antitumor activity with IFN and monoclonal anti-idiotypic for murine B cell lymphoma. Mechanism of action". *J. Immunol.* 141: 2855-2860.
- 25 29. Bailón, P., A. Palleroni, C. A. Schaffer, C. L. Spence, W. J. Fung, J. E. Porter, G. K. Ehrlich, W. Pan, Z. X. Xu, M. W. Modi, *et al.* 2001. "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycolconjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C". *Bioconjugate Chem.* 12: 195-202.
- 30 30. Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals y M. H. van Oers. 1994. "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis". *Blood* 84: 1415-1420.
- 35 31. Tiefenbrun, N., D. Melamed, N. Levy, D. Resnitzky, I. Hoffman, S. I. Reed y A. Kimchi. 1996. "Interferon suppresses the cyclin D3 and *cdc25A* genes, leading to a reversible G0-like arrest". *Mol. Cell. Biol.* 16: 3934-3944.
- 40 32. Meraz, M. A., J. M. White, K. C. Sheehan, E. A. Bach, S. J. Rodig, A. S. Dighe, D. H. Kaplan, J. K. Riley, A. C. Greenlund, D. Campbell, *et al.* 1996. "Targeted disruption of the *Stat1* gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway". *Cell* 84: 431-442.
- 45 33. Oken, M. M. 1992. "New agents for the treatment of multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma". *Cancer* 70: 946-948.
34. Liu, S. J., Y. P. Sher, C. C. Ting, K. W. Liao, C. P. Yu y M. H. Tao. 1998. "Treatment of B-cell lymphoma with chimeric IgG and single-chain Fv antibody interleukin-2 fusion proteins". *Blood* 92: 2103-2112.
- 50 35. Tao, M. H. y R. Levy. 1993. "Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma". *Nature* 362: 755-758.
36. Huang, T. H. P. Y. Wu, C. N. Lee, H. I. Huang, S. L. Hsieh, J. Kung y M. H. Tao. 2000. "Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA-4 to a self tumor antigen". *Blood* 96: 3663-3670.
- 55 37. Huang, H. I., P. Y. Wu, C. Y. Teo, M. N. Chen, Y. C. Chen, D. Silin y M. H. Tao. 2004. "Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand". *Int. J. Cancer* 108: 696-703.
- 60 38. Gastl, G., H. Denz, C. Abbrederis, H. Huber, J. Troppmair, J. Wiegele, D. Niederwieser, R. Flener y C. Huber. 1985. "Treatment with low dose human recombinant interferon- γ -2-ARG induces complete remission in patients with hairy cell leukemia". *Onkologie* 8: 143-144.
39. Atzpodi, J., H. Poliwoda y H. Kirchner. 1991. "Interferon and interleukin-2 in renal cell carcinoma: studies in nonhospitalized patients". *Semin Oncol.* 18: 108-112.
- 65 40. Krown, S. E., J. Paredes, D. Bundow, B. Polsky, J. W. Gold y N. Flomenberg. 1992. "Interferon- γ , zidovudine,

and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a phase IAIDS clinical trials group study in patients with Kaposi's sarcoma associated with AIDS". *J. Clin. Oncol.* 10: 1344-1351.

41. Rath, P. C. y B. B. Aggarwal. 2001. "Antiproliferative effects of IFN- α correlate with the downregulation of nuclear factor- κ B in human Burkitt lymphoma Daudi cells". *J. Interferon Cytokine Res.* 21: 523-528.

42. Yanase, N., K. Ohshima, H. Ikegami y J. Mizuguchi. 2000. "Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax- α cleavage during IFN- α -induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells". *J. Interferon Cytokine Res.* 20: 1121-1129.

43. Oshima, K., N. Yanase, C. Ibukiyama, A. Yamashina, N. Kayagaki, H. Yagita, and J. Mizuguchi. 2001. Involvement of TRAIL/TRAIL-R interaction in IFN- α -induced apoptosis of Daudi B lymphoma cells. *Cytokine* 14: 193-201.

44. Riley, J. K. y M. X. Sliwowski. 2000. "CD20: a gene in search of a function". *Semin. Oncol.* 27: 17-24.

45. McLaughlin, P., A. J. Grillo-Lopez, B. K. Link, R. Levy, M. S. Czuczman, M. E. Williams, M. R. Heyman, I. Bence-Bruckler, C. A. White, F. Cabanillas, *et al.* 1998. "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program". *J. Clin. Oncol.* 16: 2825-2833.

46. Sivaraman, S., P. Venugopal, R. Ranganathan, C. G. Deshpande, X. Huang, A. Jajeh, S. A. Gregory, T. O'Brien y H. D. Preisler. 2000. "Effect of interferon- α on CD20 antigen expression of B-cell chronic lymphocytic leukemia". *Cytokines Cell Mol. Ther.* 6: 81-87.

25 **Ejemplo**

Proteínas de fusión anti-CD20-IFN α

Introducción

[0154] Los estudios iniciales de los presentes inventores habían indicado que una proteína de fusión con anti-HER2/*neu* unido a IFN- α era un eficaz agente terapéutico para el tratamiento de los linfomas que expresan HER2/*neu*. Los presentes inventores han tratado de ampliar estos estudios para demostrar que la fusión de IFN- α con anti-CD20 sería terapéuticamente eficaz para el tratamiento de los linfomas que expresan CD20. CD20 está presente en prácticamente todos los linfomas. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que HER2/*neu* se expresa en muchos tipos de cáncer, y cabría esperar que la proteína de fusión anti-HER2/*neu* fuera eficaz en el tratamiento de los mismos. En la proteína de fusión anti-CD20, cabría esperar que el IFN- α de la proteína de fusión ejerciera un efecto citotóxico directo contra las células tumorales y ayudara a generar una respuesta inmune antitumoral.

Producción de anticuerpos recombinantes específicos de CD20

[0155] Se amplificaron las regiones variables de anti-CD20 (Rituximab) y se clonaron en vectores de expresión para la producción de anticuerpos quiméricos con cadenas ligeras κ y cadenas pesadas γ 3 humanas. Se produjo la proteína y se examinó su capacidad para reconocer CD20 usando citometría de flujo y la línea de linfocitos B humana Daudi. Como se muestra en la Figura 8, la proteína recombinante se une tan bien como Rituximab, una IgG1 recombinante.

Producción de proteínas de fusión de anticuerpo con interferón humano unido a anticuerpos específicos de CD20

a. Diseño de la proteína de fusión

[0156] En el intento inicial de los presentes inventores por crear una proteína de fusión, se unió IFN- α con el extremo carboxi del gen de la IgG3 humana usando un enlazador de glicina-serina flexible que consistía en (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N°: 31). La cadena pesada se muestra esquemáticamente en la Figura 9.

[0157] Tras verificar que el vector de proteína de fusión tenía la secuencia de nucleótidos correcta, se transfeció con la cadena ligera de anti-CD20 quimérica a células NS0. Se seleccionaron las transfecciones mediante ELISA para la producción de IgG. Se expandió el clon que dio la señal más alta y la siguiente subclonación se cultivó en frascos rotativos. Entonces, se pasaron los sobrenadantes a través de columnas de proteína A Sefarosa, y las proteínas unidas se eluyeron y se analizaron por SDS-PAGE tanto sin reducir como después de la reducción (véase, Figura 10). Aunque la proteína aislada se ensambló en moléculas H₂L₂, la mayoría de la proteína aislada fue inferior a la esperada. Tras la reducción, la mayoría de las cadenas pesadas fueron más pequeñas de lo esperado y se desplazaron en la misma posición que una cadena pesada γ -3 carente de una proteína de fusión. Al parecer, el interferón estaba siendo retirado de la proteína de fusión por proteólisis. El análisis de transferencia Western usando

anti-Fc e anti-interferón, confirmó que ambas bandas superiores eran cadenas pesadas, pero solo la mayor contenía interferón.

[0158] Los enlazadores flexibles pueden ser una diana de la escisión proteolítica. Por lo tanto, se acortó el enlazador a una sola copia de Gly₄Ser (SEC ID N°: 32). Se transfectaron estos vectores y los vectores con el enlazador extendido transitoriamente junto con la cadena ligera apropiada a células HEK293T. Se radiomarcaron las células mediante crecimiento en ³⁵S-metionina, se precipitaron las inmunoglobulinas con proteína A y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 11). Considerando que la escisión de proteínas de fusión con enlazadores ampliados es muy evidente, la escisión no tiene lugar cuando el enlazador consiste en un solo Gly₄Ser (SEC ID N°: 32). Por lo tanto, el enlazador usado para producir la proteína de fusión es importante y puede influir en su estabilidad.

b. Reconocimiento de CD20 por las proteínas de fusión

[0159] Para determinar si la proteína de fusión reconoce a CD20, se incubó la línea celular humana Daudi que expresa CD20 con Rituxan, anti-DNS/IgG3-hu-IFN-α o anti-CD20/IgG3-hu-IFN-α. El anti-CD20/IgG3-hu-IFN-α se unió mejor que Rituxan (Figura 12). La fusión de anti-DNS/IgG3-hu-IFN-α también demostró cierta unión, aunque inferior a la de cualquier proteína específica de CD20. Se postula que la unión del anti-DNS/IgG3-hu-IFN-α y la unión mejorada de anti-CD20/IgG3-hu-IFN-α en comparación con Rituxan se debe a que el resto de hu-IFN-α se une a los receptores de IFN expresados en las células Daudi.

[0160] El laboratorio Timmerman ha producido un transfectante del linfoma murino 38C13 que expresa CD20 humano. Tanto Rituxan como anti-CD20/IgG3-mu-IFN-α se unieron al transfectante. Anti-DNS/IgG3-mu-IFN-α no mostró ninguna unión (Figura 13).

c. Actividad antiviral de las proteínas de fusión

[0161] Para evaluar la actividad antiviral de las proteínas de fusión hu-IFN-α, se sembraron células HeLa a 2x10⁵ células/ml y se trataron con diluciones en serie del doble de proteína de fusión o Roferon (interferón humano recombinante 2a) durante 24 horas. A continuación, se infectaron las células con VSV (virus de la estomatitis vesicular) a una concentración de 4.000 pfu/100 µl. Después de 72 horas, se tiñeron las células con cristal violeta al 0,1 %. Se determinó la protección contra la infección viral ya sea mediante la cuantificación de las células supervivientes de la infección por tinción con cristal violeta al 0,1 % y la determinación de la cantidad de colorante en cada pocillo usando un densitómetro puntual mediante el recuento del número de placas. En ambos ensayos, la proteína de fusión tuvo una actividad de IFN-α significativa, pero aproximadamente 100 veces inferior a la actividad en comparación con Roferon.

Inhibición del crecimiento y muerte de las células del linfoma Daudi con las proteínas de fusión

[0162] Se usaron dos métodos para evaluar la inhibición del crecimiento/muerte de las células de linfoma que expresan CD20 por las proteínas de fusión. Cabe señalar que, para estos experimentos, se usó una línea celular humana, Daudi, que expresa de manera natural CD20. En la primera metodología, se incubaron las células Daudi con varias concentraciones de IFN-α, anticuerpo o proteína de fusión durante 72 horas, y se evaluó la inhibición del crecimiento usando el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 AQueous (Figura 14). Aunque mostraron menos actividad de IFN-α en el ensayo antiviral, anti-CD20/IgG3-hu-IFN-α y Roferon mostraron una capacidad similar para inhibir el crecimiento del linfoma, lo que sugiere que la dirección del IFN-α mejora su efecto citotóxico. Roferon Anti-CD20/IgG3+ no mostró mayor actividad en comparación con solo Roferon. Anti-DNS/IgG3-hIFN-α, Rituxan y anti-CD20/IgG3 solo mostraron cierta inhibición del crecimiento a la concentración más alta usada. Cabe señalar que la proteína de fusión fue más activa que Rituxan en la prevención del crecimiento celular en este ensayo.

[0163] En la segunda metodología, se incubaron las células Daudi con varias concentraciones de IFN-α, anticuerpo o proteína de fusión durante 72 horas y luego se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio (PI), y se analizaron por citometría de flujo. En la Figura 15, se muestran los resultados obtenidos al usar 10 pM de las diversas proteínas. Las células de las fases tempranas de la apoptosis son Anexina V⁺PI⁻; las células apoptóticas y muertas posteriores son Anexina V⁺PI⁺.

[0164] Estos experimentos demuestran varias cosas. Tanto Rituxan como anti-CD20/IgG3 inducen poca o ninguna apoptosis, incluso a las concentraciones ensayadas más altas. Como era de esperar, el IFN-α murino es menos eficaz contra la línea celular humana que el IFN-α recombinante humano (Roferon) y, anti-DNS/IgG3-mIFNα, que no se dirigiría a las células tumorales, es aproximadamente tan eficaz como el IFN-α recombinante murino. Sin embargo, la dirección del IFN-α murino hacia las células tumorales usando anti-CD20/IgG3-mIFNα induce eficazmente la muerte celular. Anti-CD20/IgG3-hIFNα es más eficaz que anti-DNS/IgG3-hIFNα, demostrando de nuevo la contribución de la dirección a la célula a la muerte celular. En este ensayo *in vitro*, Roferon y anti-CD20/IgG3-hIFNα presentan actividad similar, provocando la muerte celular a concentraciones tan bajas como 1 pM (datos no mostrados). Sin embargo, cabe señalar que CD20/IgG3-hIFNα *in vivo* se dirigirá hacia y se acumulará en

el sitio del tumor, mientras que Roferon presentará su actividad por todo el cuerpo.

Inhibición del crecimiento y muerte de las células del linfoma 38C13-CD20 con las proteínas de fusión

5 [0165] Como se ha mencionado brevemente con anterioridad, el laboratorio del Dr. John Timmerman ha desarrollado un linfoma murino, 38C13-CD20, que expresa CD20 humano y crecerá en ratones C3H/HeJ singénicos. La disponibilidad de esta línea celular permite examinar la eficacia *in vivo* de las presentes proteínas de fusión. Se incubaron células 38C13-CD20 durante 48 horas con diversos anticuerpos y proteínas de fusión. A continuación, se determinaron la muerte y la apoptosis mediante la tinción de las células con anexina V y PI, y examinándolas usando
10 citometría de flujo. Cuando se usaron las proteínas a una concentración de 100 pM (datos no mostrados) tanto mIFN- α recombinante como anti-CD20-IgG3-mIFN- α fueron muy eficaces causando la apoptosis, siendo anti-CD20-IgG3-mIFN- α algo más eficaz que mIFN- α recombinante. Parte de la apoptosis fue inducida mediante el tratamiento de las células 38C13-CD20 con anti-DNS-IgG3-mIFN- α o Rituxan. El tratamiento con anti-CD20/IgG3 a esta
15 concentración no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular. Cuando se redujo la concentración del tratamiento a 10 pM (Fig. 16), mIFN- α recombinante y anti-CD20/IgG3-mIFN- α siguieron siendo eficaces como causantes de la apoptosis, siendo anti-CD20/IgG3-mIFN- α más eficaz que mIFN- α recombinante. Solo se observó una pequeña cantidad de apoptosis tras el tratamiento con anti-DNS-IgG3-mIFN- α , lo que indica que la dirección de IFN- α usando anti-CD20-IgG3-mIFN- α produjo un agente terapéutico más eficaz. A esta concentración, Rituxan causó poca apoptosis, lo que indica la superioridad de la proteína de fusión anti-CD20-IgG3/mIFN- α frente al anticuerpo anti-
20 CD20 no fusionado. Una vez más, el tratamiento con anti-CD20/IgG3 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular. A una dosis de tratamiento de 1 pM, solo anti-CD20-IgG3-mIFN- α produjo apoptosis en 38C13-CD20 (datos no mostrados). A una dosis de 0,1 pM, ninguno de los tratamientos indujeron la apoptosis (datos no mostrados).

[0166] Como metodología alternativa, se trataron las células 38C13-CD20 con las diferentes proteínas a diferentes
25 concentraciones, y se monitorizó la inhibición del crecimiento usando el ensayo de MTS (Figura 17). Anti-CD20/IgG3-mIFN- α fue más eficaz en la inhibición del crecimiento celular, seguido de mIFN- α recombinante. Se observó cierta inhibición del crecimiento con anti-DNS/IgG3-mIFN- α . Anti-CD20/IgG3 y Rituxan tuvieron poco efecto sobre el crecimiento celular. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este ensayo reflejan lo que se observó al monitorizar la apoptosis.

30

Producción y caracterización de proteínas de fusión IgG-IFN α adicionales

a. Anti-CD20-IgG1-mIFN α y anti-CD20-IgG1-hIFN α

35 [0167] Se crearon las proteínas iniciales con IFN- α fusionado a una estructura principal de IgG3 humana. Rituxan es una IgG1. Para determinar si la estructura principal de la inmunoglobulina influía en las propiedades de las proteínas de fusión, ahora se han producido proteínas de fusión con m-IFN- α y hu-IFN- α fusionados a IgG1. Eran del peso molecular esperado.

40 [0168] Se evaluó la capacidad de anti-CD20/IgG1-mIFN α para inducir la apoptosis de 38C13-CD20 (Figura 18). Los estudios mostraron que era eficaz, posiblemente incluso más eficaz que la proteína de fusión IgG3.

[0169] Se evaluó la capacidad de anti-CD20/IgG1-hIFN α para inducir la apoptosis de las células Daudi. Los estudios mostraron que presentan actividad similar a anti-CD20/IgG3-hIFN α (Fig. 19).

45

[0170] Se evaluó la capacidad de las proteínas de fusión para inhibir el crecimiento de células Daudi como se muestra en la Figura 20. Las fusiones de IgG1 con IFN- α tanto murino como humano se parecían a las fusiones de IgG3 en su capacidad para inhibir el crecimiento de células Daudi.

b. Proteínas de fusión con IFN- α unidas a la estructura principal de IgG con un enlazador helicoidal α

[0171] Se produjeron proteínas de fusión en las que el enlazador GlySer se reemplazó con el enlazador con la secuencia A(EAAAK)₂A (SEC ID N°: 33). Se propone que esta secuencia se pliega como una hélice α .

55 [0172] Se produjo la proteína mediante la expresión transitoria en células 293T y se evaluó por SDS-PAGE. Se ensambló la proteína y resultó ser del peso molecular esperado. No se observó la escisión del enlazador.

[0173] La proteína de fusión, anti-CD20-IgG3-hIFN α (enlazador helicoidal α), cuando se usó a la misma concentración que la proteína de fusión con el enlazador Gly₄Ser (SEC ID N°: 32), resultó inducir eficazmente la
60 apoptosis de las células Daudi (Fig. 21).

Tratamiento *in vivo* de tumores

[0174] Para estos estudios, se usó el linfoma 38C13 que había sido transducido por el laboratorio Timmerman para
65 expresar CD20 humano. 38C13 es un linfoma agresivo que crece en ratones C3H/HeJ singénicos. El transductante,

38C13-CD20, muestra la misma característica de crecimiento. Por lo tanto, es posible investigar la protección mediada por proteínas de fusión en animales inmunocompetentes.

a. Tratamiento de los tumores tempranos

5 **[0175]** Se inyectaron en ratones (grupos de 4) por vía subcutánea 5.000 células 38C13-CD20 en el día cero. En los días 1, 2 y 3, se trataron por vía intravenosa con solución salina tamponada con HEPES (HBSS) o 0,4 µg, 2 µg o 10 µg de anti-CD20-m-IFN-α, y se monitorizó el crecimiento del tumor. Hacia el día 20, todos los animales tratados con HBSS tenían tumores de gran tamaño, y tuvieron que ser sacrificados. Por el contrario, no se observó
10 crecimiento del tumor en los animales tratados con 10 µg de la proteína de fusión; después de 20 días, los tumores comenzaron a crecer en 3 de los cuatro animales tratados con 0,4 µg de la proteína de fusión, y 1 de los ratones tratados con 2 µg. Los resultados mostraron que las proteínas de fusión anti-CD20/IFN-α son muy eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* y en el aumento de la supervivencia (véase, por ejemplo, la Figura 22).

15 b. La proteína de fusión anti-CD20-mIFNα es más eficaz que bien Rituximab o anti-CD20/IgG3 en el tratamiento de tumores de tamaño moderado

[0176] Se inocularon ratones C3H/HeJ con 5.000 células 38C13-CD20 en el día 0. En los días 5, 6 y 7 se trataron con HBSS o 10 µg de anti-CD20-IgG1 (producido en células 293T), anti-CD20-IgG3, Rituximab o anti-CD20-IgG3-
20 mIFNα. Se monitorizaron en cuanto al crecimiento tumoral y la supervivencia (véase, por ejemplo, Figura 23). Anti-CD20/IgG3-mIFNα resultó ser mucho más eficaz que Rituximab, anti-CD20/IgG3 o anti-CD20/IgG1 en la prevención del crecimiento de los tumores de tamaño moderado.

25 La capacidad de dirección hacia el tumor de la proteína de fusión mejora significativamente su eficacia *in vivo*

[0177] Se inocularon ratones C3H/H3J con 5.000 células 38C13-CD20 en el día 0, y se trataron en los días 5, 6 y 7 con 10 µg de anti-CD20-IgG3, 10 µg de anti-CD20-IgG3 + mIFN-α (dosis seleccionada para que fuera los mismos
30 moles que en la proteína de fusión), anti-DNS-IgG3-IFNα o anti-CD20-IgG3-mIFNα, y recibieron un seguimiento del crecimiento tumoral y de la supervivencia (véase, por ejemplo, la Figura 24). Anti-CD20-IgG3-IFNα retrasó significativamente el crecimiento del tumor y promovió la supervivencia, lo que indica que la dirección del IFNα al tumor usando el sitio de combinación del anticuerpo, lo vuelve más eficaz terapéuticamente que bien la proteína de fusión no dirigida al IFNα fusionado (anti-DNS-IgG3-IFNα) o la inyección de anti-CD20 junto con IFNα que no está asociado covalentemente (anti-CD20-IgG3 + mIFN-α).
35

El tratamiento con proteínas de fusión es eficaz contra los tumores establecidos

[0178] Se inocularon grupos de ocho ratones C3H/HeJ con 5.000 células 38C13-CD20 y se trataron en los días 8, 9 y 10 con 100 µg de anti-CD20-mIFNα o HBSS. Se monitorizó el crecimiento tumoral (véase Fig. 25) y la
40 supervivencia (véase, Figura 26) de los ratones. Los ratones inoculados con anti-CD20-mIFNα muestran una mejora de la supervivencia (Figura 26).

LISTADO DE SECUENCIAS

45 [0179]

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA MORRISON, SHERIE L. HUANG, TZU-HSUAN XUAN, CAIYUN

50 <120> EL INTERFERÓN DIRIGIDO DEMUESTRA POTENTES ACTIVIDADES APOPTÓTICAS Y ANTITUMORALES

<130> RT/P1774EP00

55 <140> 08831632.8
<141> 21-09-2007

<150> US 60/994.717
<151> 21-09-2007

60 <150> PCT/US2008/077074
<151> 19-09-2008

<160> 59

65

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 707

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión.

<400> 1

```

Met Gly Trp Ser Trp Val Met His Leu Ser Pro Val Ser Asn Cys Gly
1          5          10          15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45

Thr Ser Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50          55          60

Glu Tyr Met Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser
65          70          75          80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser
          85          90          95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val
100          105          110

Tyr Phe Cys Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys
115          120          125

```

Ala Lys Trp Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 130 135 140
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 145 150 155 160
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 165 170 175
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 180 185 190
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 195 200 205
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 210 215 220
 Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 225 230 235 240
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr
 245 250 255
 His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro
 275 280 285
 Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
 290 295 300
 Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 325 330 335
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 340 345 350
 Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 355 360 365
 Leu Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 370 375 380

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
385 390 395 400

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
405 410 415

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
420 425 430

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
435 440 445

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
450 455 460

Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
465 470 475 480

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
485 490 495

Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
500 505 510

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly
515 520 525

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu
530 535 540

Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr Leu Leu Val
545 550 555 560

Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp Arg Lys Asp
565 570 575

Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile Lys Lys Ala
580 585 590

Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile Leu Asn Ile
595 600 605

Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr Leu Leu Asp
610 615 620

Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu Gln Gly Cys
625 630 635 640

Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr Gln Glu Asp
645 650 655

Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu
660 665 670

Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu
675 680 685

Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly Arg Leu Arg
690 695 700

Glu Glu Lys
705

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

<400> 2

Met Glu Trp Ser Cys Val Met Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

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

Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

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

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

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

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 3
<211> 558
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 3

```

atgaagtgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgcttc cagcagtcaa      60
attgttctct cccagtctcc agcaatcctg tctgcatctc caggggagaa ggtcacaatg      120
acttgcaggg ccagctcaag tgtaagttac atccactggt tccagcagaa gccaggatcc      180
tcccccaaac cctggattta tgccacatcc aacctggctt ctggagtccc tgttcgcttc      240
agtggcagtg ggtctgggac ttcttactct ctcacaatca gcagagtgga ggctgaagat      300
gctgccactt attactgcca gcagtggact agtaaccac ccacgttcgg aggggggacc      360
aagctggaaa tcaaacgtaa gtcgactttc tcatcttttt ttatgtgtaa gacacaggtt      420
ttcatgttag gagttaagt cagttcagaa aatcttgaga aaatggagag ggctcattat      480
cagttgacgt ggcatacagt gtcagatttt ctgtttatca agctagtgag attaggggca      540
aaaagaggct ttagttga                                     558

```

15 <210> 4
<211> 185
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Proteína de fusión.

<400> 4

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
35 40 45

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

Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val
85 90 95

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
100 105 110

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

Thr Phe Ser Ser Phe Phe Met Cys Lys Thr Gln Val Phe Met Leu Gly
130 135 140

Val Lys Val Ser Ser Glu Asn Leu Glu Lys Met Glu Arg Ala His Tyr
145 150 155 160

Gln Leu Thr Trp His Thr Val Ser Asp Phe Leu Phe Ile Lys Leu Val
165 170 175

Arg Leu Gly Ala Lys Arg Gly Phe Ser
180 185

<210> 5

<211> 2254

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

10

<400> 5

ES 2 536 772 T3

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaagggtg ccagagtcag	60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgga atggtgatac ttctacaat	240

cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgagggga ccacggtcac cgtctctgca	420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg	480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag	720
aggccagcgc agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac	780
gcctcccgcc tgtgcagtcc cagcccaggg caccaaggca gggcccgctc gactcctcac	840
ccggaggcct ctgcccgccc cactcatgct cagggagagg gtcttctggc tttttccacc	900
aggctccggg caggcacagg ctggatgcc ctaccccagg cccttcacac acaggggcag	960
gtgctgcgct cagagctgcc aagagccata tccaggagga ccctgccctc gaccgagctc	1020
aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggg gccagagcc caaatcttgt	1080
gacacacctc ccccgctgcc aaggtgcca gagcccaat cttgtgacac acctccccg	1140
tgcccaagggt gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccgctgcc aaggtgcca	1200
tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg	1260
aggctcagtt caagtgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagctgc	1320
gggagggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctc ctgcaccagg	1380
actggtctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca	1440
tcgagaaacc atctccaaag ccaaaatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt	1500
caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatggg agccggagaa	1560
caactacaac accacgcctc ccctgctgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagcaa	1620
gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacatc ttctcatgct ccgtgatgca	1680
tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatctgg	1740
tggcgggtgga tctgtgacc tgccctagac tcataacctc aggaacaaga gagcctgac	1800
actcctggta caaatgagga gactctcccc tctctcctgc ctgaaggaca ggaaggactt	1860
tggattcccg caggagaagg tggatgccc gcagatcaag aaggctcaag ccctccctgt	1920
cctgagttag ctgaccagc agatcctgaa catcttcaca tcaaaggact catctgctgc	1980
ttggaatgca accctcctag actcattctg caatgaacct caccagcagc tcaatgacct	2040
gcaagggtgt ctgatgcagc aggtgggggt gcaggaattt cccctgacct aggaagatgc	2100
cctgctggct gtgaggaaat acttccacag gatcactgtg tacctgagag agaagaaca	2160
cagccctgt gcctgggagg tggtcagagc agaagtctgg agagccctgt ctctctctgc	2220
caatgtgctg ggaagactga gagaagagaa atga	2254

<210> 6
 <211> 751
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 6

10

```

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly
1           5           10           15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
50           55           60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65           70           75           80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
          85           90           95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
          100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
          115          120          125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
          130          135          140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly
145          150          155          160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
          165          170          175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
          180          185          190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
          195          200          205
    
```

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu
225 230 235 240

Arg Pro Ala Gln Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Pro
245 250 255

Ser Cys Leu Asp Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly His Gln
260 265 270

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

His Ala Gln Gly Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Thr Arg Leu Arg Ala
290 295 300

Gly Thr Gly Trp Met Pro Leu Pro Gln Ala Leu His Thr Gln Gly Gln
305 310 315 320

Val Leu Arg Ser Glu Leu Pro Arg Ala Ile Ser Arg Arg Thr Leu Pro
325 330 335

Leu Thr Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
340 345 350

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
355 360 365

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
370 375 380

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
385 390 395 400

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
405 410 415

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
420 425 430

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
435 440 445

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
450 455 460

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 465 470 475 480

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro
 515 520 525

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 530 535 540

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met
 545 550 555 560

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 565 570 575

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His
 580 585 590

Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr Leu Leu Val Gln Met Arg Arg
 595 600 605

Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro
 610 615 620

Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile Lys Lys Ala Gln Ala Ile Pro
 625 630 635 640

Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys
 645 650 655

Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn
 660 665 670

Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln
 675 680 685

Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala
 690 695 700

Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys
 705 710 715 720

His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala

725

730

735

Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Glu Lys
740 745 750

<210> 7

<211> 2279

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 7

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaaggtgt ccagagtcag	60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccggaa atggtgatac ttcctacaat	240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gcoctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
tacggcgggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca	420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg	480
ggcacagcgg coctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gaoggtgtcg	540
tggaaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtoctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag	720
aggccagcgc agggaggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac	780
gcatcccggc tgtgcagtcc cagcccaggg caccaaggca gggcccgtct gactcctcac	840
ccggaggcct ctgcccggcc cactcatgct cagggagagg gtcttctggc tttttccacc	900
aggctccggg caggcacagg ctggatgcc ctaccccagg cccttcacac acaggggcag	960
gtgctgcgt cagagctgcc aagagccata tccaggagga ccctgccct gacogagctc	1020
aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt	1080
gacacacctc ccccgctgcc aaggtgcca gagcccaaat cttgtgacac acctccccg	1140
tgcccaaggt gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccgctgcc aaggtgcca	1200
tgatttcccg gaccctgag gtcacgtgcg tgggtggtga cgtgagccac gaagaccccg	1260
aggtccagtt caagtgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagctgc	1320
gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcacctc ctgcaccagg	1380
actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca	1440
tcgagaaaac catctccaaa gccaaaatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg	1500

tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagcoggaga 1560
 acaactacaa caccacgcct cccatgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca 1620
 agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacat cttctcatgc tccgtgatgc 1680
 atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagcag 1740
 aggccgcagc taaagaggcc gcagccaaag cgggatcctg tgacctgcct cagactcata 1800
 acctcaggaa caagagagcc ttgacactcc tggtaaaaat gaggagactc tcccctctct 1860
 cctgcctgaa ggacaggaag gactttggat tcccgcagga gaaggtggat gccagcaga 1920
 tcaagaagc tcaagccatc cctgtcctga gtgagctgac ccagcagatc ctgaacatct 1980
 tcacatcaaa ggactcatct gctgcttggg atgcaaccct cctagactca ttctgcaatg 2040
 acctccacca gcagctcaat gacctgcaag gttgtctgat gcagcaggtg ggggtgcagg 2100
 aatttcccct gaccaggaag gatgccctgc tggctgtgag gaaatacttc cacaggatca 2160
 ctgtgtacct gagagagaag aaacacagcc cctgtgcctg ggaggtggtc agagcagaag 2220
 tctggagagc cctgtcttcc tctgccaatg tgctgggaag actgagagaa gagaaatga 2279

<210> 8

<211> 759

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

10

<400> 8

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu
 225 230 235 240
 Arg Pro Ala Gln Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Pro
 245 250 255
 Ser Cys Leu Asp Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly His Gln
 260 265 270
 Gly Arg Pro Arg Leu Thr Pro His Pro Glu Ala Ser Ala Arg Pro Thr
 275 280 285
 His Ala Gln Gly Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Thr Arg Leu Arg Ala
 290 295 300
 Gly Thr Gly Trp Met Pro Leu Pro Gln Ala Leu His Thr Gln Gly Gln
 305 310 315 320
 Val Leu Arg Ser Glu Leu Pro Arg Ala Ile Ser Arg Arg Thr Leu Pro
 325 330 335
 Leu Thr Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 340 345 350
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 355 360 365

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 370 375 380
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 385 390 395 400
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 405 410 415
 His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 420 425 430
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 435 440 445
 Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 450 455 460
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 465 470 475 480
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 485 490 495
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 500 505 510
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro
 515 520 525
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 530 535 540
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met
 545 550 555 560
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 565 570 575
 Pro Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly
 580 585 590
 Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu
 595 600 605
 Thr Leu Leu Val Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys
 610 615 620
 Asp Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln

625		630		635		640
Ile Lys Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln						
	645			650		655
Ile Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala						
	660			665		670
Thr Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp						
	675			680		685
Leu Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu						
	690			695		700
Thr Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile						
705		710		715		720
Thr Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val						
	725			730		735
Val Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu						
	740			745		750
Gly Arg Leu Arg Glu Glu Lys						
	755					

<210> 9

<211> 2251

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

10

<400> 9

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaagggtgt ccagagtcag	60
gtacaactgc agcagcctgg ggotgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggcctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatccggaa atggtgatac ttcctaacat	240
cagaagtta aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
tacggcggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcagga ccacggtcac cgtctctgca	420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctggg	480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtc	540
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacottcc cggctgtcct acagtectca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	660

tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag 720
 aggccagcgc agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctacagccctc ctgcctggac 780
 gcatcccggc tgtgcagtcc cagcccaggg caccaaggca ggcccgtct gactcctcac 840
 cgggaggcct ctgcccgcc cactcatgct caggagagg gtcttctggc tttttccacc 900
 aggtccggg caggcacagg ctggatgcc ctaccccagg cccttcacac acaggggcag 960
 gtgctgcgt cagagctgcc aagagccata tccaggagga ccctgccct gaccgagctc 1020
 aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggt gccagagcc caaatcttgt 1080
 gacacacctc ccccgctgcc aaggtgccc gagcccaaat ctgtgacac acctcccccg 1140
 tgcccaaggt gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccgctgcc aaggtgccc 1200
 tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagaccccg 1260
 aggtccagtt caagtgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagctgc 1320
 gggagggaca gtacaacagc acgttcctgt tggtcagcgt cctcacctc ctgcaccagg 1380
 actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtotccaa caaagccctc ccagccccca 1440
 tcgagaaacc atctccaaag ccaaatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt 1500
 caaaggcttc taccocagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa 1560
 caactacaac accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagcaa 1620
 gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacatc ttctcatgct ccgtgatgca 1680
 tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaactctgg 1740
 tggcgtgga tctgtgatc tgctcaaac ccacagcctg ggtagcagga ggaccttgat 1800
 gtcctggca cagatgagga gaatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt 1860
 tggatttccc caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct 1920
 ccatgagatg atccagcaga tcttcaatct ctccagcaca aaggactcat ctgctgcttg 1980
 ggatgagacc ctctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga 2040
 agcctgtgtg atacaggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat 2100
 tctggctgtg aggaataact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacag 2160
 cccttgtgcc tgggaggtg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa 2220
 cttgcaagaa agtttaagaa gtaaggaatg a 2251

<210> 10
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 10

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu
225 230 235 240

Arg Pro Ala Gln Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Pro
245 250 255

Ser Cys Leu Asp Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly His Gln
260 265 270

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

His Ala Gln Gly Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Thr Arg Leu Arg Ala
290 295 300

Gly Thr Gly Trp Met Pro Leu Pro Gln Ala Leu His Thr Gln Gly Gln
305 310 315 320

Val Leu Arg Ser Glu Leu Pro Arg Ala Ile Ser Arg Arg Thr Leu Pro
325 330 335

Leu Thr Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
340 345 350

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
355 360 365

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
370 375 380

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
385 390 395 400

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
405 410 415

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
420 425 430

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
435 440 445

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
450 455 460

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
465 470 475 480

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
485 490 495

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
500 505 510

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro

515	520	525
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 530 535 540		
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met 545 550 555 560		
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 565 570 575		
Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His 580 585 590		
Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg 595 600 605		
Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro 610 615 620		
Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val 625 630 635 640		
Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp 645 650 655		
Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu 660 665 670		
Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val 675 680 685		
Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val 690 695 700		
Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr 705 710 715 720		
Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe 725 730 735		
Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu 740 745 750		

<210> 11
 <211> 2252
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 11

5

```

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaagggtg ccagagtcag      60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct      180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgaa atggtgatac ttctacaat      240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac      360
tacggcgggtg actggtactt caatgtctgg ggcgagggga ccacggtcac cgtctctgca      420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cactctggg      480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg      540
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc      660
tacacctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag      720
agggcagcgc agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctacgccctc ctgcctggac      780
gcatcccggc tgtgcagtcc cagcccaggg caccaaggga ggccccgtct gactcctcac      840
ccggaggcct ctgccgcgcc cactcatgct caggagaggg gtcttctggc tttttccacc      900
aggtccggg caggcacagg ctggatgcc ctaccccagg cccttcacac acaggggcag      960
gtgctgcgct cagagctgcc aagagccata tccaggagga ccctgcccct gaccgagctc     1020
aaaaccccac ttggtgacac aactcacaca tgcccacggg gccagagcc caaatcttgt     1080
gacacacctc ccccgctgcc aaggtgccc gagcccaat cttgtgacac acctcccccg     1140
tgcccaaggg gccagagcc caaatcttgt gacacacctc ccccgctgcc aaggtgccc     1200
tgatttcccg gacccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg     1260
aggtccagtt caagtggtag gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagctgc     1320
gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg     1380
actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc     1440
tcgagaaaac catctccaaa gccaaaatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg     1500
tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga     1560
acaactacaa caccacgcct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca     1620
agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacat cttctcatgc tccgtgatgc     1680
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatctg     1740
gtggcgggtg atcctgtgat ctgcctcaa cccacagcct gggtagcagg aggaccttga     1800
tgctcctggc acagatgagg agaattctct ttttctcctg cttgaaggac agacatgact     1860

```

ttggatttcc ccaggaggag tttggcaacc agttccaaaa ggctgaaacc atccctgtcc 1920
 tccatgagat gatccagcag atcttcaato tcttcagcac aaaggactca tctgtgott 1980
 gggatgagac cctcctagac aaattctaca ctgaactcta ccagcagctg aatgacctgg 2040
 aagcctgtgt gatacagggg gtgggggtga cagagactcc cctgatgaag gaggactcca 2100
 ttctggctgt gaggaataac ttccaaagaa tcactctcta tctgaaagag aagaaataca 2160
 gcccttgtgc ctgggaggtt gtcagagcag aaatcatgag atctttttct ttgtcaacaa 2220
 acttgcaaga aagttaaga agtaaggaat ga 2252

<210> 12
 <211> 757
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 12

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gly Glu
 225 230 235 240

Arg Pro Ala Gln Gly Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Gln Ala Gln Pro
 245 250 255

Ser Cys Leu Asp Ala Ser Arg Leu Cys Ser Pro Ser Pro Gly His Gln
 260 265 270

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

His Ala Gln Gly Glu Gly Leu Leu Ala Phe Ser Thr Arg Leu Arg Ala
 290 295 300

Gly Thr Gly Trp Met Pro Leu Pro Gln Ala Leu His Thr Gln Gly Gln
 305 310 315 320

Val Leu Arg Ser Glu Leu Pro Arg Ala Ile Ser Arg Arg Thr Leu Pro
 325 330 335

Leu Thr Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 340 345 350

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 355 360 365

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 370 375 380

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 385 390 395 400

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 405 410 415

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

420	425	430
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Leu Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 435 440 445		
Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 450 455 460		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 465 470 475 480		
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Lys Asn Gln Val Ser 485 490 495		
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 500 505 510		
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro 515 520 525		
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 530 535 540		
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met 545 550 555 560		
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 565 570 575		
Pro Gly Lys Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala 580 585 590		
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met 595 600 605		
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp 610 615 620		
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln 625 630 635 640		
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe 645 650 655		
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu 660 665 670		
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu 675 680 685		

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
690 695 700

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
705 710 715 720

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
725 730 735

Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
740 745 750

Leu Arg Ser Lys Glu
755

<210> 13
<211> 1779
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 13

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaagggtg ccagagtcag	60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgga atggtgatac ttccataat	240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
tacggcgggtg actggtactt caatgtctgg ggccgaggga ccacggtcac cgtctctgca	420
gctagccaac caaggggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg	480
ggggcacagc ggcctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaacc ggagcccaaa	540
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccaatga tctcccgac ccctgaggtc	600
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	660
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	720
taccgggtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	780
aagtgcaggg totccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaagcc	840
aaagggtgga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gccaccctc	900
tgcctgaga gtgaccgctg taccacctc tgtcctacag ggcagccccg agaaccacag	960
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc	1020

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1080
gagaacaact acaagaccac gctcccgtg ctggactcog acggctcctt cttcctctac 1140
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1200
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1260
tctggtggcg gtggatcctg tgacctgcct cagactcata acctcaggaa caagagagcc 1320
ttgacactcc tggtaaaaat gaggagactc tcccctctct cctgcctgaa ggacaggaag 1380
gactttggat tcccgcagga gaaggtggat gccagcaga tcaagaaggc tcaagccatc 1440
cctgtcctga gtgagctgac ccagcagatc ctgaacatct tcacatcaaa ggactcatct 1500
gctgcttggg atgcaaccct cctagactca ttctgcaatg acctccacca gcagctcaat 1560
gacctgcaag gttgtctgat gcagcaggtg ggggtgcagg aatttcccct gaccagga 1620
gatgcctgc tggtgtgag gaaatacttc cacaggatca ctgtgtacct gagagagaag 1680
aaacacagcc cctgtgcctg ggaggtggtc agagcagaag tctggagagc cctgtcttcc 1740
tctgccaatg tgctgggaag actgagagaa gagaaatga 1779

<210> 14
<211> 592
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión.
<400> 14

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Gln Pro
 130 135 140
 Arg Ala His Arg Ser Ser Pro Trp His Pro Pro Pro Arg Ala Pro Leu
 145 150 155 160
 Gly Ala Gln Arg Pro Trp Ala Ala Trp Ser Arg Thr Thr Ser Pro Asn
 165 170 175
 Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 180 185 190
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 195 200 205
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 210 215 220
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 225 230 235 240
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 260 265 270
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg
 275 280 285
 Gly Pro His Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser
 290 295 300
 Asp Arg Cys Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 305 310 315 320
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 325 330 335
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 340 345 350
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 355 360 365
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

370		375		380
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val				
385		390		395 400
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu				
	405		410	415
Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr				
	420		425	430
His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr Leu Leu Val Gln Met Arg				
	435		440	445
Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp Arg Lys Asp Phe Gly Phe				
	450		455	460
Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile Lys Lys Ala Gln Ala Ile				
465		470		475 480
Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile Leu Asn Ile Phe Thr Ser				
	485		490	495
Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr Leu Leu Asp Ser Phe Cys				
	500		505	510
Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu Gln Gly Cys Leu Met Gln				
	515		520	525
Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ala Leu Leu				
	530		535	540
Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Glu Lys				
545		550		555 560
Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Val Trp Arg				
	565		570	575
Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Glu Lys				
	580		585	590

<210> 15
 <211> 1779
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 15

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaaggtgt ccagagtcag	60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct	180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgga atggtgatac ttctacaat	240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactot gcggtctatt actgtgcaag atcgacttac	360
tacggcgggtg actgggtactt caatgtctgg ggcgagggga ccacggtcac cgtctctgca	420
gctagccaac caagggccca tgggtcttcc cctggcacc ctctccaag agcacctctg	480
ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg ggagcccaaa	540
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccaatga tctccggac ccctgaggtc	600
acatgcgtgg tgggtggact gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	660
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	720
taccgggtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	780
aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc	840
aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gccacacctc	900
tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtctacag ggcagccccg agaaccacag	960
gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1020
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg	1080
gagaacaact acaagaccac gcctcccgctg ctggactccg acggctcctt ctctctctac	1140
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg	1200
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	1260
tctggtggcg gtggatcctg tgacctgcct cagactcata acctcaggaa caagagagcc	1320
ttgacactcc tggtagaaat gaggagactc tcccctctct cctgcctgaa ggacaggaag	1380
gactttggat tcccgcagga gaaggtggat gccagcaga tcaagaaggc tcaagccatc	1440
cctgtcctga gtgagctgac ccagcagatc ctgaacatct tcacatcaaa ggactcatct	1500
gctgcttgga atgcaaccct cctagactca ttctgcaatg acctccacca gcagctcaat	1560
gacctgcaag gttgtctgat gcagcaggtg ggggtgcagg aatttccct gaccaggaa	1620
gatgccctgc tggctgtgag gaaatacttc cacaggatca ctgtgtacct gagagagaag	1680
aaacacagcc cctgtgcctg ggaggtggtc agagcagaag tctggagagc cctgtcttcc	1740
tctgccaatg tgctgggaag actgagagaa gagaaatga	1779

5

<210> 16
 <211> 599
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

5

<400> 16

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 260 265 270
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg
 275 280 285
 Gly Pro His Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser
 290 295 300
 Asp Arg Cys Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 305 310 315 320
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 325 330 335
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 340 345 350
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 355 360 365
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 370 375 380
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 385 390 395 400
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 405 410 415
 Ser Pro Gly Lys Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 420 425 430
 Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu
 435 440 445
 Thr Leu Leu Val Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys
 450 455 460
 Asp Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln
 465 470 475 480
 Ile Lys Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln
 485 490 495
 Ile Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala

500	505	510
Thr Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp 515 520 525		
Leu Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu 530 535 540		
Thr Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile 545 550 555 560		
Thr Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val 565 570 575		
Val Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu 580 585 590		
Gly Arg Leu Arg Glu Glu Lys 595		

<210> 17
 <211> 1776
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 17

atgtacttgg gactgaactg tgtaatcata gtttttctct taaaagggtg ccagagtcag 60
gtacaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggcct ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa acagacacct 180
ggtcggggcc tggaatggat tggagctatt tatcccgaa atggtgatac ttcttacaat 240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atcgacttac 360
tacggcgggtg actggtactt caatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctctgca 420
gctagccaac caagggccca tgggtcttcc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg 480
ggggcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaacg ggagcccaaa 540
tcttgtgaca aaactcacac atgcccacg tgcccaatga tctcccgac cctgaggtc 600
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 660
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 720
taccgggtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 780
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaagcc 840
aaaggtggga cccgtggggt gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gccaccctc 900
tgccctgaga gtgacgctg taccaacctc tgtcctacag ggcagccccg agaaccacag 960
gtgtacaccc tgcgcccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtoag cctgacctgc 1020
ctggtcaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1080
gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg ctggactccg acggctcctt ctctctctac 1140
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1200
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1260
tctggtggcg gtggatcctg tgatctgcct caaacccaca gcctgggtag caggaggacc 1320
ttgatgctcc tggcacagat gaggagaatc tctcttttct cctgcttgaa ggacagacat 1380
gactttggat ttccccagga ggagtttggc aaccagttcc aaaaggctga aaccatccct 1440
gtctccatg agatgatcca gcagatcttc aatctcttca gcacaaagga ctcatctgct 1500
gcttgggatg agaccctct agacaaatc tacactgaac tctaccagca gctgaatgac 1560
ctggaagcct gtgtgataca ggggtgggg gtgacagaga ctccctgat gaaggaggac 1620
tccattctgg ctgtgaggaa atacttccaa agaatcactc tctatctgaa agagaagaaa 1680
tacagccctt gtgcctggga ggttgtcaga gcagaaatca tgagatcttt ttctttgtca 1740
acaaacttgc aagaaagttt aagaagtaag gaatga 1776

<210> 18
<211> 591
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión.

<400> 18

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

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
 115 120 125
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Gln Pro
 130 135 140
 Arg Ala His Arg Ser Ser Pro Trp His Pro Pro Pro Arg Ala Pro Leu
 145 150 155 160
 Gly Ala Gln Arg Pro Trp Ala Ala Trp Ser Arg Thr Thr Ser Pro Asn
 165 170 175
 Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 180 185 190
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 195 200 205
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 210 215 220
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 225 230 235 240
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 260 265 270
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg
 275 280 285
 Gly Pro His Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser
 290 295 300
 Asp Arg Cys Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 305 310 315 320
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 325 330 335
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 340 345 350

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 355 360 365
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 370 375 380
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 385 390 395 400
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 405 410 415
 Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr
 420 425 430
 His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg
 435 440 445
 Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe
 450 455 460
 Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro
 465 470 475 480
 Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 485 490 495
 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr
 500 505 510
 Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly
 515 520 525
 Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala
 530 535 540
 Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys
 545 550 555 560
 Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser
 565 570 575
 Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
 580 585 590

<210> 19
 <211> 1800
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

5

<400> 19

Ala Thr Gly Thr Ala Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Cys Ala Thr Ala Gly Thr
 20 25 30
 Thr Thr Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Gly Gly Thr
 35 40 45
 Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Gly Gly Thr Ala Cys
 50 55 60
 Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly
 85 90 95
 Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala
 100 105 110
 Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
 115 120 125
 Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Ala Thr Thr Thr
 130 135 140
 Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Ala Thr Gly Cys
 145 150 155 160
 Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Cys
 165 170 175
 Ala Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly
 180 185 190
 Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Ala
 195 200 205
 Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Gly
 210 215 220
 Thr Gly Ala Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Ala
 245 250 255
 Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys
 260 265 270
 Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys
 275 280 285
 Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys
 290 295 300
 Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys
 305 310 315 320
 Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys
 325 330 335
 Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr
 340 345 350
 Cys Gly Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Gly Gly
 355 360 365
 Thr Gly Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr
 370 375 380
 Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Gly Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 385 390 395 400
 Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys
 405 410 415
 Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala
 420 425 430
 Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Thr Cys Thr Thr
 435 440 445
 Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Cys
 450 455 460
 Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr
 485 490 495
 Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly

500					505					510					
Gly	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Ala	Ala	Cys
	515						520					525			
Cys	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys	Thr	Thr
	530					535					540				
Gly	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys
	545					550					555				560
Ala	Thr	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Gly	Cys	Cys	Cys	Ala
				565					570						575
Ala	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	Gly	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys
			580						585				590		
Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Thr	Gly	Cys	Gly	Thr
		595					600					605			
Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Cys
	610						615					620			
Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Gly
	625					630					635				640
Thr	Cys	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala
				645					650						655
Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Cys	Gly	Gly	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly
			660					665						670	
Gly	Thr	Gly	Cys	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Cys	Cys	Ala	Ala	Gly	Ala
		675					680					685			
Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala
	690					695					700				
Gly	Cys	Ala	Gly	Thr	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	Gly
	705					710					715				720
Thr	Ala	Cys	Cys	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly
				725					730					735	
Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Ala	Cys	Cys	Gly	Thr	Cys	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala
			740					745					750		
Cys	Cys	Ala	Gly	Gly	Ala	Cys	Thr	Gly	Gly	Cys	Thr	Gly	Ala	Ala	Thr
		755					760					765			

Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr
770 775 780

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Ala Ala
785 790 795 800

Ala Gly Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys
805 810 815

Ala Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr
820 825 830

Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly
835 840 845

Gly Ala Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly Gly Gly Thr Gly Cys Gly Ala
850 855 860

Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Gly Ala
865 870 875 880

Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys
885 890 895

Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr
900 905 910

Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Ala Cys Cys
915 920 925

Thr Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala
930 935 940

Gly Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Ala Gly
945 950 955 960

Gly Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys
965 970 975

Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr
980 985 990

Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys
995 1000 1005

Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly
1010 1015 1020

Gly Thr 1025	Cys Ala Ala Ala	Gly 1030	Gly Cys Thr Thr	Cys Thr Ala Thr 1035
Cys Cys 1040	Cys Ala Gly Cys	Gly 1045	Ala Cys Ala Thr	Cys Gly Cys Cys 1050
Gly Thr 1055	Gly Gly Ala Gly	Thr 1060	Gly Gly Gly Ala	Gly Ala Gly Cys 1065
Ala Ala 1070	Thr Gly Gly Gly	Cys 1075	Ala Gly Cys Cys	Gly Gly Ala Gly 1080
Ala Ala 1085	Cys Ala Ala Cys	Thr 1090	Ala Cys Ala Ala	Gly Ala Cys Cys 1095
Ala Cys 1100	Gly Cys Cys Thr	Cys 1105	Cys Cys Gly Thr	Gly Cys Thr Gly 1110
Gly Ala 1115	Cys Thr Cys Cys	Gly 1120	Ala Cys Gly Gly	Cys Thr Cys Cys 1125
Thr Thr 1130	Cys Thr Thr Cys	Cys 1135	Thr Cys Thr Ala	Cys Ala Gly Cys 1140
Ala Ala 1145	Gly Cys Thr Cys	Ala 1150	Cys Cys Gly Thr	Gly Gly Ala Cys 1155
Ala Ala 1160	Gly Ala Gly Cys	Ala 1165	Gly Gly Thr Gly	Gly Cys Ala Gly 1170
Cys Ala 1175	Gly Gly Gly Gly	Ala 1180	Ala Cys Gly Thr	Cys Thr Thr Cys 1185
Thr Cys 1190	Ala Thr Gly Cys	Thr 1195	Cys Cys Gly Thr	Gly Ala Thr Gly 1200
Cys Ala 1205	Thr Gly Ala Gly	Gly 1210	Cys Thr Cys Thr	Gly Cys Ala Cys 1215
Ala Ala 1220	Cys Cys Ala Cys	Thr 1225	Ala Cys Ala Cys	Gly Cys Ala Gly 1230
Ala Ala 1235	Gly Ala Gly Cys	Cys 1240	Thr Cys Thr Cys	Cys Cys Thr Gly 1245
Thr Cys 1250	Thr Cys Cys Gly	Gly 1255	Gly Thr Ala Ala	Ala Gly Cys Ala 1260

Gly Ala 1265	Gly Gly Cys Cys Gly 1270	Cys Ala Gly Cys Thr 1275	Ala Ala Ala
Gly Ala 1280	Gly Gly Cys Cys Gly 1285	Cys Ala Gly Cys Cys 1290	Ala Ala Ala
Gly Cys 1295	Gly Gly Gly Ala Thr 1300	Cys Cys Thr Gly Thr 1305	Gly Ala Thr
Cys Thr 1310	Gly Cys Cys Thr Cys 1315	Ala Ala Ala Cys Cys 1320	Cys Ala Cys
Ala Gly 1325	Cys Cys Thr Gly Gly 1330	Gly Thr Ala Gly Cys 1335	Ala Gly Gly
Ala Gly 1340	Gly Ala Cys Cys Thr 1345	Thr Gly Ala Thr Gly 1350	Cys Thr Cys
Cys Thr 1355	Gly Gly Cys Ala Cys 1360	Ala Gly Ala Thr Gly 1365	Ala Gly Gly
Ala Gly 1370	Ala Ala Thr Cys Thr 1375	Cys Thr Cys Thr Thr 1380	Thr Thr Cys
Thr Cys 1385	Cys Thr Gly Cys Thr 1390	Thr Gly Ala Ala Gly 1395	Gly Ala Cys
Ala Gly 1400	Ala Cys Ala Thr Gly 1405	Ala Cys Thr Thr Thr 1410	Gly Gly Ala
Thr Thr 1415	Thr Cys Cys Cys Cys 1420	Ala Gly Gly Ala Gly 1425	Gly Ala Gly
Thr Thr 1430	Thr Gly Gly Cys Ala 1435	Ala Cys Cys Ala Gly 1440	Thr Thr Cys
Cys Ala 1445	Ala Ala Ala Gly Gly 1450	Cys Thr Gly Ala Ala 1455	Ala Cys Cys
Ala Thr 1460	Cys Cys Cys Thr Gly 1465	Thr Cys Cys Thr Cys 1470	Cys Ala Thr
Gly Ala 1475	Gly Ala Thr Gly Ala 1480	Thr Cys Cys Ala Gly 1485	Cys Ala Gly
Ala Thr 1490	Cys Thr Thr Cys Ala 1495	Ala Thr Cys Thr Cys 1500	Thr Thr Cys
Ala Gly	Cys Ala Cys Ala Ala	Ala Gly Gly Ala Cys	Thr Cys Ala

1505		1510		1515
Thr Cys 1520	Thr Gly Cys Thr	Gly Cys Thr Thr	Gly Gly	Gly Ala Thr 1530
Gly Ala 1535	Gly Ala Cys Cys	Cys Thr Cys Cys Thr	Ala	Gly Ala Cys 1545
Ala Ala 1550	Ala Thr Thr Cys	Thr Ala Cys Ala Cys	Thr	Gly Ala Ala 1560
Cys Thr 1565	Cys Thr Ala Cys	Cys Ala Gly Cys Ala	Gly	Cys Thr Gly 1575
Ala Ala 1580	Thr Gly Ala Cys	Cys Thr Gly Gly Ala	Ala	Gly Cys Cys 1590
Thr Gly 1595	Thr Gly Thr Gly	Ala Thr Ala Cys Ala	Gly	Gly Gly Gly 1605
Gly Thr 1610	Gly Gly Gly Gly	Gly Thr Gly Ala Cys	Ala	Gly Ala Gly 1620
Ala Cys 1625	Thr Cys Cys Cys	Cys Thr Gly Ala Thr	Gly	Ala Ala Gly 1635
Gly Ala 1640	Gly Gly Ala Cys	Thr Cys Cys Ala Thr	Thr	Cys Thr Gly 1650
Gly Cys 1655	Thr Gly Thr Gly	Ala Gly Gly Ala Ala	Ala	Thr Ala Cys 1665
Thr Thr 1670	Cys Cys Ala Ala	Ala Gly Ala Ala Thr	Cys	Ala Cys Thr 1680
Cys Thr 1685	Cys Thr Ala Thr	Cys Thr Gly Ala Ala	Ala	Gly Ala Gly 1695
Ala Ala 1700	Gly Ala Ala Ala	Thr Ala Cys Ala Gly	Cys	Cys Cys Thr 1710
Thr Gly 1715	Thr Gly Cys Cys	Thr Gly Gly Gly Ala	Gly	Gly Thr Thr 1725
Gly Thr 1730	Cys Ala Gly Ala	Gly Cys Ala Gly Ala	Ala	Ala Thr Cys 1740
Ala Thr 1745	Gly Ala Gly Ala	Thr Cys Thr Thr Thr	Thr	Thr Cys Thr 1755

Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly
1760 1765 1770

Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Gly Ala
1775 1780 1785

Ala Gly Thr Ala Ala Gly Gly Ala Ala Thr Gly Ala
1790 1795 1800

<210> 20

<211> 599

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión.

10

<400> 20

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

165	170	175
Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
180	185	190
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
195	200	205
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
210	215	220
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
225	230	235 240
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
245	250	255
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
260	265	270
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg		
275	280	285
Gly Pro His Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser		
290	295	300
Asp Arg Cys Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
305	310	315 320
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
325	330	335
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
340	345	350
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
355	360	365
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
370	375	380
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
385	390	395 400
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
405	410	415
Ser Pro Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala		
420	425	430

Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
435 440 445

Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu
450 455 460

Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln
465 470 475 480

Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
485 490 495

Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
500 505 510

Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
515 520 525

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu
530 535 540

Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
545 550 555 560

Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
565 570 575

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
580 585 590

Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu
595

<210> 21
<211> 393
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 21

atgggatgga gctgggtaat cctctttctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactccag	60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcaagtgtct ggggccccag gacagaaggt caccatctcc	120
tgctctggaa gcagctccaa cattgggaat aattatgtat cctgggtacca gcagctccca	180
ggaacagccc ccaaactcct catctatgat cacaccaatc ggcccgcagg ggtccctgac	240
cgattctctg gctccaagtc tggcaectca gcctccctgg ccatcagtggt gttccgggtcc	300

gaggatgagg ctgattatta ctgtgcctcc tgggactaca cctctcggg ctgggtgttc 360

ggaggagga ccaaggtcac cgtcctaggt gag 393

<210> 22
<211> 131
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Proteína de fusión.

<400> 22

Met Gly Trp Ser Trp Val Ile Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
20 25 30

Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
35 40 45

Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp His Thr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser
85 90 95

Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp
100 105 110

Tyr Thr Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val
115 120 125

Leu Gly Glu
130

<210> 23
<211> 1676
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 23

```

atgggatgga gctgggtaat gcatctttct cctgtcagta actgcagatg cccgggaaag      60
gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac agcccgtcct      120
tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac ttgcaatgga      180
gcagtctgaa gccctcggac agcgcctgtg atttttgtgc gagacatgac gtgggatatt      240
gcaccgaccg gacttgcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc cagggcaccg      300
tggtcacogt ctctcagct agccaacca gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc      360
ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc      420
cgaaccggga gcccaaactc tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccaatgatct      480
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca      540
agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg      600
agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc      660
tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga      720
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtggggtgcg agggccacat ggacagaggg      780
cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacagggc      840
agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc      900
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg      960
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg      1020
gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg      1080
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct      1140
ccctgtctcc gggtaaactc ggtggcggtg gatcctgtga cctgcctcag actcataacc      1200
tcaggaacaa gagagccttg acactcctgg tacaatatgag gagactctcc cctctctcct      1260
gcctgaagga caggaaggac tttggattcc cgcaggagaa ggtggatgcc cagcagatca      1320
agaaggctca agccatccct gtcttgagtg agctgaccca gcagatcctg aacatcttca      1380
catcaaagga ctcatctgct gcttggaatg caaccctcct agactcattc tgcaatgacc      1440
tccaccagca gctcaatgac ctgcaaggtt gtctgatgca gcaggtgggg gtgcaggaat      1500
ttcccctgac ccaggaagat gccctgctgg ctgtgaggaa atacttcac aggatcactg      1560
tgtacctgag agagaagaaa cacagcccct gtgcctggga ggtggtcaga gcagaagtct      1620
ggagagccct gtcttctctt gccaatgtgc tgggaagact gagagaagag aatga      1676

```

5 <210> 24
 <211> 557
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 24

Met	Gly	Trp	Ser	Trp	Val	Met	His	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Asn	Cys	Met
1				5					10					15	

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser
20 25 30

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

Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro
50 55 60

Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys
65 70 75 80

Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gln Pro Arg Ala His
100 105 110

Arg Ser Ser Pro Trp His Pro Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gly Ala Gln
115 120 125

Arg Pro Trp Ala Ala Trp Ser Arg Thr Thr Ser Pro Asn Arg Glu Pro
130 135 140

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Met Ile Ser
145 150 155 160

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
165 170 175

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
180 185 190

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
195 200 205

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
210 215 220

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
225 230 235 240

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg Gly Pro His
245 250 255

Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser Asp Arg Cys
260 265 270

Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 275 280 285

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 290 295 300

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 305 310 315 320

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 325 330 335

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 340 345 350

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 355 360 365

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 370 375 380

Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Asn Leu
 385 390 395 400

Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr Leu Leu Val Gln Met Arg Arg Leu Ser
 405 410 415

Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp Arg Lys Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 420 425 430

Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile Lys Lys Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu
 435 440 445

Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile Leu Asn Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser
 450 455 460

Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr Leu Leu Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu
 465 470 475 480

His Gln Gln Leu Asn Asp Leu Gln Gly Cys Leu Met Gln Gln Val Gly
 485 490 495

Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr Gln Glu Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg
 500 505 510

Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr Leu Arg Glu Lys Lys His Ser
 515 520 525

Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser

530

535

540

Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly Arg Leu Arg Glu Glu Lys
545 550 555

<210> 25

<211> 1700

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

<400> 25

```

atgggatgga gctgggtaat gcacctttct cctgtcagta actgcagatg cccgggaaag      60
gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac agcccgctcct      120
tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac ttgcaatgga      180
gcagtctgaa gccctcggac agcgcctgtg atttttgtgc gagacatgac gtgggatatt      240
gcaccgaccg gacttgcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc caggggcacc      300
tggtcacctg ctctcagct agccaaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc      360
ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc      420
cgaaccggga gcccaaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccacogtgc ccaatgatct      480
cccggaaccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca      540
agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg      600
agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc      660
tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga      720
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggggtgc agggccacat ggacagaggc      780
cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacagggc      840
agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg accaagaacc      900
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag cgacatcgcc gtggagtggg      960
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg      1020
gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag caggggaaacg      1080
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct      1140
ccctgtctcc gggtaaagca gaggccgcag ctaaagaggc cgcagccaaa gcgggatcct      1200
gtgacctgcc tcagactcat aacctcagga acaagagagc cttgacactc ctggtacaaa      1260
tgaggagact ctccctctc tctgctga aggacaggaa ggactttgga ttcccgcagg      1320
agaagggtga tgcccagcag atcaagaagg ctcaagccat cctgtcctg agtgagctga      1380
cccagcagat cctgaacatc ttacatcaa aggactcatc tgctgcttgg aatgcaaccc      1440
tcctagactc attctgcaat gacctccacc agcagctcaa tgacctgcaa ggttgtctga      1500

tgcagcaggt ggggggtgcag gaatttccc tgaccagga agatgccctg ctggctgtga      1560
ggaaatactt ccacaggatc actgtgtacc tgagagagaa gaaacacagc cctgtgcct      1620
gggaggtggt cagagcagaa gtctggagag ccctgtcttc ctctgccaat gtgctgggaa      1680
gactgagaga agagaaatga

```

5 <210> 26
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 26

Met Gly Trp Ser Trp Val Met His Leu Ser Pro Val Ser Asn Cys Met
1 5 10 15

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser
20 25 30

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

Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro
50 55 60

Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys
65 70 75 80

Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly
85 90 95

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Gln Pro Arg Ala His
100 105 110

Arg Ser Ser Pro Trp His Pro Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gly Ala Gln
115 120 125

Arg Pro Trp Ala Ala Trp Ser Arg Thr Thr Ser Pro Asn Arg Glu Pro
130 135 140

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Met Ile Ser
145 150 155 160

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
165 170 175

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

180	185	190
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val 195 200 205		
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu 210 215 220		
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys 225 230 235 240		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg Gly Pro His 245 250 255		
Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser Asp Arg Cys 260 265 270		
Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr 275 280 285		
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 290 295 300		
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu 305 310 315 320		
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu 325 330 335		
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys 340 345 350		
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 355 360 365		
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 370 375 380		
Lys Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Cys Asp 385 390 395 400		
Leu Pro Gln Thr His Asn Leu Arg Asn Lys Arg Ala Leu Thr Leu Leu 405 410 415		
Val Gln Met Arg Arg Leu Ser Pro Leu Ser Cys Leu Lys Asp Arg Lys 420 425 430		
Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Lys Val Asp Ala Gln Gln Ile Lys Lys 435 440 445		

Ala Gln Ala Ile Pro Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Gln Ile Leu Asn
450 455 460

Ile Phe Thr Ser Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asn Ala Thr Leu Leu
465 470 475 480

Asp Ser Phe Cys Asn Asp Leu His Gln Gln Leu Asn Asp Leu Gln Gly
485 490 495

Cys Leu Met Gln Gln Val Gly Val Gln Glu Phe Pro Leu Thr Gln Glu
500 505 510

Asp Ala Leu Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Ile Thr Val Tyr
515 520 525

Leu Arg Glu Lys Lys His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala
530 535 540

Glu Val Trp Arg Ala Leu Ser Ser Ser Ala Asn Val Leu Gly Arg Leu
545 550 555 560

Arg Glu Glu Lys

<210> 27

<211> 1673

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

10

<400> 27

```

atgggatgga gctgggtaat gcatctttct cctgtcagta actgcagatg cccgggaaag      60
gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac agcccgctcct      120
tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac ttgcaatgga      180
gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac gtgggatatt      240
gcaccgaccg gacttgcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc cagggcaccc      300
tggtcacctg ctctcagct agccaaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc      360
ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc      420
cgaaccggga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccaatgatct      480
cccggacccc tgaggtcaca tgogtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca      540
agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg      600
agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc      660

```

tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 720
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggggtgog agggccacat ggacagaggc 780
eggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacagggc 840
agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc 900
aggtcagcct gacotgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg 960
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg 1020
gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1080
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct 1140
ccctgtctcc gggtaaactc ggtggcggtg gatcctgtga tctgcctcaa acccacagcc 1200
tgggtagcag gaggaccttg atgctcctgg cacagatgag gagaatctct cttttctcct 1260
gcttgaagga cagacatgac tttggatttc ccaggagga gtttggcaac cagttccaaa 1320
aggctgaaac catcctgtc ctccatgaga tgatccagca gatcttcaat ctcttcagca 1380
caaaggactc atctgctgct tgggatgaga cctcctaga caaattctac actgaactct 1440
accagcagct gaatgacctg gaagcctgtg tgatacaggg ggtgggggtg acagagactc 1500
ccctgatgaa ggaggactcc attctggctg tgaggaaata cttccaaga atcaactctct 1560
atctgaaaga gaagaaatac agcccttgtg cctgggaggt tgtcagagca gaaatcatga 1620
gatctttttc ttgtcaaca aacttgcaag aaagtttaag aagtaaggaa tga 1673

<210> 28
<211> 591
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Proteína de fusión.

<400> 28

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

Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	85	90	95
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	100	105	110
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	115	120	125
Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Gln	Pro	130	135	140
Arg	Ala	His	Arg	Ser	Ser	Pro	Trp	His	Pro	Pro	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu	145	150	155
Gly	Ala	Gln	Arg	Pro	Trp	Ala	Ala	Trp	Ser	Arg	Thr	Thr	Ser	Pro	Asn	165	170	175
Arg	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	180	185	190
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	195	200	205
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	210	215	220
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	225	230	235
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	245	250	255
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	260	265	270
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Gly	Val	Arg	275	280	285
Gly	Pro	His	Gly	Gln	Arg	Pro	Ala	Arg	Pro	Thr	Leu	Cys	Pro	Glu	Ser	290	295	300
Asp	Arg	Cys	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro	Thr	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	305	310	315
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	325	330	335
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val			

340	345	350
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 355 360 365		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 370 375 380		
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 385 390 395 400		
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 405 410 415		
Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Asp Leu Pro Gln Thr 420 425 430		
His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg 435 440 445		
Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe 450 455 460		
Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro 465 470 475 480		
Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys 485 490 495		
Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr 500 505 510		
Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly 515 520 525		
Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala 530 535 540		
Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys 545 550 555 560		
Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser 565 570 575		
Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu 580 585 590		

<210> 29
<211> 1697
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Ácido nucleico que codifica una proteína de fusión.

10

<400> 29

```

atgggatgga gctgggtaat gcatctttct cctgtcagta actgcagatg cccgggaaaag      60
gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac agcccgtcct      120
tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac ttgcaatgga      180
gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac gtgggatatt      240
gcaccgaccg gacttgcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc cagggcaccg      300
tggtcaccgt ctctcagct agccaaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc      360
ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggotgc ctggtcaagg actacttccc      420
cgaaccggga gcccgaatct tgtgacaaa atcacacatg cccacogtgc ccaatgatct      480
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca      540
agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg      600
agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc      660
tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga      720
aaacctctc caaagccaaa ggtgggaccc gtgggggtgc agggcccat ggacagaggc      780
cggctcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt cctacagggc      840
agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggatgagctg accaagaacc      900
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct totatcccag cgacatcgcc gtggagtggg      960
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgtg gactccgacg      1020
gtcctcttct cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg      1080
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct      1140
ccctgtctcc gggtaaagca gaggccgcag ctaaagaggc cgcagccaaa gcgggatcct      1200
gtgatctgcc tcaaaccac agcctgggta gcaggaggac cttgatgctc ctggcacaga      1260
tgaggagaat ctctcttttc tctgcttga aggacagaca tgactttgga tttccccagg      1320
aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgtcctccat gagatgatcc      1380
agcagatctt caatctcttc agcacaaagg actcatctgc tgcttgggat gagaccctcc      1440
tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtgtgatac      1500
aggggggtgg ggtgacagag actccctga tgaaggagga ctccattctg gctgtgagga      1560
aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtgcctggg      1620
aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg caagaaagtt      1680
taagaagtaa ggaatga                                     1697

```

<210> 30
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión.

<400> 30

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Cys Val Ile Ile Val Phe Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Gln Pro
130 135 140

Arg Ala His Arg Ser Ser Pro Trp His Pro Pro Pro Arg Ala Pro Leu
145 150 155 160

Gly Ala Gln Arg Pro Trp Ala Ala Trp Ser Arg Thr Thr Ser Pro Asn
165 170 175

Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Thr Arg Gly Val Arg
275 280 285

Gly Pro His Gly Gln Arg Pro Ala Arg Pro Thr Leu Cys Pro Glu Ser
290 295 300

Asp Arg Cys Thr Asn Leu Cys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
305 310 315 320

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
325 330 335

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
340 345 350

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
355 360 365

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
370 375 380

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
385 390 395 400

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
405 410 415

Ser Pro Gly Lys Ser Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
420 425 430

Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu
435 440 445

Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys
450 455 460

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe
465 470 475 480

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
485 490 495

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
500 505 510

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
515 520 525

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
530 535 540

Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr
545 550 555 560

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
565 570 575

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
580 585 590

Ser Leu Arg Ser Lys Glu
595

<210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico.

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico.

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico.

 <400> 33
 5 **Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Ala**
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 15
 <400> 34

 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
 1 5

 20 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Enlazador peptídico.

 <400> 35

 Gly Gly Gly Gly Gly
 30 **1 5**

 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico.

 40 <400> 36

 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 50
 <400> 37

 Gly Gly Ala Gly Gly
 1 5
 55
 <210> 38

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

5 <220>
 <223> Enlazador peptídico.

<400> 38

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
 1 5 10

<210> 39
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico.

20 <400> 39

Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Pro Pro Phe Pro Phe Gly Phe Pro Ser Val
 1 5 10 15

Arg Pro

<210> 40
 25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Enlazador peptídico.

<400> 40

Tyr Pro Arg Ser Ile Tyr Ile Arg Arg Arg His Pro Ser Pro Ser Leu
 1 5 10 15

Thr Thr

35 <210> 41
 <211> 18
 <212> PRT
 40 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico.

<400> 41

45 **Thr Pro Ser His Leu Ser His Ile Leu Pro Ser Phe Gly Leu Pro Thr**
 1 5 10 15

Phe Asn

<210> 42
 50 <211> 18

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> Enlazador peptídico.

<400> 42

Arg Pro Val Ser Pro Phe Thr Phe Pro Arg Leu Ser Asn Ser Trp Leu
1 5 10 15

Pro Ala

10

<210> 43
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Enlazador peptídico.

<400> 43

20

Ser Pro Ala Ala His Phe Pro Arg Ser Ile Pro Arg Pro Gly Pro Ile
1 5 10 15

Arg Thr

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> Enlazador peptídico.

30

<400> 44

Ala Pro Gly Pro Ser Ala Pro Ser His Arg Ser Leu Pro Ser Arg Ala
1 5 10 15

Phe Gly

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

35

<220>
<223> Enlazador peptídico.

40

<400> 45

Pro Arg Asn Ser Ile His Phe Leu His Pro Leu Leu Val Ala Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ala

45

5 <210> 46
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 <400> 46
 10 **Met Pro Ser Leu Ser Gly Val Leu Gln Val Arg Tyr Leu Ser Pro Pro**
 1 5 10 15
Asp Leu
 15 <210> 47
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 20 <400> 47
Ser Pro Gln Tyr Pro Ser Pro Leu Thr Leu Thr Leu Pro Pro His Pro
 1 5 10 15
Ser Leu
 25 <210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 <400> 48
Asn Pro Ser Leu Asn Pro Pro Ser Tyr Leu His Arg Ala Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 35 **Ile Ser**
 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 45 <400> 49
Leu Pro Trp Arg Thr Ser Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Arg Arg Arg
 1 5 10 15
Pro

5 <210> 50
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 <400> 50
 10 **Pro Pro Leu Phe Ala Lys Gly Pro Val Gly Leu Leu Ser Arg Ser Phe**
 1 5 10 15
Pro Pro
 15 <210> 51
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 20 <400> 51
Val Pro Pro Ala Pro Val Val Ser Leu Arg Ser Ala His Ala Arg Pro
 1 5 10 15
Pro Tyr
 25 <210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 <400> 52
Leu Arg Pro Thr Pro Pro Arg Val Arg Ser Tyr Thr Cys Cys Pro Thr
 35 1 5 10 15
Pro
 40 <210> 53
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Enlazador peptídico.
 45 <400> 53

Pro Asn Val Ala His Val Leu Pro Leu Leu Thr Val Pro Trp Asp Asn
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 54
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico.

<400> 54

Cys Asn Pro Leu Leu Pro Leu Cys Ala Arg Ser Pro Ala Val Arg Thr
1 5 10 15

Phe Pro

<210> 55
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 55
 cgcggatcct gtagcctgcc tcagactc 28

<210> 56
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR.

<400> 56
 gctctagatc attctcttc tctcagcttc c 31

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico.

<400> 57

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Enlazador peptídico

 <400> 58
 5 **Ser Gly Gly Gly Gly Ser**
 1 5

 <210> 59
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 15 <400> 59

 Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Gly Ser
 1 5 10

 20

REIVINDICACIONES

1. Una construcción quimérica que comprende un interferón unido a un anticuerpo que es una inmunoglobulina intacta que se une específicamente a CD20, en la que el anticuerpo se une al interferón mediante un engarce peptídico resistente a la proteólisis que tiene la secuencia de aminoácidos SGGGGS (SEC ID N° 58), y en la que la construcción, cuando se pone en contacto con una célula tumoral produce la muerte o la inhibición del crecimiento o de la proliferación de la célula tumoral.
2. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho interferón es un interferón α .
3. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho interferón es un interferón β .
4. La construcción de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho interferón es un interferón de tipo 1 o un interferón de tipo 2.
5. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en la que dicho anticuerpo comprende las regiones variables de rituximab.
6. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho anticuerpo es una IgG.
7. La construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho anticuerpo es rituximab.
8. Una formulación farmacéutica que comprende una construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha formulación está formulada para la administración a través de una vía seleccionada del grupo que consiste en administración parenteral, administración oral, administración intravenosa, administración intramuscular, administración directa al tumor, inhalación, administración rectal, administración vaginal, administración transdérmica y administración de depósito subcutáneo.
10. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una formulación de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Cadena pesada de IgG3 anti-HER2/neu-IFN- α

M G W S W V M H L S P V S N C G V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G E
 S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I A W V R Q M P G K G L E Y M G L I Y
 P G D S D T K Y S P S F Q G O V T I S V D K S V S T A Y L Q W S S L K P
 S D S A V Y F C A R H D V G Y C T D R T C A K W P E Y F Q H W G Q G T
 L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K
 D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S
 S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T
 P L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P
 P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G G P S V F L F P
 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F K W Y V D
 G V E V H N A K T K L R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H Q D W L N G
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P
 P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E
 N N Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S
 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K S G G G G S G G G G S G
G G G S C D L P Q T H N L R N K R A L T L L V Q M R R L S P L S C L K D
R K D F G F P Q E K V D A Q Q I K K A Q A I P V L S E L T Q Q I L N I F T
S K D S S A A W N A T L L D S F C N D L H Q Q L N D L Q G C L M Q Q V
G V Q E F P L T Q E D A L L A V R K Y F N R I T V Y L R E K K H S P C A
W E V V R A E V W R A L S S S A N V L G R L R E E K

Secuencia de cadena ligera de IgG3 anti-HER2/neu-IFN- α

M E W S C V M L F L L S V T A G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
 R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F
 L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L O P E D F A T Y Y C Q
 Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K
 S G T A S V V G L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
 H Q G L S S P V T K S F N R G E C

Fig. 1A

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de α CD20

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCIGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTCAAA
TTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGAC
TTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCC
CCCAAACCCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGC
CACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTG
GAAATCAAACGTAAGTCGACTTTCTCATCTTTTTTTATGTGTAAGACACAGGTTTTTCATGT
TAGGAGTTAAAGTCAGTTCAGAAAATCTTGAGAAAATGGAGAGGGGCTCATTATCAGTTGAC
GTGGCATAACAGTGTGAGATTTTCTGTTTATCAAGCTAGTGAGATTAGGGGCCAAAAGAGGC
TTTAGTTGA

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de α CD20

MKLPVRLLVLMFWIPASSSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSS
PKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKL
EIKRKSTFSSFFMCKTQVFMLGVKVSSENLEKMERAHYQLTWHTVSDFLFIKLVRLGAKRG
FS

Fig. 1B

Secuencia de ácido nucleico del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG3-mulFNα

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGG
 TACAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGT
 CGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGA
 AGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCT
 CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGC
 GGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCA
 CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAATCA
 GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACT
 CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCGCAG
 GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGTGT
 GCAGTCCCAGCCCAGGGCACCAAGGCAGGCCCGTCTGACTCCTCACCCGGAGGCCTCTGC
 CCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGGC
 ACAGGCTGGATGCCCCCTACCCAGGCCCTTACACACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGAGC
 TGCCAAGAGCCATATCCAGGAGGACCCTGCCCCTGACCGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGA
 CACAACTCACACATGCCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGC
 CCAAGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCAGAGC
 CCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCCATGATTTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGCCAA
 AATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAACACCACGCCTCCCATGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTGGATCCTGTGACCTGCCTCAGA
 CTCATAACCTCAGGAACAAGAGAGCCTTGACACTCCTGGTACAAATGAGGAGACTCTCCCC
 TCTCTCCTGCCTGAAGGACAGGAAGGACTTTGGATTCCCGCAGGAGAAGGTGGATGCCAG
 CAGATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTCCTGAGTGAGCTGACCCAGCAGATCCTGAACA
 TCTTCACATCAAAGGACTCATCTGCTGCTTGAATGCAACCCTCCTAGACTCATCTGCAA
 TGACCTCCACCAGCAGCTCAATGACCTGCAAGGTTGTCTGATGCAGCAGGTGGGGGTGCAG
 GAATTTCCCTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGGATCA
 CTGTGTACCTGAGAGAGAAGAAACACAGCCCCTGTGCCTGGGAGGTGGTCAGAGCAGAAGT
 CTGGAGAGCCCTGTCTTCTCTGCCAATGTGCTGGGAAGACTGAGAGAAGAGAAATGA

Fig. 1C

Secuencia de aminoácidos del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG3-mulFNα

MYLGLNCVIIIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
 RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVGERPAQ
 GGRVSAGSQAQPSCLDASRLCSPSPGHQGRPRLTPHPEASARPTHAQGEGLLAFSTRLRAG
 TGWMPLPQALHTQGQVLRSELPRAISRRTLPTELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPC
 PRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY
 VDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSCDLPQTHNLRNKRALTLLVQMRRLS
 PLSCLKDRKDFGFPQEKVDAQQIKKAQAIPVLSELTQQILNIFTSKDSSAAWNATLLDSFC
 ND LHQQ LND LQGCLMQQVGVEFFLTQEDALLAVRKYFHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAE
 VWRALSSSANVLGRLREEK

Fig. 1C, continuación

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG3-mulFN α

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGG
 TACAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGT
 CGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCCTACAATCAGA
 AGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCT
 CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGC
 GGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCA
 CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA
 GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
 CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCGCAG
 GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTGT
 GCAGTCCCAGCCCAGGGCACCAAGGCAGGCCCCGTCTGACTCCTCACCCGGAGGCCTCTGC
 CCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGGC
 ACAGGCTGGATGCCCTACCCCAGGCCCTTACACACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGAGC
 TGCCAAGAGCCATATCCAGGAGGACCCTGCCCTGACCGAGCTCAAACCCCCACTTGGTGA
 CAACTCACACATGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGC
 CCAAGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCAGAGC
 CCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCATGATTTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
 AAATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACAT
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAACACCACGCCTCCCATG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
 AGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGGCCGAGCTAAAGAGGGCCGAGCCAAA
 GCGGGATCCTGTGACCTGCCTCAGACTCATAACCTCAGGAACAAGAGAGCCTTGACACTCC
 TGGTACAAATGAGGAGACTCTCCCCTCTCTCCTGCCTGAAGGACAGGAAGGACTTTGGATT
 CCCGCAGGAGAAGGTGGATGCCAGCAGATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTCTGAGT
 GAGCTGACCCAGCAGATCCTGAACATCTTCACATCAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGAAATG
 CAACCCTCCTAGACTCATTCTGCAATGACCTCCACCAGCAGCTCAATGACCTGCAAGGTTG
 TCTGATGCAGCAGGTGGGGGTGCAGGAATTTCCCCTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGGCT
 GTGAGGAAATACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAGAGAAGAAACACAGCCCCTGTG
 CCTGGGAGGTGGTCAGAGCAGAAGTCTGGAGAGCCCTGTCTTCTCTGCCAATGTGCTGGG
 AAGACTGAGAGAAGAGAAATGA

Fig. 1D

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG3-muIFN α

MYLGLNCVIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
 RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVGERPAQ
 GGRVSAGSQAQPSCLDASRLCSPSPGHQGRPRLTTPHPEASARPTHAQGEGLLAFSTRLRAG
 TGWMFLPQALHTQGQVLRSELPRASRRTLPLTELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPC
 PRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY
 VDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKAEAAAKEAAAKAGSCDLPQTHNLRNKRALT
 LVQMRRLSPLSCLKDRKDFGFPQEKVDAQQIKKAQAIPVLSELTQQILNIFTSKDSSAAWN
 ATLLDSFCNDLHQQLNDLQGCLMQQVGVEFPLTQEDALLAVRKYFHRITVYLREKKHSPC
 AWEVRAEVWRALSSSANVLGRLREEK

Fig. 1D, continuación

Secuencia de ácido nucleico del enlazador Gly₄Ser de α CD20-IgG3-huIFN α

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGG
 TACAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGT
 CGGGGCTTGAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGA
 AGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCT
 CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGC
 GGTGACTGGTACTTCAAIGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCA
 CCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCA
 GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACT
 CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCGCAG
 GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCTGGACGCATCCCGGCTGT
 GCAGTCCCAGCCCAGGGCACCAAGGCAGGCCCCGTCTGACTCCTCACC CGGAGGCCTCTGC
 CCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGGC
 ACAGGCTGGATGCCCCCTACCCCAGGCCCTTCACACACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGAGC
 TGCCAAGAGCCATATCCAGGAGGACCCTGCCCCCTGACCGAGCTCAAAACCCCCACTTGGTGA
 CACAACCTCACACATGCCCCAGGTGCCAGAGCCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGC
 CCAAGGTGCCCAGAGCCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCAGAGC
 CCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCATGATTTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTIACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGCCAA
 AATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAACACCACGCCTCCCATGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTGGATCCTGTGATCTGCCTCAA
 CCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAAATCTCTCT
 TTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAG
 TTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCT
 TCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCCTAGACAAATTCTACACTGA
 ACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAG
 ACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTC
 TCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGTICAGAGCAGAAATCAT
 GAGATCTTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGA

Fig. 1E

Secuencia de aminoácidos del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG3-huIFNα

MYLGLNCVITIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
 RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGITTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTISGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVGERPAQ
 GGRVSAGSQAQPSCLDASRLCSFSPGHQGRPRLTPHPEASARPTHAQGEGLLAFSTRLRAG
 TGWMPLPQALHTQGGQVLRSELPRAISRRTLPLTELKTPLODITHTCPRCPEPKSCDTPPPC
 PRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY
 VDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPFMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRI
 LFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMTQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYT
 ELYQQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEI
 MRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 1E, continuación

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG3-hulFN α

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGG
 TACAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTG
 CAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGT
 CGGGGCTTGGAAATGGATTGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGA
 AGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCT
 CAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGC
 GGTGACTGGTACTTCAATGCTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCA
 CCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGGCACAGC
 GGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA
 GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACT
 CCTCAGCAGCCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCCAA
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCCAG
 GGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTGT
 GCAGTCCCAGCCCAGGGCACCAAGGCAGGCCCCGTCTGACTCCTCACCOCGGAGGCCTCTGC
 CCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGGC
 ACAGGCTGGATGCCCTACCCCAGGCCCTTACACACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGAGC
 TGCCAAGAGCCATATCCAGGAGGACCCTGCCCCTGACCGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGA
 CACAACCTCACACATGCCACGGTGCCCAGAGCCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGC
 CCAAGGTGCCAGAGCCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCAGAGC
 CCAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCATGATTTCCCGGACCCCTGAG
 GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACG
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCTGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
 GTTCCGTGTGGTACGCTCCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
 AATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACAT
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAACACCAGCCTCCCATG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGC
 AGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTGGATCCTGTGATCTGCCTCAA
 ACCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTC
 TTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCTCAGGAGGAGTTTGGCAACCA
 GTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTC
 TTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTTGGGATGAGACCCCTCCTAGACAAATTCTACACTG
 AACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGGTGGGGGTGACAGA
 GACTCCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACT
 CTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTGAGAGCAGAAATCA
 TGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGA

Fig. 1F

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG3-huFN α

MYLGLNCVITIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTEG
 RGLEWIGATYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVGERPAQ
 GGRVSAGSQAQPSCLDASRLCSPSPGHQGRPRLTTPHPEASARPTHAQGEGLLAFSTRLRAG
 TGWMPLPQALHTQGQVLRSELPRAISRRTLPLTELKTIPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPC
 PRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVQFKWY
 VDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 KMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSEFPLYSKLTVDKSRW
 QQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKS AEAAAKEAAAKACDLPQTHSLGSRRTLMLL
 AQMRRLSLFSCSKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET
 LLDKFTYELYQQLNDEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW
 EVVRAETMRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 1F, continuación

Secuencia de ácido nucleico del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG1-mulFNα

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGGTACAAC
TGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTTCGGGGCCTGGAATGGATT
GGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGA
CTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCCAACCAAGGGCCCATCGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCC
CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGCAGGGCCAC
ATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCTAC
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTG
GATCCTGTGACCTGCCTCAGACTCATAACCTCAGGAACAAGAGAGCCTTGACACTCCTGGTACAAAT
GAGGAGACTCTCCCTCTCTCTGCTGAAGGACAGGAAGGACTTTGGATTCCCGCAGGAGAAGGTG
GATGCCAGCAGATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTCTGAGTGAGCTGACCCAGCAGATCCTGA
ACATCTTCACATCAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGAAATGCAACCCTCCTAGACTCATTCTGCAATGA
CCTCCACCAGCAGCTCAATGACCTGCAAGGTTGTCTGATGCAGCAGGTGGGGTGCAGGAATTCCC
CTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAATACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAG
AGAAGAAACACAGCCCCTGTGCCTGGGAGGTGGTCAGAGCAGAAGTCTGGAGAGCCCTGTCTTCTC
TGCCAATGTGCTGGGAAGACTGAGAGAAGAGAAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG1-mulFNα

MYLGLNCV IIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
GDWYFNVWGAGTTVTVSAASQPRHRSSPWHPPPRAPLGAQRPWAAWSRTTSPNREPKSCD
KHTTCPPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGGRGVRGPHGQRPAPRTLCPESD
RCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSC
DLPQTHNLRNKRALTLLVQMRRLSPLSCLKDRKDFGFPQEKVDAQQIKKAQAIPVLSLTQ
QILNIFTSKDSSAAWNATLLDSFCNDLHQQLNDLQGLMQQVGVQEFPLTQEDALLAVRKY
FHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRALSSSANVLGRLREEK

Fig. 1G

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG1-mulFN α

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGGTACAAC
TGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATT
GGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGA
CTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCCAAACCAAGGGCCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCC
CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGGCCAC
ATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTTAC
AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTG
GATCCTGTGACCTGCCTCAGACTCATAACCTCAGGAACAAGAGAGCCTTGACACTCCTGGTACAAAT
GAGGAGACTCTCCCCCTCTCTCTGCTGAAGGACAGGAAGGACTTTGGATTCCCGCAGGAGAAGGTG
GATGCCCAGCAGATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTCTGAGTGAGCTGACCCAGCAGATCCTGA
ACATCTTCACATCAAAGGACTCATCTGCTGCTTGAATGCAACCCTCCTAGACTCATTCTGCAATGA
CCTCCACCAGCAGCTCAATGACCTGCAAGGTTGTCTGATGCAGCAGGTGGGGGTGCAGGAATTTCCC
CTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAG
AGAAGAAACACAGCCCCTGTGCCTGGGAGGTGGTCAGAGCAGAAGTCTGGAGAGCCCTGTCTTCTC
TGCCAATGTGCTGGGAAGACTGAGAGAAGAGAAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG1-mulFN α

MYLGLNCV IIVFLLKGVQSQVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
RGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
GDWYFNVWGAGTIVTVSAASQPFRAHRSSPWHPPRAPLGAQRPWAASRTTSPNREPKSCD
KIHTCPPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGGTRGVGRPHGQRPAPRTLCPESD
RCTNLCPGTQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS **AEAAAK**
EAAAKACDLPQTHNLRNKRALTLLVQMRRLSPLSCLKDRKDFGFPQEKVDAQQIKKAQAIP
VLSELTQQILNIFTSKDSSAAWNATLLDSFCNDLHQQLNDLQGLMQQVGVQEFPLTQEDA
LLAVRKYFHRTVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRALSSSANVLGRLREEK

Fig. 1H

Secuencia de ácido nucleico del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG1-huIFNα

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGGTACAAC
TGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGG
CTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTGGGGCCTGGAATGGATT
GGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGA
CTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCCAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCCAA
GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCC
CAAACTCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACA
TGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT
CCTCACCGTCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCAGCCCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGCAGGGCCAC
ATGGACAGAGGCGGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTTAC
AGGGCAGCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTG
GATCTGTGATCTGCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGAOCTTGATGCTCTGGCACAGAT
GAGGAGAATCTCTCTTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTT
GGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCTCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATC
TCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTAGACAAATCTTACACTGAACT
CTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCTG
ATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGA
AGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGTGAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAAC
AAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador Gly₄Ser de αCD20-IgG1-huIFNα

MYLGLNCVIIIVFLKGVQSQVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
RGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
GDWYFNVWGAGTTVTVSAASQPRHRSSPWHPPPRAPLGAQRPWAAWSRTTSPNREP KSCD
KTHTCPPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGGRGVRGPHGQRPAPRTLCPESD
RCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS **GGGGSC**
DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQ
IFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYF
QRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 11

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG1-huIFN α

ATGTACTTGGGACTGAACTGTGTAATCATAGTTTTTCTCTTAAAAGGTGTCCAGAGTCAGGTACAAC
 TGCAGCAGCCTGSGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGG
 CTACACATTTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATT
 GGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGA
 CTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGT
 CTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACC
 ACGGTCACCGTCTCTGCAGCTAGCCAAACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA
 GAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCC
 CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
 TGCCTGGTGGTGGACCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGT
 CCTCACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGIGGGGTGGAGGGCCAC
 ATGGACAGAGGCGCGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTTAC
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
 GGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGGCCCGCAG
 CTAAGAGAGCCGACAGCCAAAGCGGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAG
 GACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGAC
 TTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCTCATG
 AGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCT
 CCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGG
 GTGGGGGTGACAGAGACTCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAA
 GAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAAT
 CATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α CD20-IgG1-huIFN α

MYLGLNCVIIVFLLKGVQSQVQLQOPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
 RQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKPKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGTIVTVSAASQPRAHRSPPWHPPPRAPLGAQRFPWAAWSRTTSPNREP KSCD
 KTHTCPPCPMISRIPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPLEKTIISKAKGGTRGVRGPHGQRPAPRTLCPESD
 RCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**AEAAAKE**
AAAKAGSCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRLSFLSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIP
 VLHEMIQQIFNLFSTKDSAAWDETLLDKFYTELYQQQLNDLEACVIQGVGVTEPLMKEDS
 ILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 1J

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de α Her2/neu

ATGGGATGGAGCTGGGTAATCCTCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCACTCCCAGT
CTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTCGGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTG
CTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGA
ACAGCCCCCAAACCTCATCTATGATCACACCAATCGGCCCCGCAGGGGTCCCTGACCGAT
TCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCGGTCCGAGGA
TGAGGCTGATTATTACTGTGCCTCCTGGGACTACACCCTCTCGGGCTGGGTGTTCCGAGGA
GGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTGAG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de α Her2/neu

MGWSWVILFLLSVTAGVHSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPG
TAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGG
GTKVTVLGE

Fig. 1K

Secuencia de ácido nucleico del enlazador glyser de αHer2/neu-IgG1-mulFNa

ATGGGATGGAGCTGGGTAATGCATCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGATGCCCCGGGAAAGGCCTGGA
 GTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAAATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTC
 ACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCACTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACA
 GCGCCGTGTATTTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGACCGGACTTGCGCAAAGTGGCC
 TGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCCAACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
 CCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGGAGGGCCACATGGACAGAGGCGGCTCGGCCCACCCTCTGCCCTG
 AGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG
 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTGGATCCTGTGACCTGCCTCAGACTCATAACCTCAGGA
 ACAAGAGAGCCTTGACACTCCTGGTACAAATGAGGAGACTCTCCCCTCTCTCCTGCCTGAAGGACAG
 GAAGGACTTTGGATTCCCGCAGGAGAAGGTGGATGCCCAGCAGATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCT
 GTCCTGAGTGAGCTGACCCAGCAGATCCTGAACATCTTCACATCAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGA
 ATGCAACCCTCCTAGACTCATTCTGCAATGACCTCCACCAGCAGCTCAATGACCTGCAAGGTTGTCT
 GATGCAGCAGGTGGGGGTGCAGGAATTTCCCCTGACCCAGGAAGATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAAA
 TACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAGAGAAGAAACACAGCCCCCTGTGCCTGGGAGGTGGTCA
 GAGCAGAAGTCTGGAGAGCCCTGTCTTCTCTGCCAATGTGCTGGGAAGACTGAGAGAAGAGAAATG
 A

Secuencia de aminoácidos del enlazador glyser de αHer2/neu-IgG1-mulFNa

MGWSWVMHLSPVSNCMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVTISVDKSVSTAYLQWSS
 LKPSDSAVYFCARHDVGYCTDRTCAKWPEYFQHWGQGLVTVSSASQPRHRSSPWHPPPR
 APLGAQRPWAAWSRTTSPNREP KSCDKTHTCPPCPMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGGTRGVGRPHGQRPARPTLCPESDRCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 LVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGKS **GGGGS**CDLPQTHNLRNKRALTLLVQMRRLSPLSCLKDRKDF
 GFPQEKVDAQQIKKAQAIPVLSELTQQILNIFTSKDSSAAWNATLLDSFCNDLHQQLNDLQ
 GCLMQQVGVQEFPLTQEDALLAVRKYFHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRALSSSANV
 LGRLREEK

Fig. 1L

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α Her2/neu-IgG1-muIFN α

ATGGGATGGAGCTGGGTAATGCATCTTTCTCCTGTCAGTAAGTGCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGA
GTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAAATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTC
ACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCACTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACA
GCGCCGTGTATTTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGACCGGACTTGCGCAAAGTGGCC
TGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCCAACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
CCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTG
AGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGGCCGAGCTAAAGAGGCCGAGCCAAAGCGGGATCCTGTGACC
TGCCTCAGACTCATAACCTCAGGAACAAGAGAGCCTTGACACTCCTGGTACAAATGAGGAGACTCTC
CCCTCTCTCCTGCCTGAAGGACAGGAAGGACTTTGGATTCCCGCAGGAGAAGGTGGATGCCAGCAG
ATCAAGAAGGCTCAAGCCATCCCTGTCTGAGTGAGCTGACCCAGCAGATCCTGAACATCTTACAT
CAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGAAATGCAACCTCCTAGACTCATTCTGCAATGACCTCCACCAGCA
GCTCAATGACCTGCAAGGTTGTCTGATGCAGCAGGTGGGGGTGCAGGAATTTCCCTGACCCAGGAA
GATGCCCTGCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGGATCACTGTGTACCTGAGAGAGAAGAAACACA
GCCCCGTGCTGGGAGGTGGTCAGAGCAGAAGTCTGGAGAGCCCTGTCTTCTCTGCCAATGTGCT
GGGAAGACTGAGAGAAGAGAAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α Her2/neu-IgG1-muIFN α

MGWSWVMHLSPVSNCMPGKGLIYMPGSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSS
LKPSDSAVYFCARHDVGYCTDRCTCAKWPEYFQHWGQGLTVTVSSASQPRHRSSPWHPPR
APLGAQRPWAWSRTTSPNREPKSCDKHTTCCPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISK
AKGGTRGVRGPHGQRPAPRTLCPESDRCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
HEALHNHYTQKSLSLSPGKSAEAAAKEAAKACDLPQTHNLRNKRALTLLVQMRRLSPLSC
LKDRKDFGFPQEKVDAQQIKKAQAIPVLSELTQQILNIFTSKDSSAAWNATLLDSFCNDLH
QQLNLDLQGLMQQVGVQEFPLTQEDALLAVRKYFHRITVYLREKKHSPCAWEVVRAEVWRA
LSSSANVLGRLREEK

Fig. 1M

Secuencia de ácido nucleico del enlazador glyser de αHer2/neu-IgG1-hulFNα

ATGGGATGGAGCTGGGTAATGCATCTTTCTCCTGTCAGTAACTGCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGA
GTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGAAGTCTGACACCAAATACAGCCCGTCCCTCCAAGGCCAGGTC
ACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCACTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACA
GCGCCGTGTATTTTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGACCGGACTTGCGCAAAGTGGCC
TGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCCAACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
CCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGTGGTACGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCCACCCCTCTGCCCTG
AGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCC
CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCCG
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAATCTGGTGGCGGTGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTA
GCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAG
ACAIGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTC
CTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATG
AGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAAGTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGAT
ACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATAC
TTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTGTGACAG
CAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador glyser de αHer2/neu-IgG1-hulFNα

MYLGLNLCVIIVFLLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
RGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
GDWYFNVWGAGTTVTVSAASQPRHRSSPWHPPPRAPLGAQRPWAAWSRTTSPNREP KSCD
KHTCTPPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGGRGVRGPHGQRPARP TLCPESD
RCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGGGSC
DLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQ
IFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYF
QRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 1N

Secuencia de ácido nucleico del enlazador helicoidal α de α Her2/neu-IgG1-hulFN α

ATGGGATGGAGCTGGGTAATGCATCTTTCTCCTGTGAGTAAGTGCAGATGCCCGGGAAAGGCCTGGA
 GTACATGGGGCTCATCTATCCTGGTGAAGTCTGACACCAAATACAGCCCGTCTTCCAAGGCCAGGTC
 ACCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCACTGCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCCCTCGGACA
 GCGCCGTGTATTTTTGTGCGAGACATGACGTGGGATATTGCACCGACCGGACTTGCGCAAAGTGGCC
 TGAATACTTCCAGCATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCCAACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
 CCCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAA
 GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC
 AAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTG
 AGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCG
 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
 TCCCTGTCTCCGGGTAAAGCAGAGGCCCGCAGCTAAAGAGGCCGCAGCCAAAGCGGGATCCTGTGATC
 TGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTC
 TCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCTCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTC
 CAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAA
 AGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCT
 GAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGATGAAGGAGGAC
 TCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCC
 CTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCAACAAACTTGCAAGA
 AAGTTTAAGAAGTAAGGAATGA

Secuencia de aminoácidos del enlazador helicoidal α de α Her2/neu-IgG1-hulFN α

MYLGLNCVIVFLKGVQSQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
 RGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYG
 GDWYFNVWGAGTTVTVAASQPRHRSSPWHPPPRAPLGAQRPWAAWSRTTSPNREP KSCD
 KHTCTPPCPMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGGRGVRGPHGQRPAPRTLCPESD
 RCTNLCPTGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSAEAAAK
 EAAAKACDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPV
 LHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQNLNDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSI
 LAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

Fig. 10

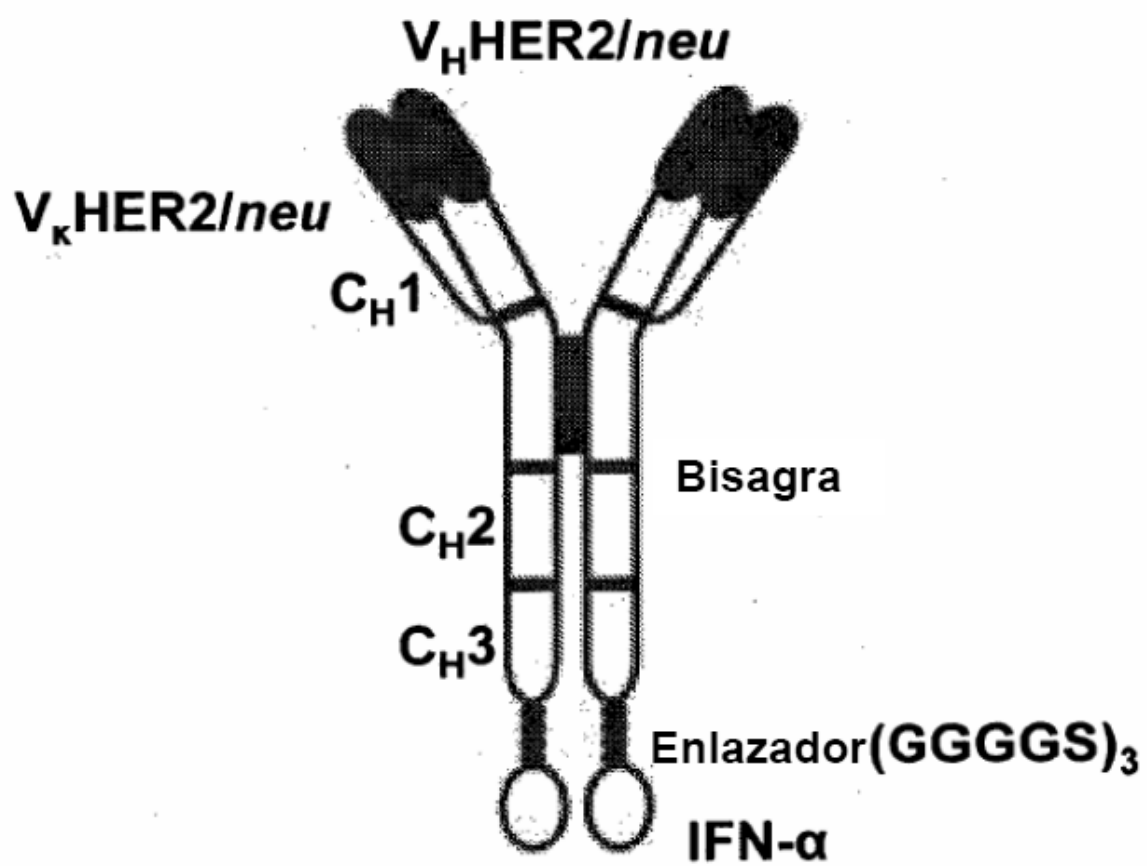


Fig. 2A

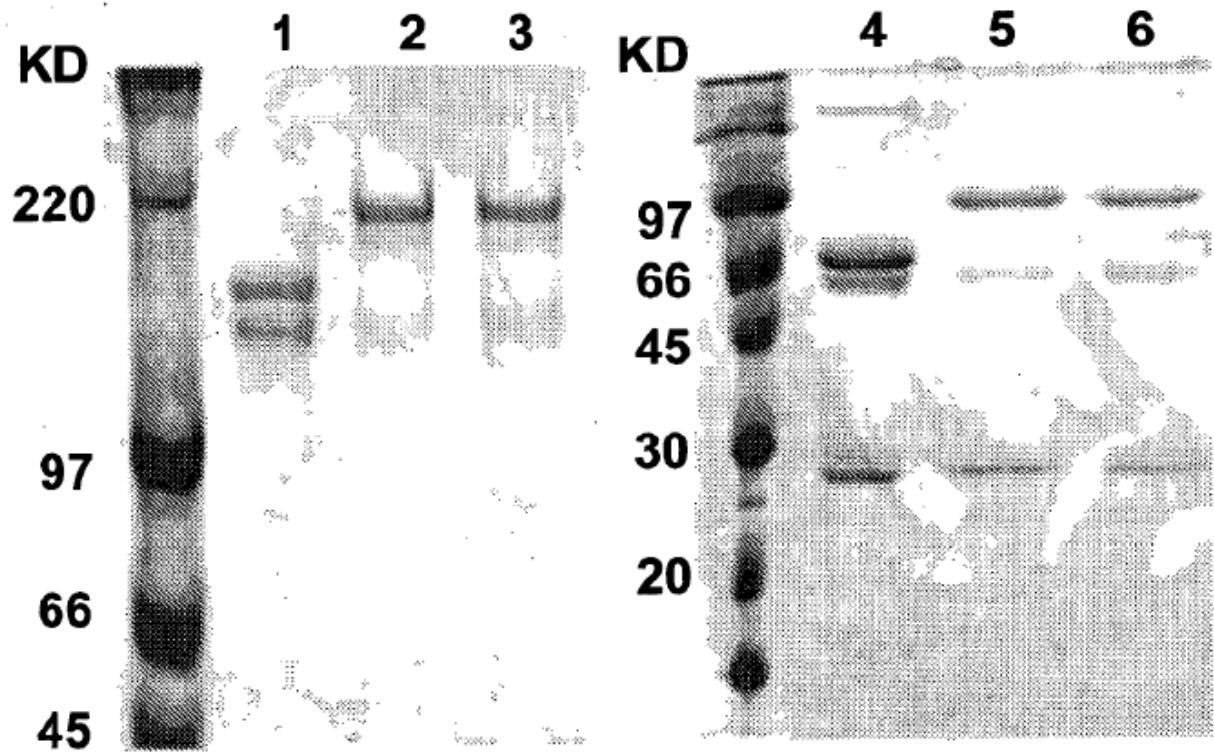


Fig. 2B

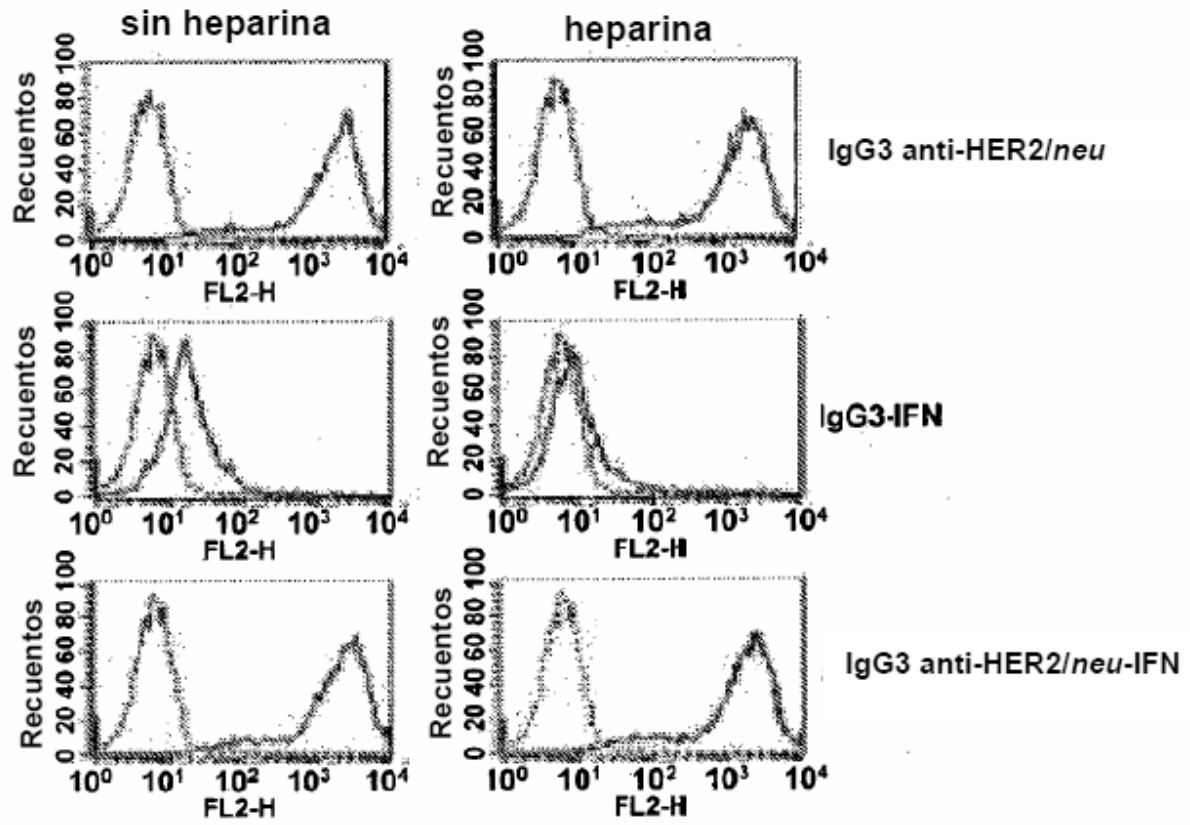
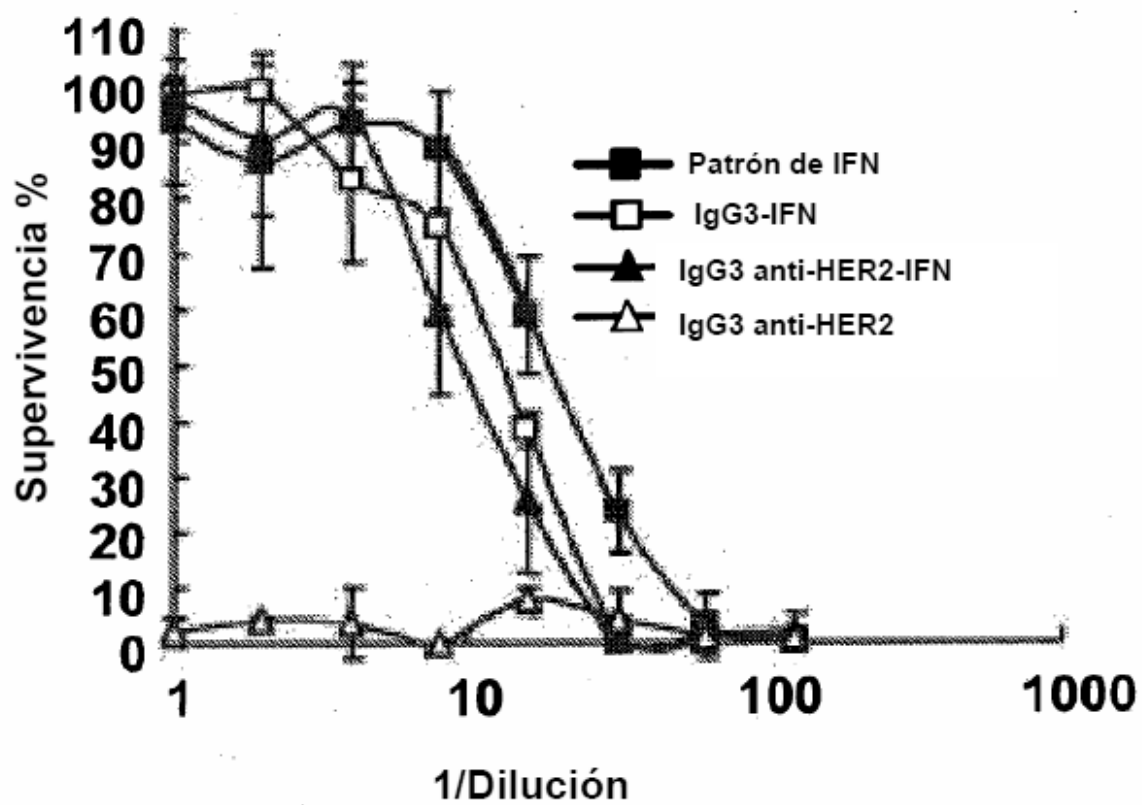


Fig. 2C

**Fig. 2D**

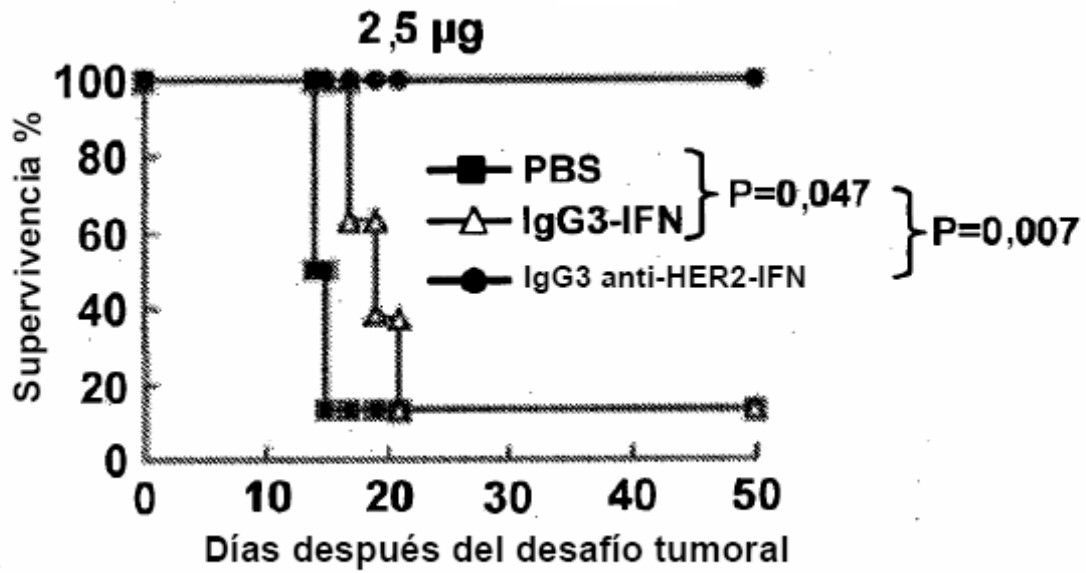


Fig.3A

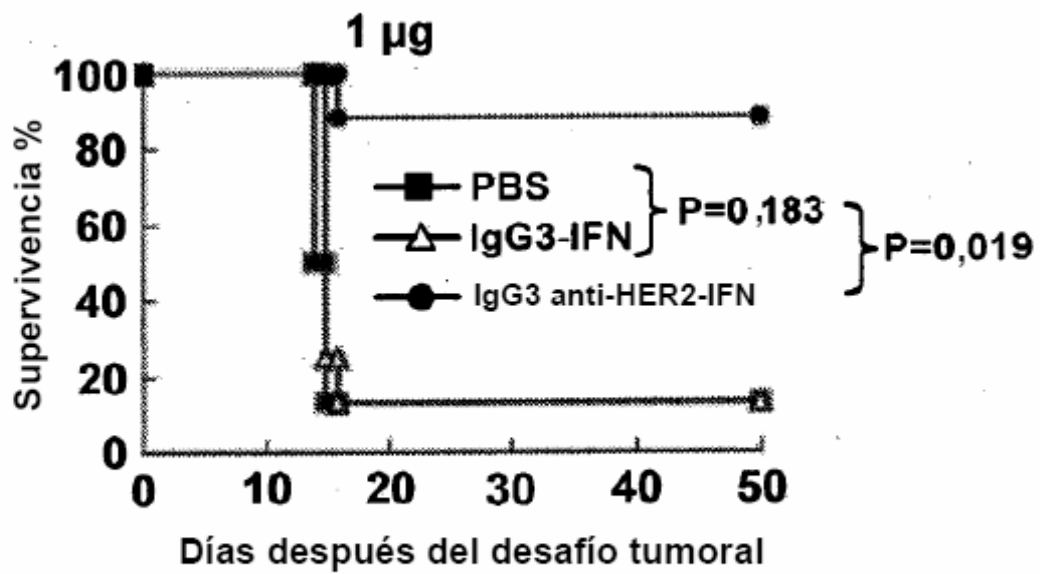


Fig.3B

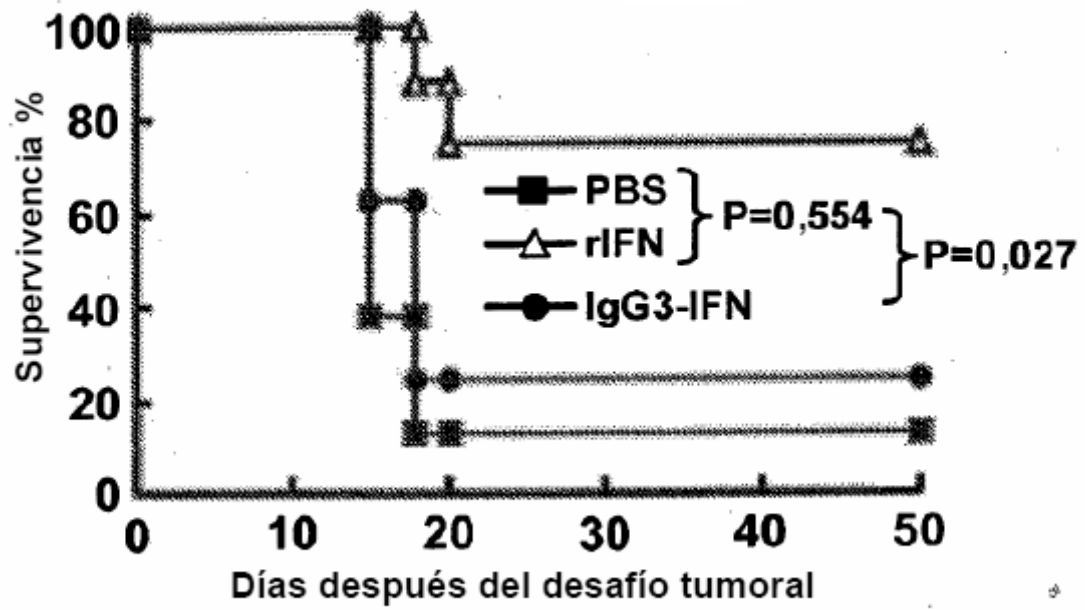


Fig.4A

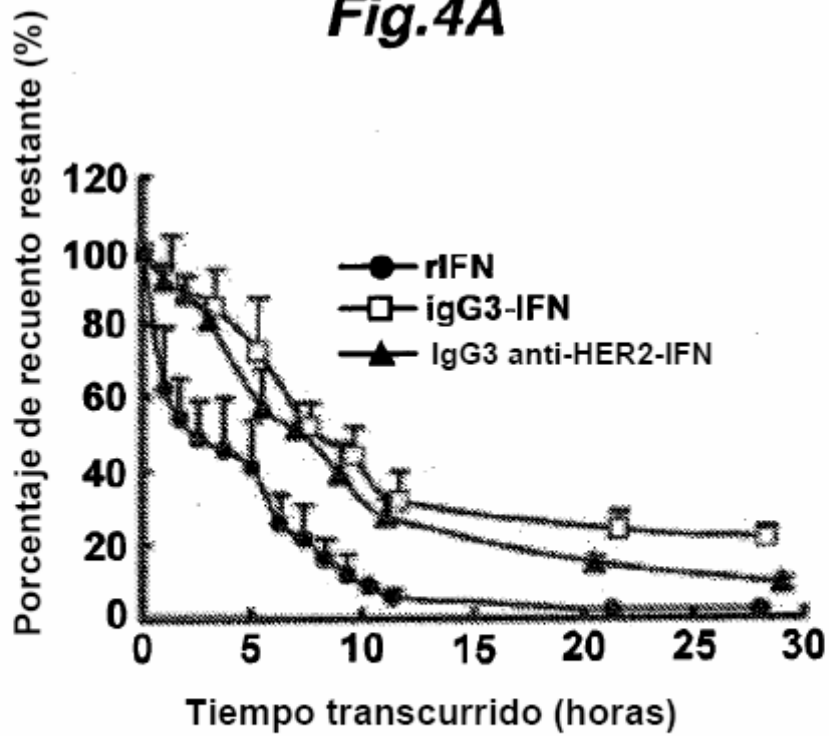


Fig.4B

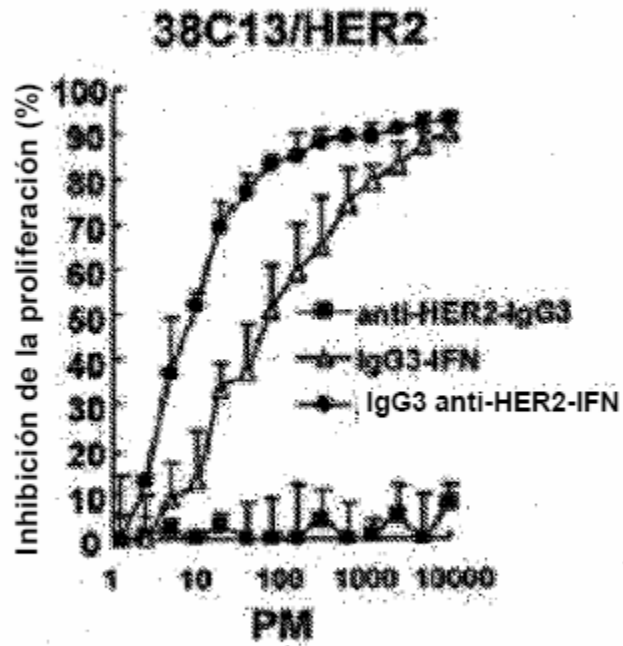


Fig.5A

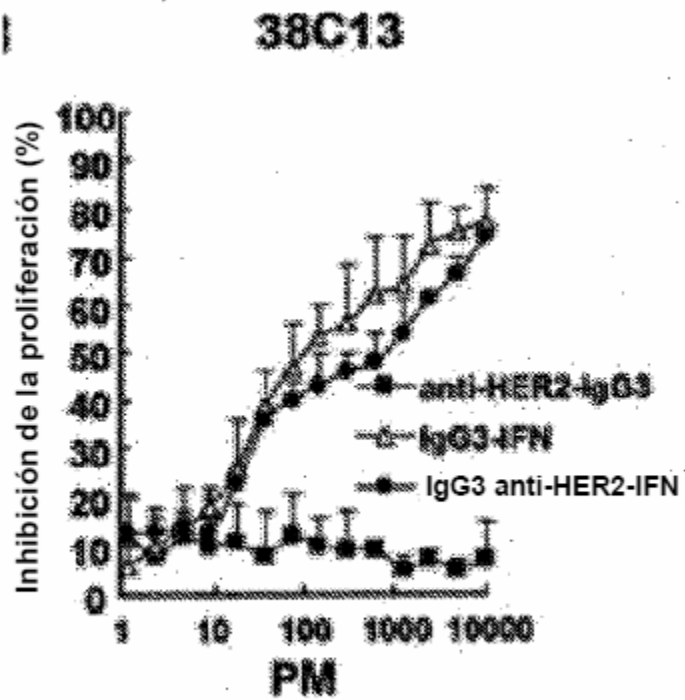


Fig.5B

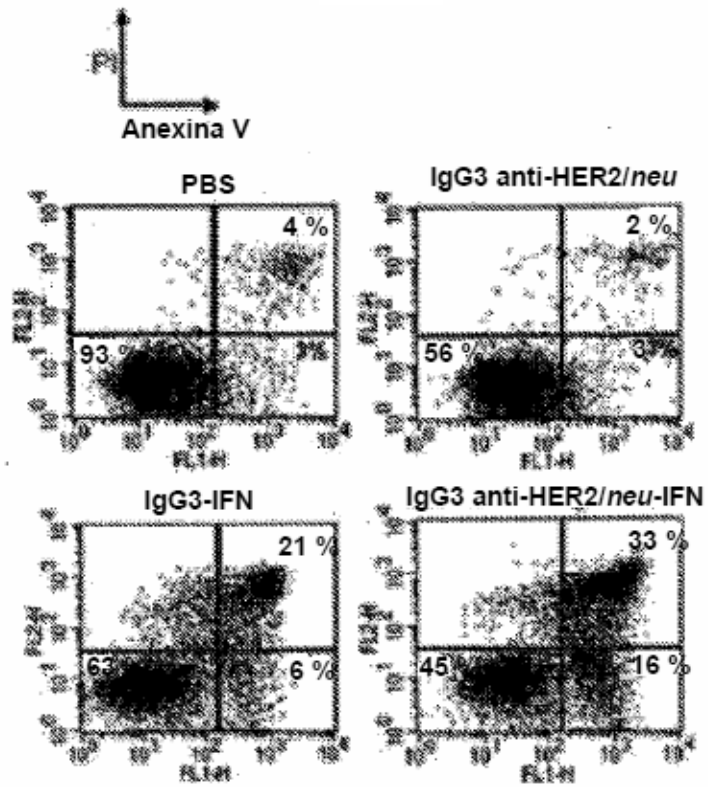
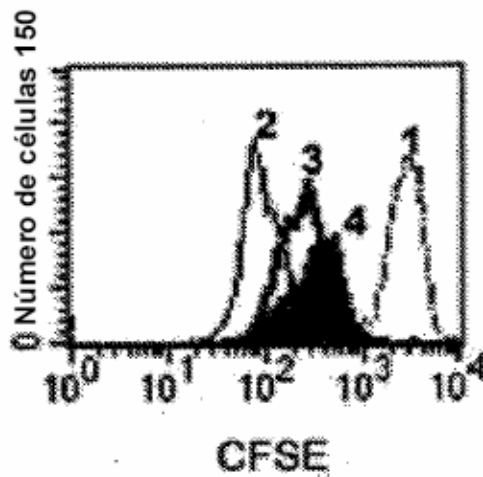


Fig.5C



1. Control de CFSE
2. PBS o IgG3 anti-HER2
3. IgG3-IFN
4. IgG3 anti-HER2-IFN

Fig.5D

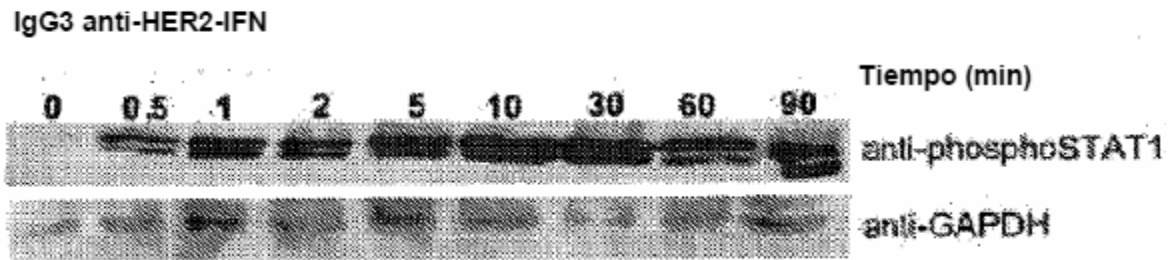


Fig.6A

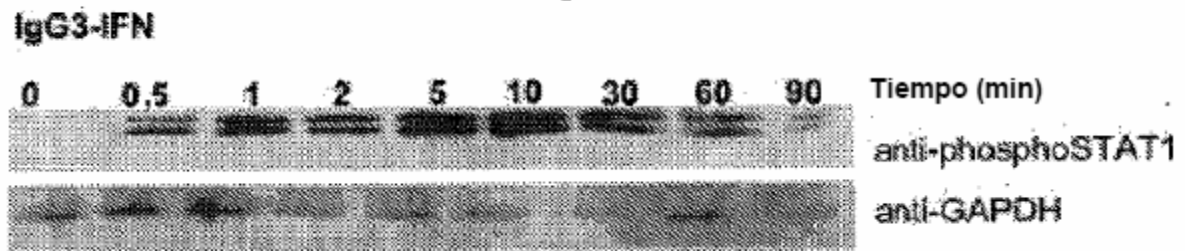


Fig.6B

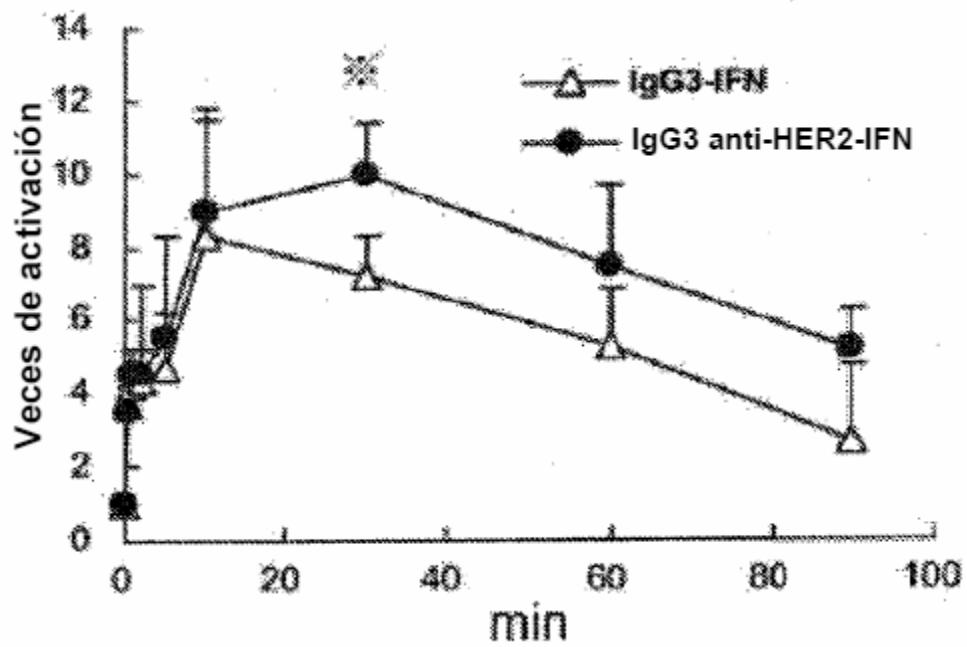


Fig.6C

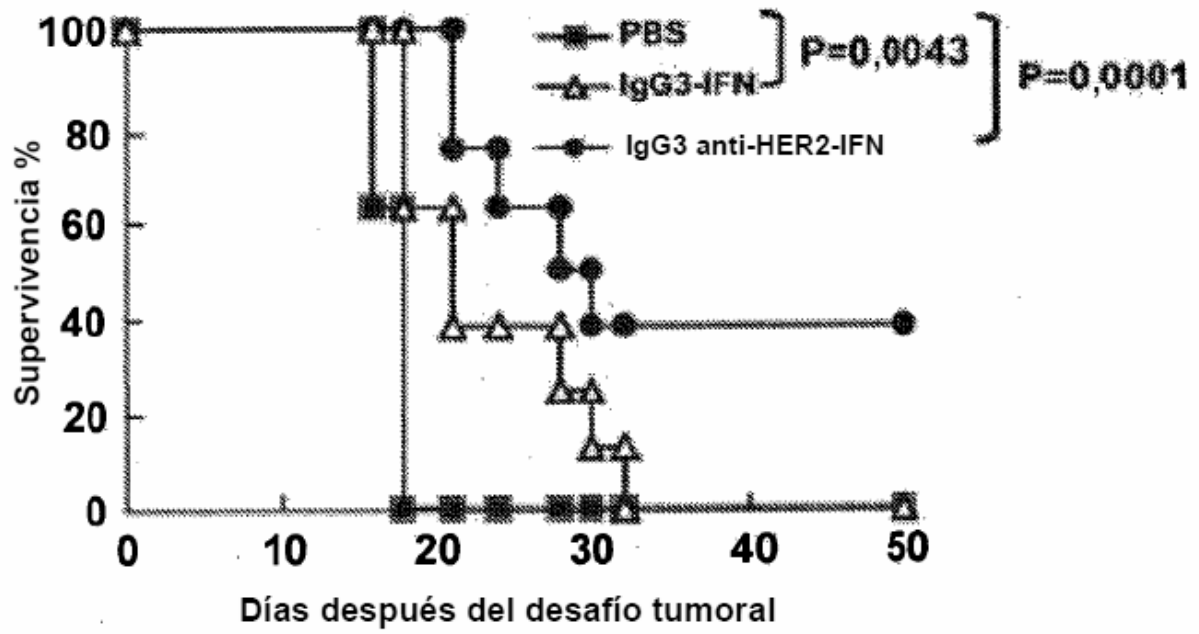


Fig.7

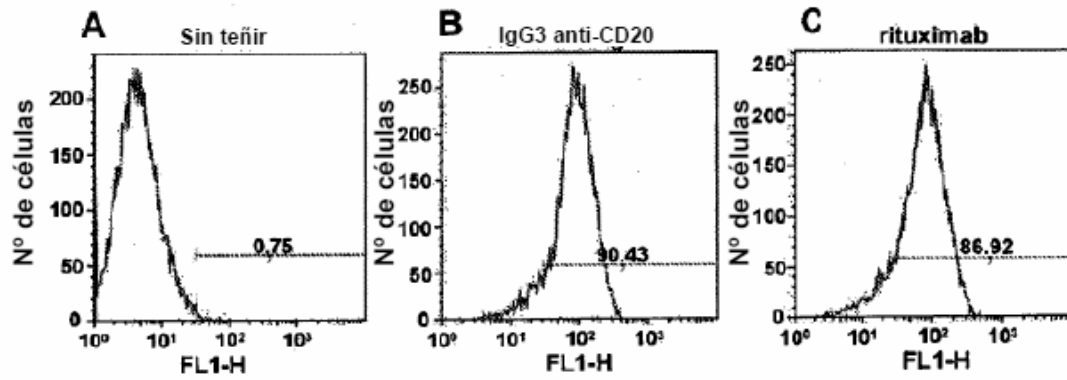


Fig. 8

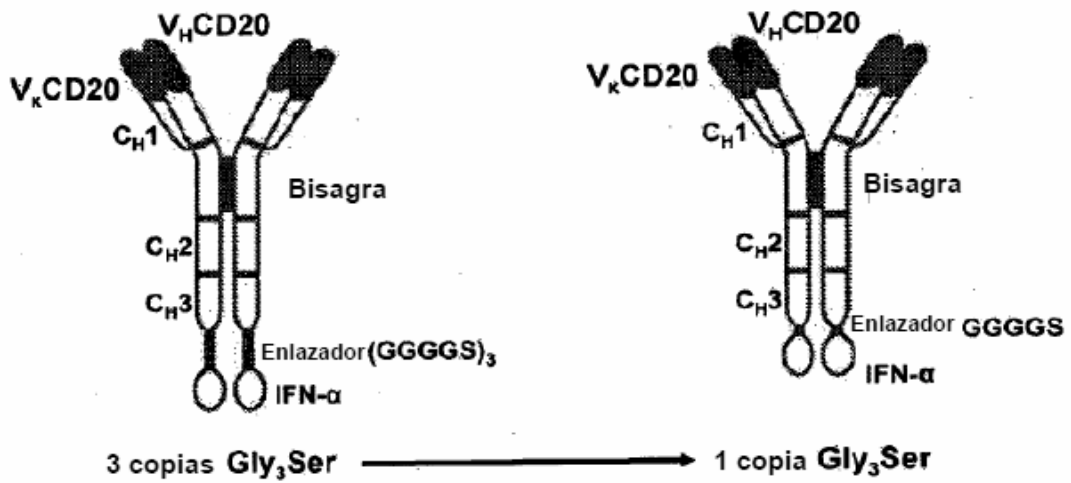


Fig. 9

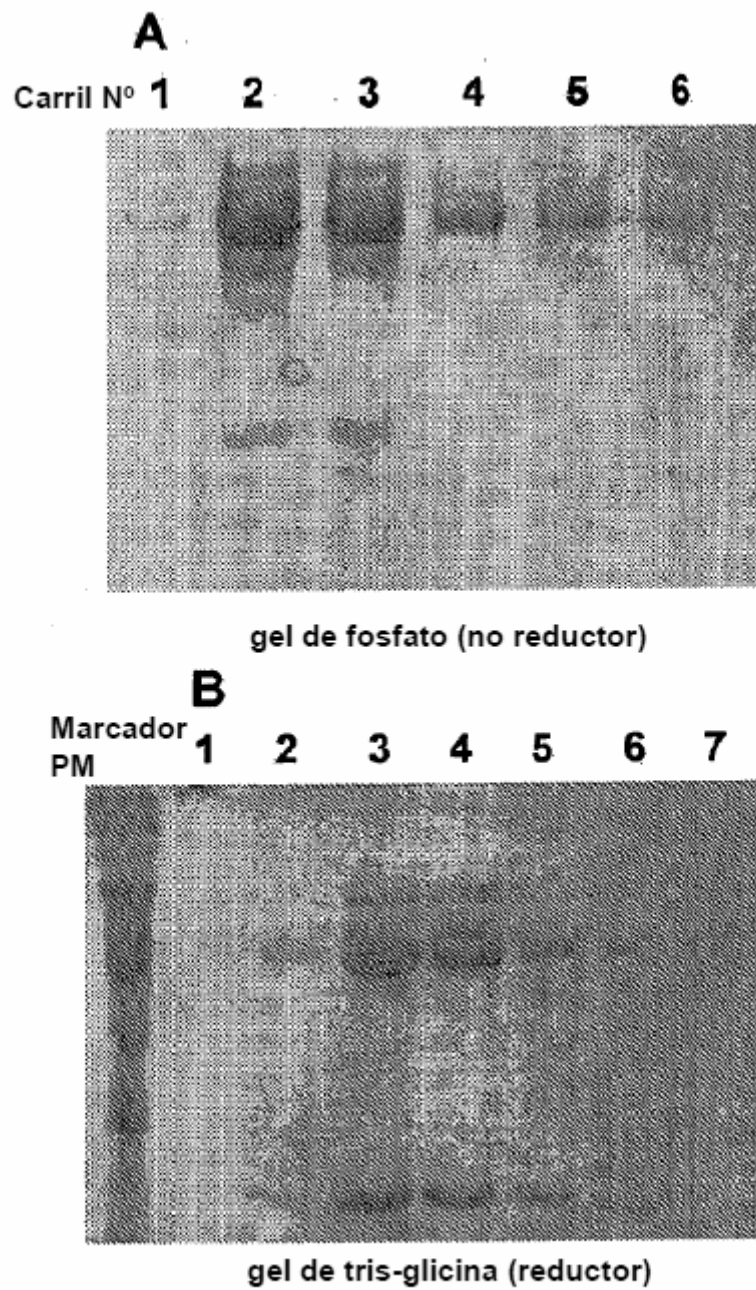


Fig. 10

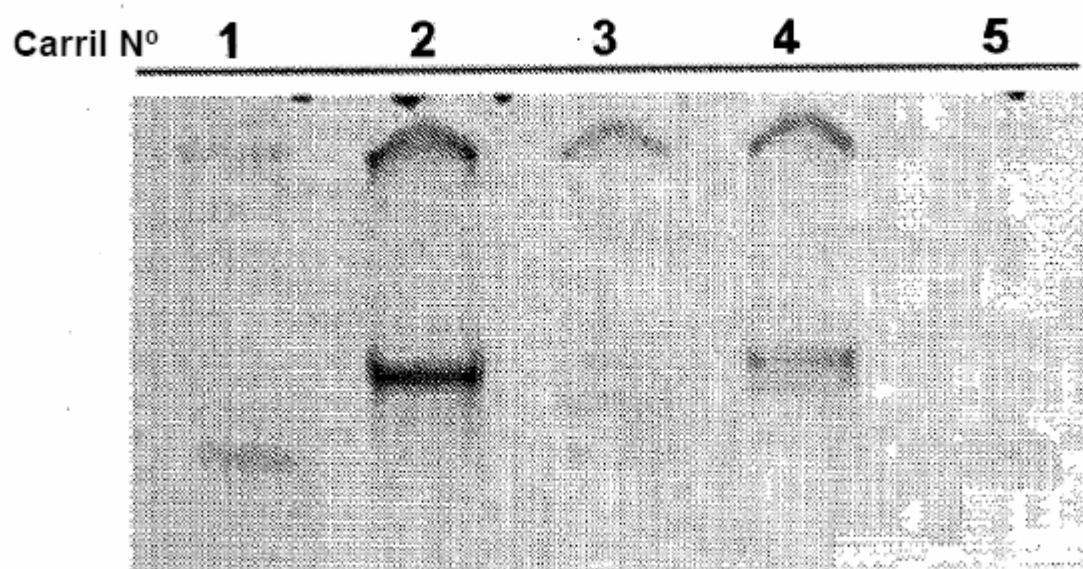


Fig. 11

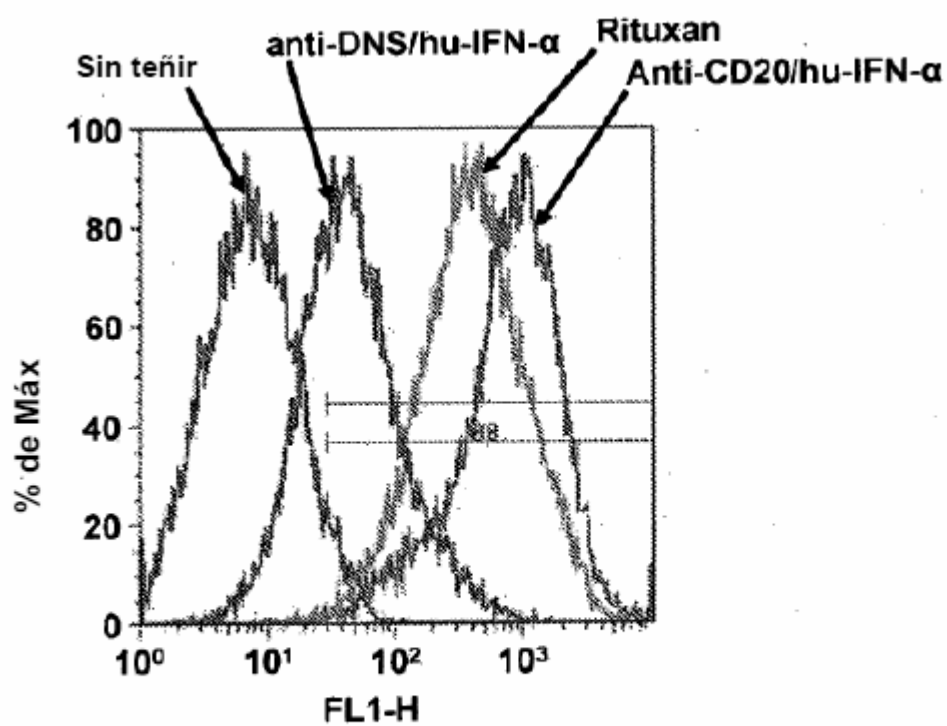


Fig. 12

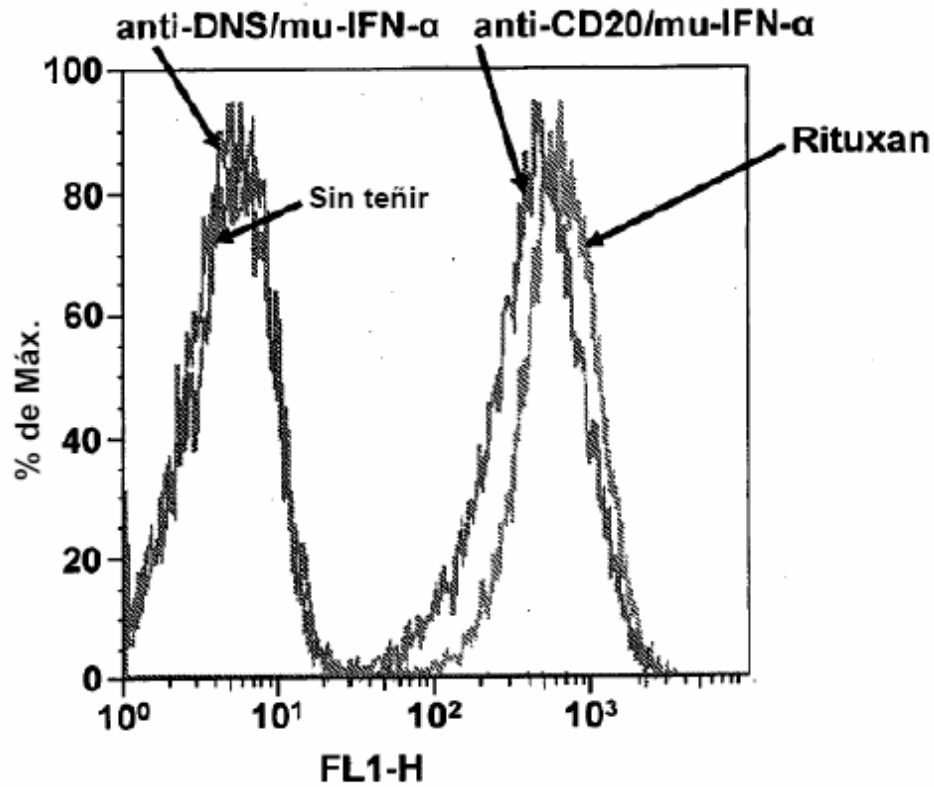


Fig. 13

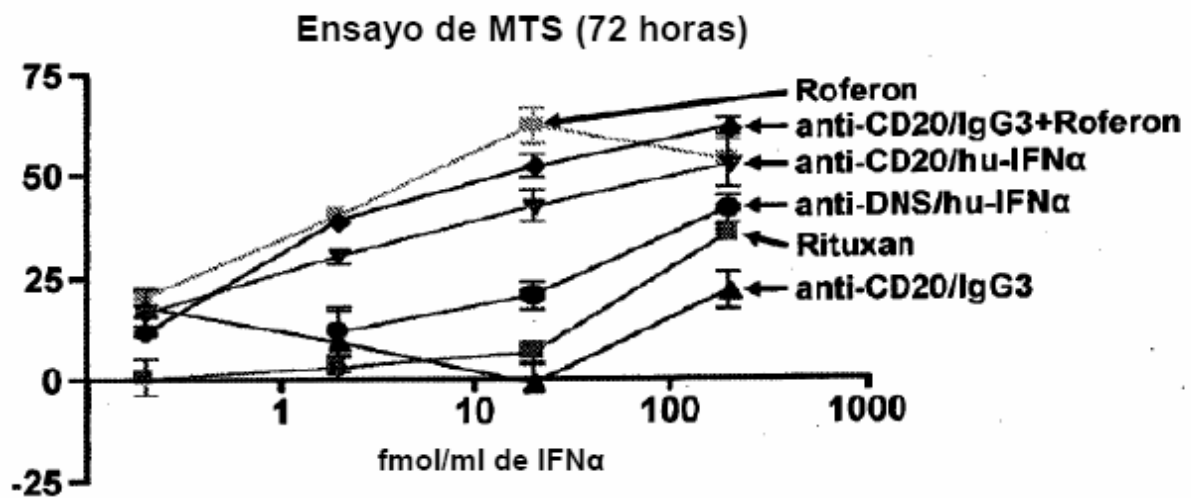


Fig. 14

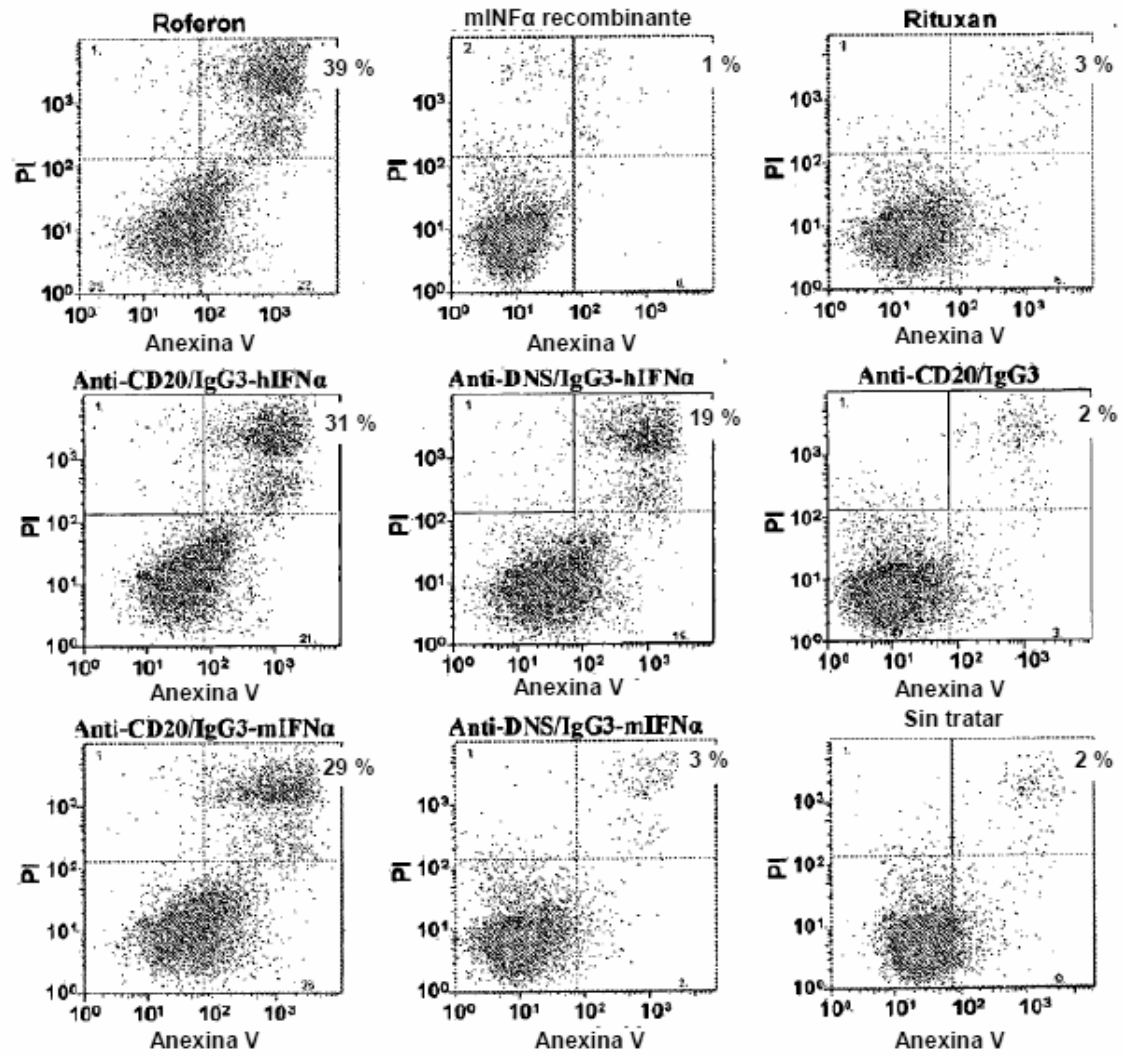


Fig. 15

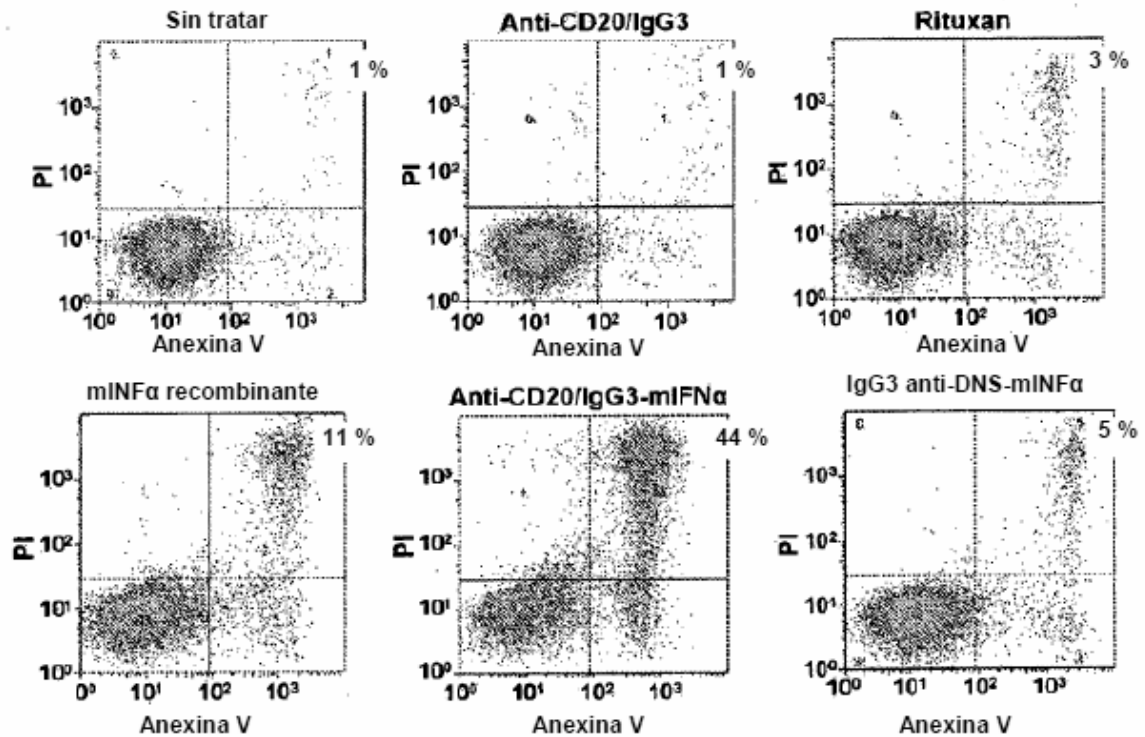


Fig. 16

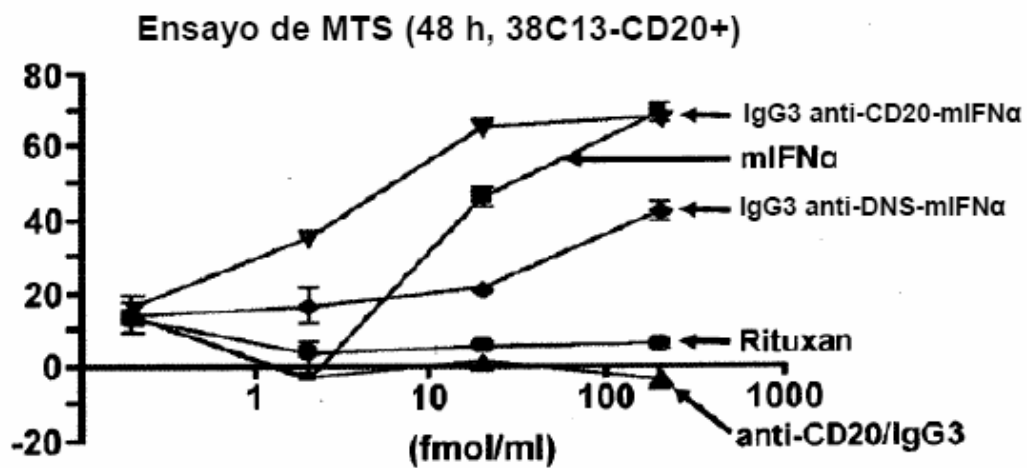


Fig. 17

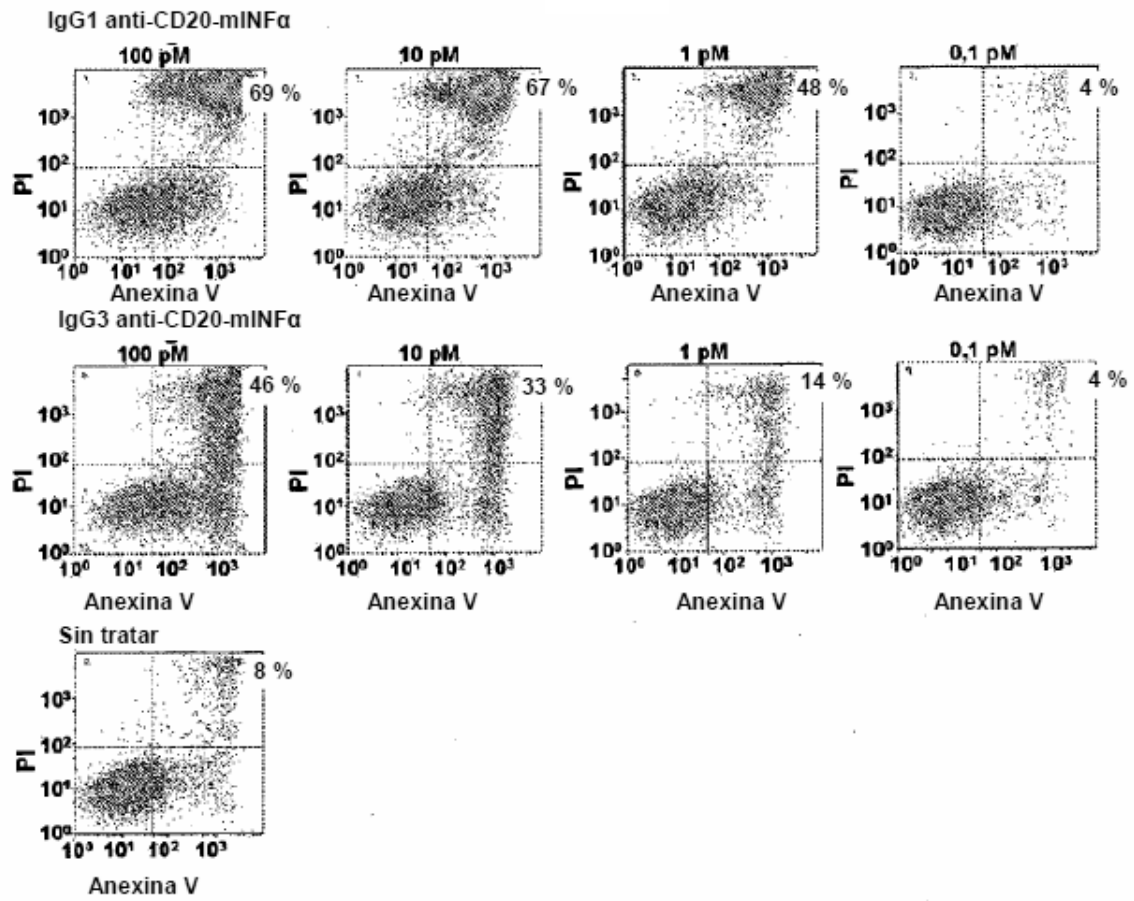


Fig. 18

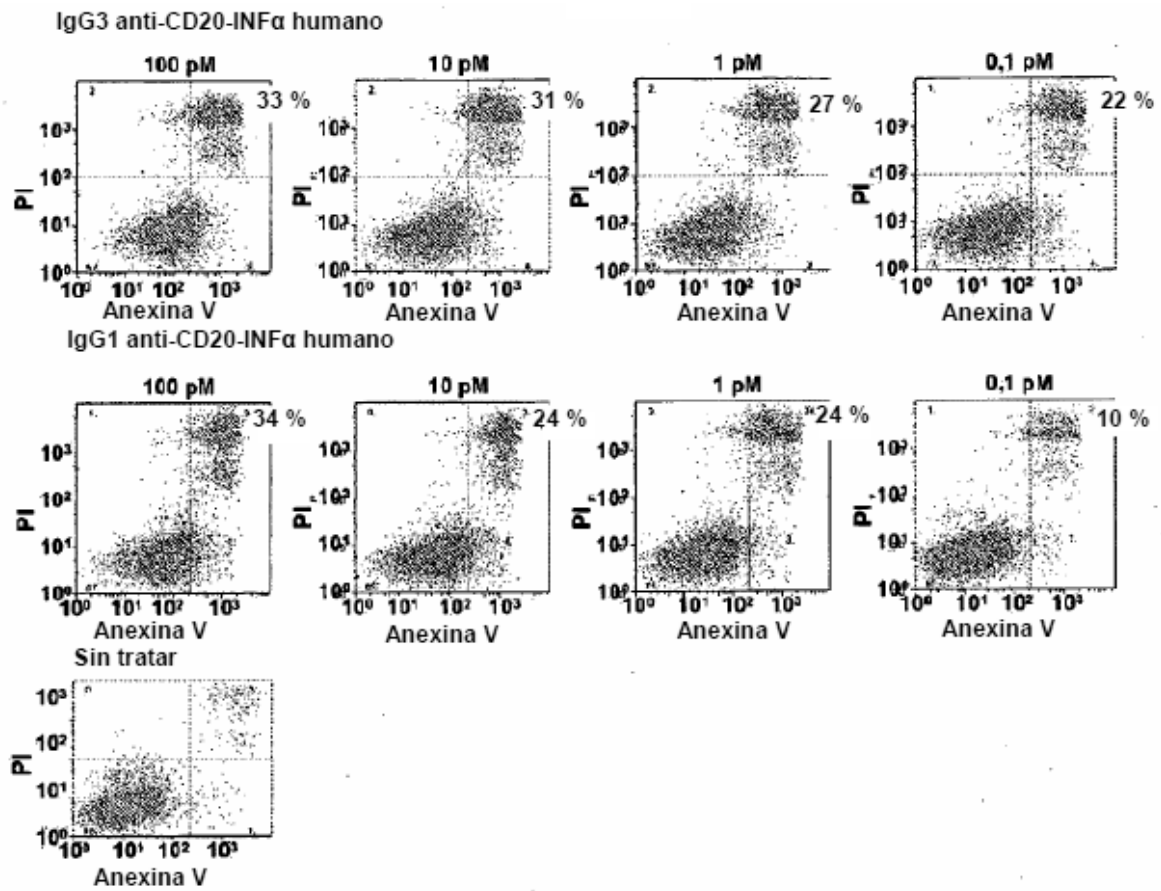


Fig. 19

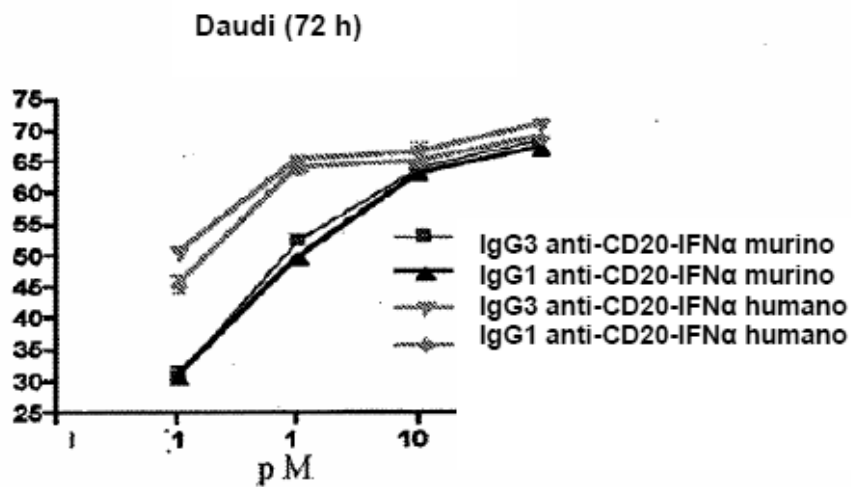


Fig. 20

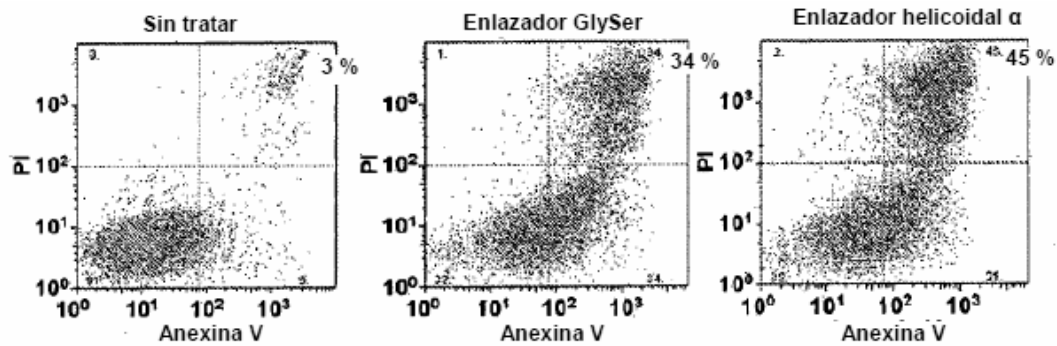
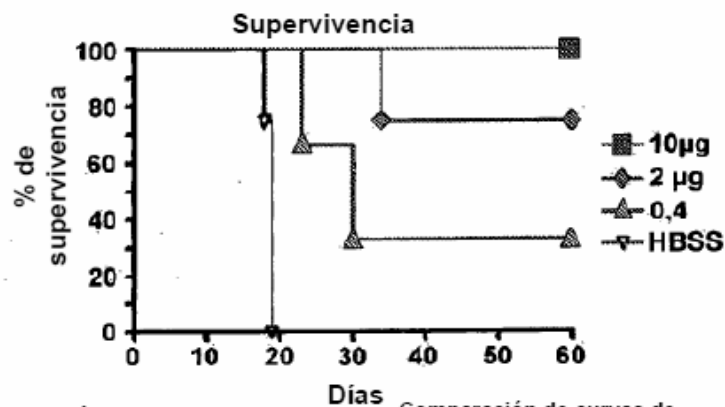


Fig. 21



Comparación de curvas de supervivencia		Comparación de curvas de supervivencia	
HBSS vs 10 ug		HBSS vs 2 ug	
Prueba de Logrank		Prueba de Logrank	
Cuadrado ji	6,628	Cuadrado ji	6,628
df	1	df	1
valor de P	0,0100	valor de P	0,0100
Resumen de valores de P	*	Resumen de valores de P	*
¿Son diferentes las curvas de supervivencia?	sí	¿Son diferentes las curvas de supervivencia?	sí
Comparación de curvas de supervivencia		Comparación de curvas de supervivencia	
HBSS vs 0,4 ug		0,4 ug vs 2 ug	
Prueba de Logrank		Prueba de Logrank	
Cuadrado ji	6,352	Cuadrado ji	3,282
df	1	df	1
valor de P	0,0207	valor de P	0,0701
Resumen de valores de P	*	Resumen de valores de P	ns
¿Son diferentes las curvas de supervivencia?	sí	¿Son diferentes las curvas de supervivencia?	no

Fig. 22

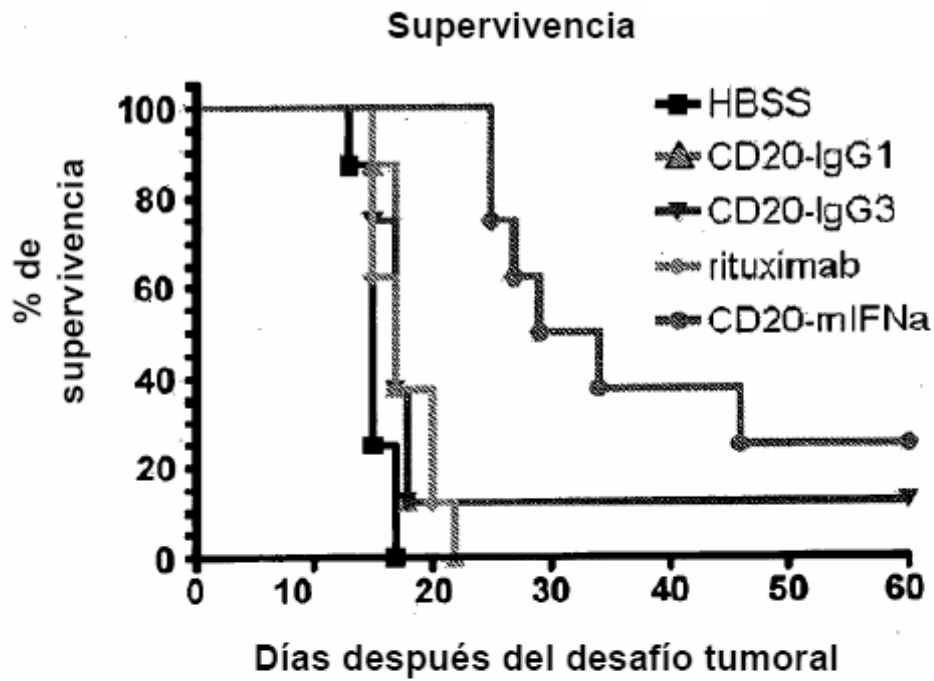


Fig. 23

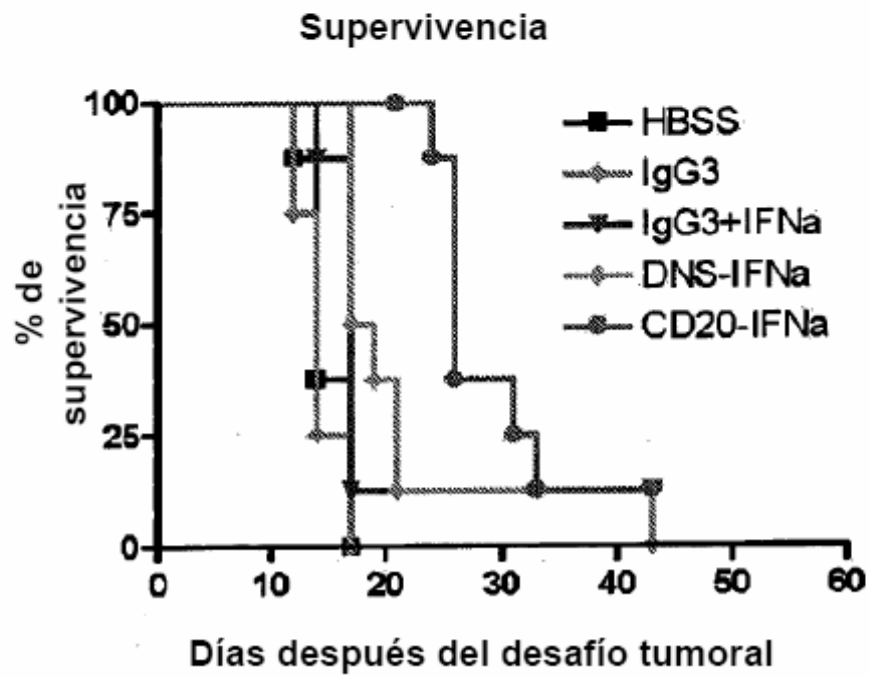


Fig. 24

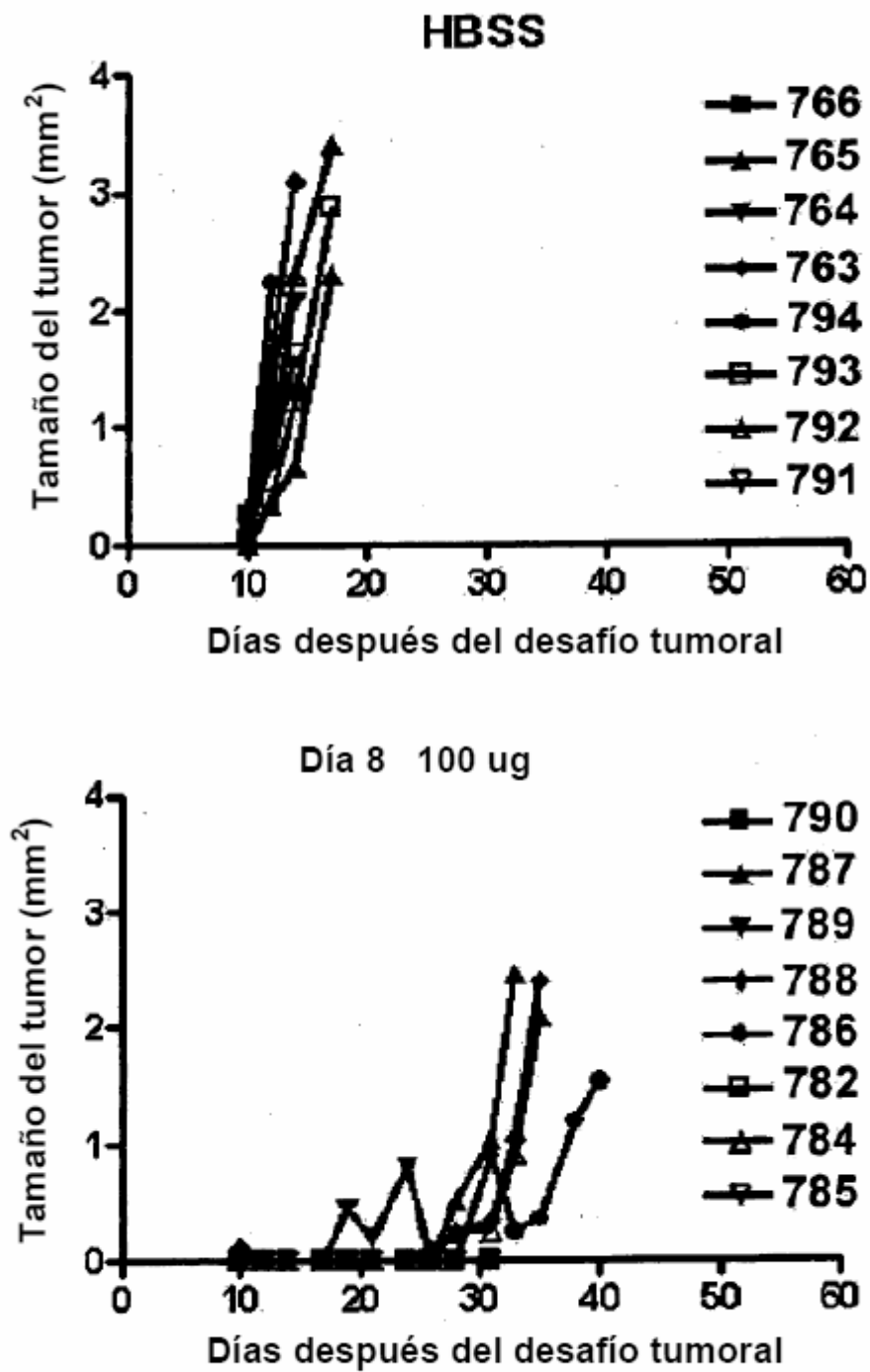


Fig. 25

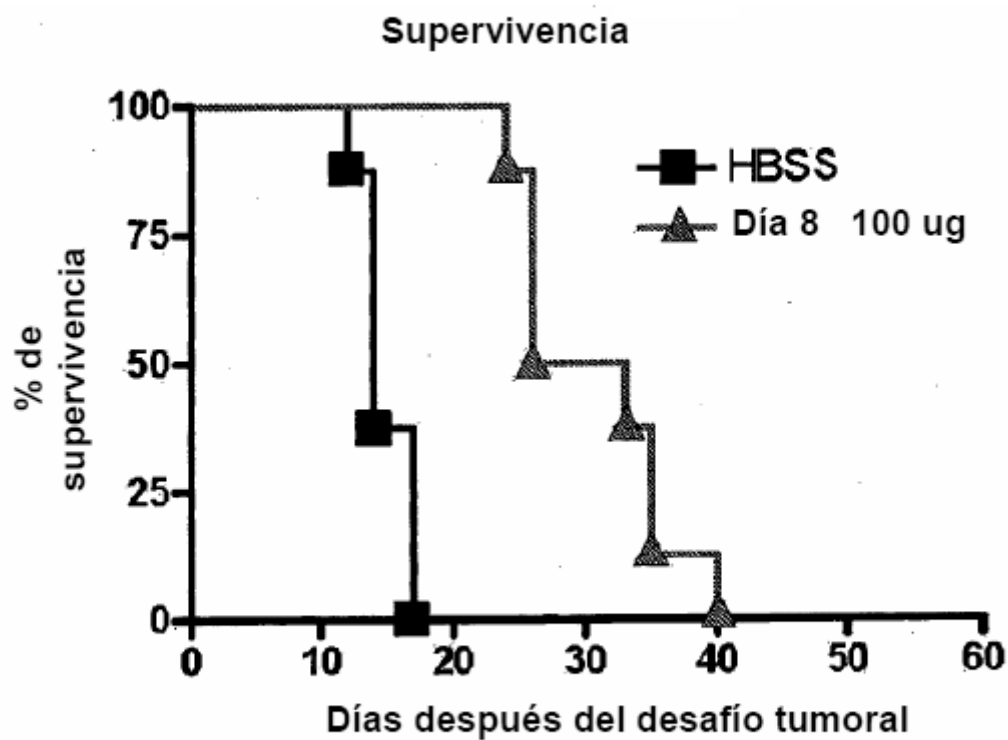


Fig. 26

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- | | | |
|----|---|--|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> • US 4474893 A [0018] • US 6365408 B [0043] • US 4659839 A [0049] [0050] | <ul style="list-style-type: none"> • US 4569789 A [0050] • US 4589071 A [0050] • US 4545985 A [0050] |
| 15 | <ul style="list-style-type: none"> • EP 188256 A [0050] • US 4671958 A [0050] • US 4414148 A [0050] • US 4699784 A [0050] | <ul style="list-style-type: none"> • US 4894443 A [0050] • US 4458066 A [0052] • US 08831632 B [0153] • US 60994717 B [0153] |
| 20 | <ul style="list-style-type: none"> • US 4680338 A [0050] | <ul style="list-style-type: none"> • US 2008077074 W [0153] |

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- | | | |
|----|--|---|
| 25 | <ul style="list-style-type: none"> • HROUDA et al. <i>Semin. Oncol.</i>, 1999, vol. 26, 455-471 [0001] • DISIS et al. <i>J. Clin. Oncol.</i>, 1997, vol. 15, 3363-3367 [0001] • DRANOFF ; MULLIGAN. <i>Adv. Immunol.</i>, 1995, vol. 58, 417-454 [0001] | <ul style="list-style-type: none"> • CRAGG et al. <i>Curr. Dir. Autoimmun.</i>, 2005, vol. 8, 140-174 [0022] • TOBI et al. <i>Cancer Detection and Prevention</i>, 1998, vol. 22 (2), 147-152 [0036] • DÉLOS et al. <i>Int J Cancer</i>, 1998, vol. 75 (6), 840-846 [0040] |
| 30 | <ul style="list-style-type: none"> • HURFORD et al. <i>Nat. Genet.</i>, 1995, vol. 10, 430-435 [0001] • BELARDELLI ; FERRANTINI. <i>Trends Immunol.</i>, 2002, vol. 23, 201-208 [0002] | <ul style="list-style-type: none"> • ESTEBAN et al. <i>Tumour Biol.</i>, 1996, vol. 7 (5), 299-305 [0040] • HARADA et al. <i>Tohoku J Exp Med.</i>, 1996, vol. 180 (3), 273-288 [0040] • DIHLMANN et al. <i>Oncol Res.</i>, 1997, vol. 9 (3), 119-127 [0040] |
| 35 | <ul style="list-style-type: none"> • SANTINI et al. <i>J. Exp. Med.</i>, 2000, vol. 191, 1777-1788 [0003] • THEOFILOPOULOS et al. <i>Annu. Rev. Immunol.</i>, 2005, vol. 23, 307-336 [0003] | <ul style="list-style-type: none"> • SORDAT et al. <i>J Exp Med.</i>, 1998, vol. 188 (6), 1185-1190 [0040] • BÖEL et al. <i>Immunity</i>, 1995, vol. 2, 167-175 [0040] • HUGH et al. <i>Int J Cancer</i>, 1999, vol. 82 (4), 504-11 [0040] |
| 40 | <ul style="list-style-type: none"> • FINKELMAN et al. <i>J. Exp. Med.</i>, 1991, vol. 174, 1179-1188 [0003] • TOUGH et al. <i>Science</i>, 1996, vol. 272, 1947-1950 [0003] • FERRANTINI et al. <i>J. Immunol.</i>, 1994, vol. 153, 4604-4615 [0004] | <ul style="list-style-type: none"> • VERFAILLIE et al. <i>Blood</i>, 1996, vol. 87 (11), 4770-4779 [0040] • BAST et al. <i>Int J Biol Markers</i>, 1998, vol. 13 (4), 179-187 [0040] • MANDRUZZATO et al. <i>J Exp Med.</i>, 1997, vol. 186 (5), 785-793 [0040] |
| 45 | <ul style="list-style-type: none"> • GUTTERMAN et al. <i>Ann. Intern. Med.</i>, 1980, vol. 93, 399-406 [0004] • TAKAOKA et al. <i>Nature</i>, 2003, vol. 424, 516-523 [0004] | <ul style="list-style-type: none"> • THOMSEN et al. <i>Clin Cancer Res.</i>, 1995, vol. 1 (7), 741-746 [0040] • SCHEUERMANN et al. <i>Leuk Lymphoma</i>, 1995, vol. 18 (5-6), 385-397 [0040] • KNOX et al. <i>Clin Cancer Res.</i>, 1996, vol. 2 (3), 457-470 [0040] |
| 50 | <ul style="list-style-type: none"> • SIDKY ; BORDEN. <i>Cancer Res.</i>, 1987, vol. 47, 5155-5161 [0004] • RODRIGUEZ-VILLANUEVA ; MCDONNELL. <i>Int. J. Cancer</i>, 1995, vol. 61, 110-11417 [0004] | <ul style="list-style-type: none"> • SHUBINSKY et al. <i>Leuk Lymphoma</i>, 1997, vol. 25 (5-6), 521-530 [0040] • FRENCH et al. <i>Br J Cancer</i>, 1995, vol. 71 (5), 986-994 [0040] • NAKASE et al. <i>Am J Clin Pathol.</i>, 1996, vol. 105 (6), 761-768 [0040] |
| 55 | <ul style="list-style-type: none"> • HUANG. <i>Dissertation</i>, 01 January 2006, 1-120 [0004] • Fundamental Immunology. Raven Press, 1993 [0017] | |
| 60 | <ul style="list-style-type: none"> • KRANZ et al. <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i>, 1981, vol. 78, 5807 [0018] • KABAT et al. Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Dept. Health and Human Services, 1987 [0019] | |
| 65 | | |

- YAMAKAWA et al. *Cancer*, vol. 73 (11), 2808-2817 [0040]
- 5 • NAOT et al. *Adv Cancer Res.*, 1997, vol. 71, 241-319 [0040]
- BUZZI et al. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52 (14), 4027-4035 [0040]
- 10 • YAMAKAWA et al. *Cancer*, 1994, vol. 73 (11), 2808-2817 [0040]
- STEIN et al. *Clin Exp Immunol.*, 1991, vol. 85 (3), 418-423 [0040]
- GINALDI et al. *Leuk Res.*, 1998, vol. 22 (2), 185-191 [0040]
- 15 • SPENDLOVE et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 2282-2286 [0040]
- JARVIS et al. *Int J Cancer*, 1997, vol. 71 (6), 1049-1055 [0040]
- 20 • WANG et al. *Science*, 1999, vol. 284 (5418), 1351-1354 [0040]
- WÖLFEL et al. *Science*, 1995, vol. 269 (5228), 1281-1284 [0040]
- 25 • KASS et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (3), 676-683 [0040]
- WATSON et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51 (15), 3996-4000 [0040]
- TSUJII et al. *Cell*, 1998, vol. 93, 705-716 [0040]
- 30 • GOTLEY et al. *Oncogene*, 1996, vol. 13 (4), 787-795 [0040]
- PITTI et al. *Nature*, 1998, vol. 396, 699-703 [0040]
- STELLER et al. *Cancer Res.*, 1996, vol. 56 (21), 5087-5091 [0040]
- 35 • YANG et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (6), 1236-1243 [0040]
- SHIINA et al. *Prostate*, 1996, vol. 29 (3), 169-176 [0040]
- 40 • ARENBERG et al. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 102, 465-472 [0040]
- DORKIN et al. *Oncogene*, 1999, vol. 18 (17), 2755-2761 [0040]
- 45 • ANNIE ; FONG. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 99-106 [0040]
- DIXON et al. *J Biol Chem.*, 1992, vol. 267 (33), 24140-72414 [0040]
- DIVGI et al. *Clin Cancer Res.*, 1998, vol. 4 (11), 2729-2739 [0040]
- 50 • DE BACKER et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (13), 3157-3165 [0040]
- WATSON et al. *Int J Cancer*, 1995, vol. 61 (2), 233-240 [0040]
- 55 • WANG et al. *Int J Cancer*, 1996, vol. 68 (4), 528-534 [0040]
- WIESNER ; SWEELEY. *Int J Cancer*, 1995, vol. 60 (3), 294-299 [0040]
- 60 • BAHK et al. *Urol Res.*, 1998, vol. 26 (4), 259-264 [0040]
- HENGSTLER et al. *Recent Results Cancer Res.*, 1998, vol. 154, 47-85 [0040]
- 65 • WAGNER et al. *Cancer Immunol Immunother.*, 1997, vol. 44 (4), 239-247 [0040]
- KIRKIN et al. *APMIS*, 1998, vol. 106 (7), 665-679 [0040]
- MAEURER et al. *Melanoma Res.*, 1996, vol. 6 (1), 11-24 [0040]
- LEWIS et al. *Semin Cancer Biol.*, 1995, vol. 6 (6), 321-327 [0040]
- HOERMANN et al. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52 (6), 1520-1524 [0040]
- VLODAVSKY et al. *Nat Med.*, 1999, vol. 5 (7), 793-802 [0040]
- LEWIS et al. *Semin Cancer Biol.*, 1995, vol. 6 (6), 321-327 [0040]
- KAHL et al. *Br J Cancer*, 1991, vol. 63 (4), 534-540 [0040]
- JAATTELA et al. *EMBO J.*, 1998, vol. 17 (21), 6124-6134 [0040]
- VONDERHEIDE et al. *Immunity*, 1999, vol. 10, 673-679 [0040]
- ELLIS et al. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, vol. 52, 175-184 [0040]
- MURATA et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1997, vol. 238 (1), 90-94 [0040]
- KLOTZ et al. *Cancer*, 1998, vol. 82 (10), 1897-1903 [0040]
- GERDES et al. *Int J Cancer*, 1983, vol. 31, 13-20 [0040]
- GUÉGUEN et al. *J Immunol.*, 1998, vol. 160 (12), 6188-6194 [0040]
- ABRAMS et al. *Semin Oncol.*, 1996, vol. 23 (1), 118-134 [0040]
- ZHANG et al. *Clin Cancer Res.*, 1998, vol. 4 (2), 295-302 [0040]
- CARUSO et al. *Oncol Rep.*, 1998, vol. 5 (4), 927-930 [0040]
- MARCHAND et al. *Int J Cancer*, 1999, vol. 80 (2), 219-230 [0040]
- WATSON et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59 (13), 3028-3031 [0040]
- KOCHER et al. *Am J Pathol.*, 1996, vol. 149 (2), 493-500 [0040]
- LEWIS ; HOUGHTON. *Semin Cancer Biol.*, 1995, vol. 6 (6), 321-327 [0040]
- CHANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, vol. 93 (1), 136-140 [0040]
- GROH et al. *Science*, 1998, vol. 279, 1737-1740 [0040]
- SATO ; SEIKI. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, vol. 119 (2), 209-215 [0040]
- CANDIA et al. *Development*, 1992, vol. 116 (4), 1123-1136 [0040]
- JAGER et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, 265-270 [0040]
- GRAHAM et al. *Eur J Cancer*, 1997, vol. 33 (10), 1654-1660 [0040]
- YOSHIDA et al. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55 (13), 2756-2760 [0040]
- TROCK et al. *J Natl Cancer Inst.*, 1997, vol. 89 (13), 917-931 [0040]

- ROTH et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1996, vol. 93 (10), 4781-4786 [0040]
- 5 • FURUKAWA et al. *J Exp Med.*, 1989, vol. 169 (2), 585-590 [0040]
- GRONDAHL-HANSEN et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53 (11), 2513-2521 [0040]
- 10 • VASSBOTN et al. *Mol Cell Biol.*, 1993, vol. 13 (7), 4066-4076 [0040]
- NAITOH et al. *Jpn J Cancer Res.*, 1995, vol. 86 (1), 48-56 [0040]
- 15 • MATUO et al. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1985, vol. 130 (1), 293-300 [0040]
- SANDA et al. *Urology*, 1999, vol. 53 (2), 260-266 [0040]
- 20 • KAWAKAMI et al. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57 (12), 2321-2324 [0040]
- GAUGLER et al. *Immunogenetics*, 1996, vol. 44 (5), 323-330 [0040]
- DOSAKA-AKITA et al. *Cancer*, 1997, vol. 79 (7), 1329-1337 [0040]
- 25 • SONODA et al. *Cancer*, 1996, vol. 77 (8), 1501-1509 [0040]
- KIKUCHI et al. *Int J Cancer*, 1999, vol. 81 (3), 459-466 [0040]
- 30 • GURE et al. *Int J Cancer*, 1997, vol. 72 (6), 965-971 [0040]
- BROMBERG et al. *Cell*, 1999, vol. 98 (3), 295-303 [0040]
- 35 • SANDMAIER et al. *J Immunother.*, 1999, vol. 22 (1), 54-66 [0040]
- KUROKI et al. *Cancer Res.*, 1990, vol. 50 (16), 4872-4879 [0040]
- 40 • IMANISHI et al. *Br J Cancer*, 1989, vol. 59 (5), 761-765 [0040]
- PICON et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 1998, vol. 7 (6), 497-504 [0040]
- 45 • BAO et al. *Nature Medicine*, 1996, vol. 2 (12), 1322-1328 [0040]
- MORADI et al. *Cancer*, 1993, vol. 72 (8), 2433-2440 [0040]
- MAULARD et al. *Cancer*, 1994, vol. 73 (2), 394-398 [0040]
- 50 • NISHIDA et al. *Cancer Res*, 1984, vol. 44 (8), 3324-9 [0040]
- PARKHURST et al. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58 (21), 4895-4901 [0040]
- 55 • HYODO et al. *Eur J Cancer*, 1998, vol. 34 (13), 2041-2045 [0040]
- SANCHEZ et al. *Science*, 1999, vol. 283 (5409), 1914-1919 [0040]
- 60 • QUELLE et al. *Oncogene*, 17 August 1995, vol. 11 (4), 635-645 [0040]
- BORLINGHAUS et al. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 4071-4075 [0050]
- 65 • Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet. THORPE et al. *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*. Academic Press, 1982, 168-190 [0050]
- WALDMANN. *Science*, 1991, vol. 252, 1657 [0050]
- NARANG et al. *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 90-99 [0052]
- BROWN et al. *Meth. Enzymol.*, 1979, vol. 68, 109-151 [0052]
- BEAUCAGE et al. *Tetra. Lett.*, 1981, vol. 22, 1859-1862 [0052]
- R. SCOPES. *Protein Purification*. Springer-Verlag, 1982 [0059]
- DEUTSCHER. *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*. Academic Press, Inc, 1990 [0059]
- DEBINSKI et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 14065-14070 [0060]
- KREITMAN ; PASTAN. *Bioconjug. Chem.*, 1993, vol. 4, 581-585 [0060]
- BUCHNER et al. *Anal. Biochem.*, 1992, vol. 205, 263-270 [0060]
- MARCH. *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*. Wiley-Interscience, 1992 [0069]
- TRACY. *Biotechnol. Prog.*, 1998, vol. 14, 108 [0081]
- JOHNSON et al. *Nature Med*, 1996, vol. 2, 795 [0081]
- HERBERT et al. *Pharmaceut. Res.*, 1998, vol. 15, 357 [0081]
- DISIS, M. L. ; S. M. PUPA ; J. R. GRALOW ; R. DITTADI ; S. MENARD ; M. A. CHEEVER. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1997, vol. 15, 3363-3367 [0127]
- DRANOFF, G. ; R. C. MULLIGAN. Gene transfer as cancer therapy. *Adv. Immunol.*, 1995, vol. 58, 417-454 [0127]
- HROUDA, D. ; M. PERRY ; A. G. DALGLEISH. Gene therapy for prostate cancer. *Semin. Oncol.*, 1999, vol. 26, 455-471 [0127]
- HURFORD, R. K., JR. ; G. DRANOFF ; R. C. MULLIGAN ; R. I. TEPPER. Gene therapy of metastatic cancer by in vivo retroviral gene targeting. *Nat. Genet.*, 1995, vol. 10, 430-435 [0127]
- PENG, L. S. ; M. L. PENICHET ; S. L. MORRISON. A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, 250-258 [0127]
- DELA CRUZ, J. S. ; K. R. TRINH ; S. L. MORRISON ; M. L. PENICHET. Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, 5112-5121 [0127]

- OSENGA, K. L. ; J. A. HANK ; M. R. ALBERTINI ; J. GAN ; A. G. STERNBERG ; J. EICKHOFF ; R. C. SEEGER ; K. K. MATTHAY ; C. P. REYNOLDS ; C. TWIST et al. A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin. Cancer Res.*, 2006, vol. 12, 1750-1759 [0127]
- BELARDELLI, F. ; M. FERRANTINI. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol.*, 2002, vol. 23, 201-208 [0127]
- SANTINI, S. M. ; C. LAPENTA ; M. LOGOZZI ; S. PARLATO ; M. SPADA ; T. DI PUCCHIO ; F. BELARDELLI. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, 1777-1788 [0127]
- THEOFILOPOULOS, A. N. ; R. BACCALA ; B. BEUTLER ; D. H. KONO. Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 23, 307-336 [0127]
- FINKELMAN, F. D. ; A. SVETIC ; I. GRESSER ; C. SNAPPER ; J. HOLMES ; P. P. TROTTA ; I. M. KATONA ; W. C. GAUSE. Regulation by interferon γ of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 174, 1179-1188 [0127]
- TOUGH, D. F. ; P. BORROW ; J. SPRENT. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*, 1996, vol. 272, 1947-1950 [0127]
- FERRANTINI, M. ; M. GIOVARELLI ; A. MODESTI ; P. MUSIANI ; A. MODICA ; M. VENDITTI ; E. PERETTI ; P. L. LOLLINI ; P. NANNI ; G. FORNI et al. IFN- α gene expression into a metastatic murine adenocarcinoma (TS/A) results in CD8 $^{+}$ T cell-mediated tumor rejection and development of antitumor immunity: comparative studies with IFN- α -producing TS/A cells. *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 4604-4615 [0127]
- GUTTERMAN, J. U. ; G. R. BLUMENSCHNIG ; R. ALEXANIAN ; H. Y. YAP ; A. U. BUZDAR ; F. CABANILLAS ; G. N. HORTOBAGYI ; E. M. HERSH ; S. L. RASMUSSEN ; M. HARMON et al. Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma. *Ann. Intern. Med.*, 1980, vol. 93, 399-406 [0127]
- TAKAOKA, A. ; S. HAYAKAWA ; H. YANAI ; D. STOIBER ; H. NEGISHI ; H. KIKUCHI ; S. SASAKI ; K. IMAI ; T. SHIBUE ; K. HONDA. Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*, 2003, vol. 424, 516-523 [0127]
- SIDKY, Y. A. ; E. C. BORDEN. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, 5155-5161 [0127]
- RODRIGUEZ-VILLANUEVA, J. ; T. J. MCDONNELL. Induction of apoptotic cell death in non-melanoma skin cancer by interferon. *Int. J. Cancer*, 1995, vol. 61, 110-114 [0127]
- AKIYAMA, T. ; C. SUDO ; H. OGAWARA ; K. TOYOSHIMA ; T. YAMAMOTO. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986, vol. 232, 1644-1646 [0127]
- BASELGA, J. ; D. TRIPATHY ; J. MENDELSON ; S. BAUGHMAN ; C. C. BENZ ; L. DANTIS ; N. T. SKLARIN ; A. D. SEIDMAN ; C. A. HUDIS ; J. MOORE et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0127]
- SCHIER, R. ; A. MCCALL ; G. P. ADAMS ; K. W. MARSHALL ; H. MERRITT ; M. YIM ; R. S. CRAWFORD ; L. M. WEINER ; C. MARKS ; J. D. MARKS. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 263, 551-567 [0127]
- REID, T. R. ; E. R. RACE ; B. H. WOLFF ; R. M. FRIEDMAN ; T. C. MERIGAN ; T. Y. BASHAM. Enhanced in vivo therapeutic response to interferon in mice with an in vitro interferon-resistant B-cell lymphoma. *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, 4163-4169 [0127]
- COLOMA, M. J. ; A. HASTINGS ; L. A. WIMS ; S. L. MORRISON. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J. Immunol. Methods*, 1992, vol. 152, 89-104 [0127]
- HUANG, T. H. ; S. L. MORRISON. A trimeric anti-HER2/neu ScFv and TNF- α fusion protein induces HER2/neu signaling and facilitates repair of injured epithelia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, vol. 316, 983-991 [0127]
- CARLSSON, G. ; B. GULLBERG ; L. HAFSTROM. Estimation of liver tumor volume using different formulas: an experimental study in rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1983, vol. 105, 20-23 [0127]
- RAMSDEN, L. ; C. C. RIDER. Selective and differential binding of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 to glycosaminoglycans. *Eur. J. Immunol.*, 1992, vol. 22, 3027-3031 [0127]
- FERNANDEZ-BOTRAN, R. ; J. YAN ; D. E. JUSTUS. Binding of interferon α by glycosaminoglycans: a strategy for localization and/or inhibition of its activity. *Cytokine*, 1999, vol. 11, 313-325 [0127]
- BASHAM, T. Y. ; M. S. KAMINSKI ; K. KITAMURA ; R. LEVY ; T. C. MERIGAN. Synergistic antitumor effect of interferon and anti-idiotypic monoclonal antibody in murine lymphoma. *J. Immunol.*, 1986, vol. 137, 3019-3024 [0127]

- BASHAM, T. Y. ; E. R. RACE ; M. J. CAMPBELL ; T. R. REID ; R. LEVY ; T. C. MERIGAN. Synergistic antitumor activity with IFN and monoclonal anti-idiotypic for murine B cell lymphoma. Mechanism of action. *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 2855-2860 [0127]
- BAILON, P. ; A. PALLERONI ; C. A. SCHAFER ; C. L. SPENCE ; W. J. FUNG ; J. E. PORTER ; G. K. EHRLICH ; W. PAN ; Z. X. XU ; M. W. MODI et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycolconjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chem.*, 2001, vol. 12, 195-202 [0127]
- KOOPMAN, G. ; C. P. REUTELINGSPERGER ; G. A. KUIJTEN ; R. M. KEEHNEN ; S. T. PALS ; M. H. VAN OERS. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994, vol. 84, 1415-1420 [0127]
- TIEFENBRUN, N. ; D. MELAMED ; N. LEVY ; D. RESNITZKY ; I. HOFFMAN ; S. I. REED ; A. KIMCHI. Interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, 3934-3944 [0127]
- MERAZ, M. A. ; J. M. WHITE ; K. C. SHEEHAN ; E. A. BACH ; S. J. RODIG ; A. S. DIGHE ; D. H. KAPLAN ; J. K. RILEY ; A. C. GREENLUND ; D. CAMPBELL et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 1996, vol. 84, 431-442 [0127]
- OKEN, M. M. New agents for the treatment of multiple myeloma and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 1992, vol. 70, 946-948 [0127]
- LIU, S. J. ; Y. P. SHER ; C. C. TING ; K. W. LIAO ; C. P. YU ; M. H. TAO. Treatment of B-cell lymphoma with chimeric IgG and single-chain Fv antibodyinterleukin-2 fusion proteins. *Blood*, 1998, vol. 92, 2103-2112 [0127]
- TAO, M. H. ; R. LEVY. Idiotypic/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature*, 1993, vol. 362, 755-758 [0127]
- HUANG, T. H. ; P. Y. WU ; C. N. LEE ; H. I. HUANG ; S. L. HSIEH ; J. KUNG ; M. H. TAO. Enhanced antitumor immunity by fusion of CTLA-4 to a self tumor antigen. *Blood*, 2000, vol. 96, 3663-3670 [0127]
- HUANG, H. I. ; P. Y. WU ; C. Y. TEO ; M. N. CHEN ; Y. C. CHEN ; D. SILIN ; M. H. TAO. Improved immunogenicity of a self tumor antigen by covalent linkage to CD40 ligand. *Int. J. Cancer*, 2004, vol. 108, 696-703 [0127]
- GASTL, G. ; H. DENZ ; C. ABBREDEDERIS ; H. HUBER ; J. TROPPEMAIR ; J. WIEGELE ; D. NIEDERWIESER ; R. FLENER ; C. HUBER. Treatment with low dose human recombinant interferon- γ -2-ARG induces complete remission in patients with hairy cell leukemia. *Onkologie*, 1985, vol. 8, 143-144 [0127]
- ATZPODIEN, J. ; H. POLIWODA ; H. KIRCHNER. Interferon and interleukin-2 in renal cell carcinoma: studies in nonhospitalized patients. *Semin Oncol.*, 1991, vol. 18, 108-112 [0127]
- KROWN, S. E. ; J. PAREDES ; D. BUNDOW ; B. POLSKY ; J. W. GOLD ; N. FLOMENBERG. Interferon- γ , zidovudine, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a phase I AIDS clinical trials group study in patients with Kaposi's sarcoma associated with AIDS. *J. Clin. Oncol.*, 1992, vol. 10, 1344-1351 [0127]
- RATH, P. C. ; B. B. AGGARWAL. Antiproliferative effects of IFN- α correlate with the downregulation of nuclear factor- κ B in human Burkitt lymphoma Daudi cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2001, vol. 21, 523-528 [0127]
- YANASE, N. ; K. OHSHIMA ; H. IKEGAMI ; J. MIZUGUCHI. Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax- α cleavage during IFN- α -induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2000, vol. 20, 1121-1129 [0127]
- OSHIMA, K. ; N. YANASE ; C. IBUKIYAMA ; A. YAMASHINA ; N. KAYAGAKI ; H. YAGITA ; J. MIZUGUCHI. Involvement of TRAIL/TRAIL-R interaction in IFN- α -induced apoptosis of Daudi B lymphoma cells. *Cytokine*, 2001, vol. 14, 193-201 [0127]
- RILEY, J. K. ; M. X. SLIWKOWSKI. CD20: a gene in search of a function. *Semin. Oncol.*, 2000, vol. 27, 17-24 [0127]
- MCLAUGHLIN, P. ; A. J. GRILLO-LOPEZ ; B. K. LINK ; R. LEVY ; M. S. CZUCZMAN ; M. E. WILLIAMS ; M. R. HEYMAN ; I. BENICE-BRUCKLER ; C. A. WHITE ; F. CABANILLAS et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.*, 1998, vol. 16, 2825-2833 [0127]
- SIVARAMAN, S. ; P. VENUGOPAL ; R. RANGANATHAN ; C. G. DESHPANDE ; X. HUANG ; A. JAJEH ; S. A. GREGORY ; T. O'BRIEN ; H. D. PREISLER. Effect of interferon- α on CD20 antigen expression of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytokines Cell Mol. Ther.*, 2000, vol. 6, 81-87 [0127]