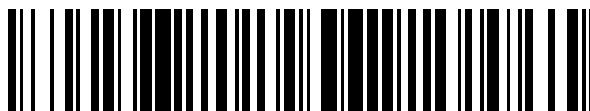


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 938**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 39/165 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008** **E 08805222 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015** **EP 2203183**

54 Título: **Medicamentos y métodos para el tratamiento de mesotelioma**

30 Prioridad:

10.10.2007 EP 07291232

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

13.11.2015

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (50.0%)
28, Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

GAUVRIT, ANNE;
TANGY, FRÉDÉRIC y
GREGOIRE, MARC

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 550 938 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

Medicamentos y métodos para el tratamiento de mesotelioma

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a métodos para preparar células dendríticas vacunales destinadas al tratamiento de mesotelioma maligno.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Los mesoteliomas malignos (MM) son neoplasmas relativamente raros y altamente agresivos, que surgen de la proliferación descontrolada de células mesoteliales que revisten cavidades serosas, más comúnmente la pleura (Mesotelioma Pleural Maligno o MPM) (Robinson y col. (2005) Lancet 366: 397-408). Los estudios epidemiológicos han establecido que la exposición a amianto es uno de los factores etiológicos MPM más importantes en los países industrializados (Gruber (2005), Lung Cancer 49S1: S21-S23; Bartrip (2004) Postgrad Med. J. 80: 72-76). Aunque el uso mundial de amianto se ha reducido considerablemente, se espera que la incidencia de mesotelioma aumente en las siguientes dos décadas, debido a un largo periodo de latencia (de 20 a 40 años) entre el tiempo de exposición a amianto y la aparición de síntomas clínicos.

[0003] Hoy en día, el diagnóstico de cáncer se establece generalmente en una etapa avanzada debido a la ausencia de síntomas manifiestos en el período temprano de la enfermedad, lo que hace deficiente el pronóstico para los pacientes de mesotelioma. En consecuencia, el MPM es considerado realmente como un cáncer relativamente refractario a todas las modalidades de tratamiento convencional. Por consiguiente, hay una necesidad imperiosa del desarrollo de un nuevo enfoque terapéutico.

[0004] El desarrollo pasado y reciente en la inmunoterapia del MPM se ha revisado por Grégoire y Ebstein (2007) Bull Cancer 94(1): 23-31.

[0005] Un enfoque terapéutico reciente describe el uso de células dendríticas cargadas con células que expresan proteínas de choque térmico apoptóticas de 70 para inducir la actividad de los linfocitos T citotóxicos frente a las células de mesotelioma (Ebstein y col. (2004) Am J Respir Crit Care Med 169: 1322-1330).

[0006] Durante la última década, ha habido un creciente interés en la viroterapia, en parte relacionado con el conocimiento creciente en la producción de vectores víricos recombinantes para terapia génica humana. Ahora se consideran numerosos virus de replicación de ARN agentes terapéuticos del cáncer potenciales. Como tal, se ha propuesto la terapia del MPM usando virus del Herpes Simple (VHS) competentes para replicación creados mediante técnicas de ingeniería, basado en estudios *in vitro* y los resultados obtenidos en un modelo murino de MPM (Adusumilli y col. (2006) J. Gene Med. 8: 603-615). Sin embargo, la seguridad a largo plazo de estos vectores víricos creados mediante técnicas de ingeniería en seres humanos no se conoce y serán necesarios extensos estudios clínicos para documentar este aspecto del uso de VHS.

[0007] Por consiguiente, existe la necesidad de vectores víricos con una seguridad reconocida susceptible de usarse en el marco del tratamiento de mesotelioma.

[0008] El VS (Virus del Sarampión) es un virus de ARN monocatenario negativo con envoltura que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, género de los virus *Morbilli*. Se han desarrollado diversas cepas atenuadas vivas competentes para replicación de VS para producir vacunas contra el sarampión. A modo de ejemplo, Schwartz, Moraten o Zagreb (que se obtienen a partir de muestras del VS aisladas de un paciente Edmonston) son cepas de vacunas del VS seguras y bien documentadas.

[0009] Se ha demostrado recientemente que la administración *in vivo* de una cepa del VS Edmonston competente para replicación dio como resultado una ralentización de crecimiento o a veces la regresión de tumores establecidos en modelos animales de linfoma y cáncer de mieloma (Grote y col. (2001) Blood 97: 3746-3754; Peng y col. (2001) Blood 98: 2002-2007). Además, Anderson y col. (2004) Cancer Res. 64: 4919-4926, han demostrado en experimentos *in vitro* que fue necesaria una alta expresión de CD46 por las células tumorales para la infección y eliminación de estas células por una cepa del VS Edmonston atenuada viva. Sin embargo, se sabe que CD46 se expresa de forma variable por carcinomas humanos (Niehans y col. (1996) American J. Pathol. 149: 129-142), cuestionando así la aplicabilidad general de cepas del VS atenuadas vivas para tratar cánceres.

[0010] También se ha descrito previamente el uso de un virus del sarampión atenuado para tratar cánceres distintos de mesotelioma maligno, tal como en Peng y col. (2002) Cancer Research 62: 4656-4662, que describe que un virus del sarampión atenuado recombinante creado por ingeniería genética para expresar un péptido marcador soluble e inerte, es decir, el dominio extracelular de un antígeno carcinoembrionario humano, es potente contra células de cáncer de ovario humano, o en el documento WO02/23994, que describe el uso de virus del sarampión atenuado para tratar linfoma, mieloma, melanoma, glioma y carcinoma de mama.

[0011] Aldjahdhami y col. (Poster contribution TP112 at Thoracic Society of Australia and New Zealand Annual Spring Meeting 2007, Respiratory 12, S1) también describen la infección de las células de mesotelioma con vectores del virus del sarampión que contienen un transgen que es el gen indicador luciferasa o GFP, o el antígeno tumoral CEA o NIS. Este documento también menciona que todas las células de mesotelioma expresan el receptor del virus del sarampión CD46 y que los vectores del virus del sarampión pueden tener una utilidad más amplia que los adenovirus. Especificó adicionalmente que las líneas celulares mostraban las características de la formación de sincitios después de la infección junto con la expresión transgénica apropiada, y que son susceptibles a la eliminación celular.

[0012] Hegmans y col. (2005, Cancer Research, 171: 1168-1177) desvelan un método para preparar células dendríticas vacunales para el tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo que comprende las etapas de preparación de subtipos dendríticos obtenidos de médula ósea, carga con antígenos tumorales e inducción de la maduración.

[0013] La invención se define por las reivindicaciones.

25 Resumen de la invención

[0014] La presente invención surge del hallazgo inesperado, por los presentes inventores, de que el virus atenuado del sarampión podría infectar y matar eficientemente de las células de mesotelioma. Además, los presentes inventores han demostrado que las células dendríticas en contacto con el lisado de células de mesotelioma infectadas con el virus del sarampión atenuado podrían activar los linfocitos T CD8 anti-mesotelioma.

[0015] Por lo tanto, la presente memoria descriptiva se refiere a un virus atenuado del sarampión para su uso en el tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo.

[0016] La presente memoria descriptiva describe el uso de al menos un virus atenuado del sarampión para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo.

[0017] La memoria descriptiva también describe un método para el tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo, donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un virus atenuado del sarampión a dicho individuo.

[0018] La presente invención se refiere adicionalmente a un método para preparar células dendríticas vacunales destinadas al tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo, que comprende las siguientes etapas:

- 45 - infección *in vitro* de células de mesotelioma maligno, tomadas del individuo por una cepa de sarampión atenuada para producir un lisado celular;
- poner en contacto células dendríticas con el lisado celular para producir células dendríticas vacunales.

[0019] La presente invención también se refiere a células dendríticas vacunales que pueden obtenerse por el método de preparación que se ha definido anteriormente y definido por las reivindicaciones, a una composición farmacéutica que comprende dichas células dendríticas vacunales como principio activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, a dichas células dendríticas vacunales para su uso en el tratamiento del mesotelioma maligno en un individuo. La memoria descriptiva también describe el uso de dichas células dendríticas vacunales, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer en un individuo.

[0020] La memoria descriptiva describe adicionalmente un método para el tratamiento del cáncer en un individuo, donde una cantidad terapéuticamente eficaz de células dendríticas vacunales susceptibles de obtenerse por el método de preparación que se ha definido anteriormente se administran a dicho individuo.

Descripción detallada de la invención

[0021] Como se prevé en el presente documento, el individuo es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Preferiblemente además, el individuo ha estado expuesto a amianto.

[0022] Como se prevé en el presente documento, la expresión "virus del sarampión atenuado" designa cualquier virus obtenido a partir de un virus causante del sarampión y que presenta una virulencia reducida con respecto a dicho virus causante del sarampión. Como se prevé en el presente documento, el virus atenuado del sarampión puede obtenerse a partir del virus causante del sarampión mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica, tal como pases seriados en células cultivadas y/o ingeniería genética. En particular, el virus atenuado del sarampión puede ser un virus recombinante, expresando opcionalmente genes adicionales. Más particularmente, el virus atenuado del sarampión puede ser un virus del sarampión en el que la expresión de una o más proteínas, preferiblemente la proteína C accesoria, se elimina. Se prefiere que el virus atenuado del sarampión no cause básicamente ningún síntoma del sarampión cuando se administra a un ser humano. Además, el virus atenuado del sarampión está preferiblemente vivo y es competente para replicación.

[0023] Preferiblemente, el virus atenuado del sarampión es una cepa Edmonston. Las cepas Edmonston del virus atenuado del sarampión se conocen bien por un experto en la técnica y se describen particularmente en Griffin (2001) Field's Virology 4^a Edición vol. 2 Knipe y Howley (ed.) Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1401-1441; Hilleman (2002) Vaccine 20: 651-665). Más preferiblemente, el virus atenuado del sarampión se selecciona entre el grupo que consiste en una cepa Schwartz y una cepa Moraten. Estas cepas, cuyos genomas han demostrado ser idénticos, se conocen bien por el experto en la técnica y se usan ampliamente para la producción de vacunas contra el sarampión. Se describen en particular en Schwarz (1962) Am. J. Dis. Child 103: 216-219; Parks y col. (2001) J. Virol. 75: 921-933 y Parks y col. (2001) J. Virol., 75: 910-920. Mucho más preferiblemente, el virus atenuado del sarampión se produce a partir del plásmido pTM-MV Schw (SEQ ID NO: 1) descrito por Combredet y col. (2003) J. Virol. 77: 11546-11554.

[0024] Los mesoteliomas malignos a tratar dentro del marco de la presente invención son preferiblemente mesoteliomas pleurales malignos. Dichos cánceres se describen en particular en Kazan-Allen (2005) Lung cancer 49S1: S3-S8 y Robinson y col. (2005) Lancet 366: 397-408.

[0025] Cuando el virus atenuado del sarampión se administra a un individuo, puede administrarse a través de la cavidad intrapleural o por vía intranasal, intramuscular, intravenosa o subcutánea. Cuando el virus atenuado del sarampión se administra a través de la cavidad intrapleural, se administra preferiblemente en la proximidad cercana o directamente en los tumores a tratar. Si es necesario, el virus atenuado del sarampión puede estar asociado a cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. La cantidad terapéuticamente eficaz del virus atenuado del sarampión que se va a administrar está preferiblemente en el intervalo de 10^3 a 10^6 de dosis infecciosas de cultivo tisular al 50 % (TCID₅₀). La determinación de la TCID₅₀ se conoce bien por un experto en la técnica y se describe en particular por Karber (1931) Arch. Exp. Path. Pharmac. 162: 840-483.

[0026] La etapa de tomar las células de mesotelioma maligno del individuo que se va a tratar mediante las células dendríticas vacunales no se incluye en el método de preparación que se ha definido anteriormente de células dendríticas vacunales. Esta etapa puede proceder de acuerdo con cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para recoger células, tales como biopsias y efusiones (por ejemplo, efusiones pleurales). Después de tomarse, las células de mesotelioma maligno pueden mantenerse en cultivo de acuerdo con técnicas convencionales, o congelarse (por ejemplo, a -80 °C) para su conservación, por ejemplo. Cuando las células de mesotelioma maligno no proceden del individuo a tratar por las células dendríticas vacunales, pueden obtenerse en particular a partir de líneas celulares alogénicas de mesotelioma humano.

[0027] En el método de preparación que se ha definido anteriormente, la infección de las células de mesotelioma maligno por el virus atenuado del sarampión puede proceder poniendo en contacto directamente las células y el virus, por ejemplo en una Multiplicidad de Infección (MOI) de 1, con una incubación de 2 horas a 37 °C. Después de la infección, la muerte de las células infectadas procede espontáneamente debido a la acción del virus. Un sincitio se forma normalmente en primer lugar seguido de la lisis de las células. Este fenómeno puede probarse mediante la observación microscópica directa de las células infectadas. Como se prevé en el presente documento, "lisado celular" incluye tanto el lisado celular en su totalidad (o total), como fracciones del lisado celular, tal como fracciones de membrana (por ejemplo, cuerpos de inclusión citoplásmicos o apocuerpos). Como se entenderá bien por los expertos en la técnica, el lisado celular obtenido en la primera etapa del método de preparación que se ha definido anteriormente corresponde a un lisado celular de mesotelioma maligno infectado por el virus.

[0028] Las células dendríticas pueden obtenerse por varias maneras bien conocidas por el experto en la técnica. Las células dendríticas proceden preferiblemente del individuo que se va a tratar. Actualmente se prefiere que las células dendríticas sean células dendríticas obtenidas de monocitos. La obtención de células obtenidas a partir de monocitos se conoce particularmente bien por un experto en la técnica. Preferiblemente, las células derivadas de monocitos pueden obtenerse siguiendo la metodología general descrita en el **Ejemplo 4** o por Spisek y col. (2001) Cancer Immunology Immunotherapy 50: 417-427, o por Royer y col. (2006) Scand. J. Immunol. 63: 401-409. Cuando las células dendríticas obtenidas de monocitos proceden del individuo que se va a tratar, los monocitos pueden obtenerse a partir de la leucoféresis de dicho individuo.

[0029] Como será evidente para un experto en la técnica, el contacto de las células dendríticas y del lisado celular debe mantenerse durante un tiempo diferente para permitir una carga eficaz de las células dendríticas por los antígenos presentes en el lisado celular. Una vez cargadas (o pulsadas), se obtienen las células dendríticas vacunales de acuerdo con la invención. La carga puede proceder siguiendo la metodología general descrita en el **Ejemplo 4**. Un periodo de contacto ejemplar entre las células dendríticas y el lisado celular suficiente para permitir una carga eficiente de las células dendríticas es de aproximadamente 24 horas. En particular, el periodo de contacto puede mantenerse hasta que las células dendríticas estén en un estado activado. El estado activado se alcanza normalmente después de que las células dendríticas se hayan cargado. El estado activado (o estado maduro) de las células dendríticas puede probarse mediante numerosos marcadores bien conocidos por un experto en la técnica, tal como marcadores de membrana o de citocina. Dichos marcadores de las células dendríticas activadas se enumeran en particular en el **Ejemplo 5**.

[0030] Por lo tanto, las células dendríticas vacunales que pueden obtenerse de acuerdo con el método de preparación de la invención son particularmente ventajosas ya que son estimuladores potentes de linfocitos T CD8 anti-cancerosos. Igualmente ventajoso, el método de preparación de acuerdo con la invención permite la preparación de células dendríticas vacunales en un estado activado.

Breve descripción de las figuras

[0031]

Figuras 1, 2, 3, 4 y 5: Susceptibilidad del mesotelioma al virus atenuado del sarampión (VS).

Figura 1 - Actividad oncolítica selectiva de la cepa de vacuna del VS Schwarz. Un panel de líneas celulares de mesotelioma epitelioides humano (M11, M13, M47, M56 y M61) y una línea celular mesotelial normal inmortalizada (Met5A) se infectar con un VS no recombinante (MOI 1.0) y se realizaron observaciones de la morfología de los cultivos infectados 72 horas más tarde.

Figuras 2-3 - Nivel de expresión superficial mayor de los receptores CD46 para células tumorales en comparación con sus equivalentes normales. Las células se tiñeron con anticuerpos específicos de CD46 conjugados con FITC (histograma de color gris) o control Ig del isotipo relacionado (histograma de color blanco) (figura 2). Los números indican el índice de fluorescencia media y el histograma muestra los valores medios de expresión de CD46 obtenidos para líneas celulares mesoteliales (barra de color blanco) y de mesotelioma (barra tramada) (figura 3).

Figuras 4-5 - La cepa de vacuna del VS Schwarz infecta preferiblemente células tumorales transformadas. Números equivalentes de células M13 y Met5A se cultivaron por separado (figura 4) o se cultivaron conjuntamente (figura 5) durante una noche, permitiendo la adherencia celular, y la infección se hizo a MOI de 1,0 con el VS eGFP-recombinante. En cultivos separados, el análisis de la expresión de eGFP se realizó en diferentes momentos tras la infección (24, 48 y 72 horas) por citometría de flujo (figura 4). En el modelo de cultivo conjunto, se realizó el mismo experimento junto con tinción por HLA-A2, ya que la expresión diferencial de los alelos HLA permitió la distinción entre dos líneas celulares. El histograma muestra el % de células eGFP-positivas para las células Met5A (barra de color blanco) y M13 (barra de color negro) del cultivo conjunto (figura 5).

Figura 6: Inmunogenicidad de línea celular de mesotelioma infectado por VS.

Figura 6 - Muerte celular inducida por tratamientos con VS y UV. Análisis de citometría de flujo de la apoptosis de células tumorales M13 desencadenada por exposición UV (5 kJ/cm²) o infección por VS (MOI = 1,0) en los puntos de tiempo indicados (D1 = 24 h, D2 = 48 h, D3 = 72 h, y D4 = 96 h) (barras tramadas) frente a células de control no tratadas (barras de color blanco).

Figuras 7 y 8: Fagocitosis de apocuerpos por CD derivadas de monocitos.

Figura 7 - Se marcaron células tumorales M13 tratadas por UV o VS con PKH-26 y se cultivaron conjuntamente con CD inmaduras durante 24 horas. Las CD cosechadas se tiñeron posteriormente con anticuerpos anti HLA DR

conjugados con FITC y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres con resultados similares. El número de DC dobles positivas, que es el porcentaje de CD positivadas para PKH-26 separadas basándose en la expresión de HLA-DR (anticuerpos conjugados con FITC, clon B8.12.2, Immunotech), indica la eficiencia de la fagocitosis de células apoptóticas.

- 5 Figura 8 - El histograma representa valores medios del rendimiento de la fagocitosis obtenidos para cada condición de carga ensayada.

Figuras 9, 10 y 11: Maduración de CD inducida por cultivo conjunto con células de mesotelioma infectadas por VS.

- 10 Figuras 9 y 10 - Se cultivaron CD inmaduras y células tumorales M13 en las combinaciones indicadas (relación 1/1) durante 24 horas. Como controles, se incubaron CD con ligando TLR3, ácido poliinsínico:policitidílico (50 µg/ml; Sigma), o se infectaron directamente con VS (MOI = 1,0). Posteriormente, las CD se cosecharon y se tiñeron con un panel de anticuerpo conjugado por PE específico para las moléculas de superficie celular indicadas (Figura 9 - Moléculas HLA; Figura 10 - Marcadores de maduración). Las CD se separaron de acuerdo con sus características
- 15 morfológicas, y las células muertas se excluyeron basándose en la tinción por TOPRO-3 (Molecular Probes). El fenotipo de la superficie de las CD se analizó por citometría de flujo de tres colores. El histograma muestra los valores medios obtenidos de cuatro donantes independientes.

Figura 11 - Se investigó el patrón de secreción de citocina de las CD en cultivo conjunto de sobrenadante de 24 horas por ensayos CBA (para IL-6, IL-1β, TNFα, IL-12 y IL-10) y ELISA (para IFNα).

- 20 **Figura 12: Las CD cargadas con células de mesotelioma infectado por VS inducen el cebado de linfocitos T CD8 específicos de MSLN.**

Figura 12 - El número de linfocitos T CD8 específicos de MSLN, obtenido a partir de un cultivo conjunto de sensibilización de una semana con CD no pulsadas o pulsadas UV-M13 o MV-M13, se analizó por citometría de

25 flujo. El histograma indica el porcentaje de células positivas de tetrámero PE entre linfocitos T separados basándose en la expresión de CD8 humana (anticuerpos conjugados con PE-Cy5, clon RPA-T8, BD Biosciences). Se muestra un experimento representativo.

Ejemplos

- 30 **Ejemplo 1**

Susceptibilidad del mesotelioma a infección por VS y actividad oncolítica.

- 35 **[0032]** Para comparar el efecto citopático relacionado con el VS sobre células tumorales y no tumorales, un panel de cinco líneas celulares de mesotelioma epiteloide (M11, M13, M47, M56 y M61) y células mesoteliales (Met5A) se infectaron con una cepa de vacuna Schwarz en una Multiplicidad de Infección (MOI) de 1,0.

- [0033]** Las líneas celulares de mesotelioma (M11, M13, M47, M56 y M61) se establecieron a partir de la
- 40 efusión pleural recogida por toracocentesis de pacientes de cáncer. El diagnóstico de mesotelioma epiteloide se estableció por la tinción inmunohistoquímica de biopsias. La línea celular mesotelial de control (Met5A) se aisló de los fluidos pleurales de pacientes sin cáncer y se inmortalizó por transfección con el plásmido pRSV que codifica el antígeno T SV40 (ATCC-LGC Promochem, Molsheim, Francia). Las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 complementado con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10 % (FCS de Biowest, Nuaille, Francia), L-glutamina al 1 % y antibióticos de penicilina/estreptomycin al 1 % (todos adquiridos en Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Los cultivos celulares se comprobaron de forma habitual para observar contaminaciones por *Mycoplasma* usando tinción Hoechst 33258 (Sigma).
- 45

- [0034]** Se obtuvieron cepas de vacuna Schwarz del VS atenuado de F. Tangy (Pasteur Institut, Francia). El VS
- 50 Schwarz se rescató del ADNc pTM-MVSchw (SEQ ID NO: 1) por el uso del sistema de restado basado en células auxiliares descrito por Radecke y col. (1995) EMBO J. 14: 5773-5784 y modificado por Parks y col. (1999) J. Virol. 73: 3560-3566. En resumen, las células auxiliares 293-3-46 se transfectaron con 5 µg de pTM-MVSchw y 0,02 µg de pEMC-Lschw que expresa el gen MV-L Schwarz (Combredet y col. (2003) J. Virol. 77: 11546-11554) (SEQ ID NO: 2). Después de una incubación durante una noche a 37 °C, se aplicó un choque de calor durante 2 h a 43 °C, y las
- 55 células transfectadas se transfirieron sobre una monocapa de células Vero. Los sincitios que aparecieron en el cultivo conjunto de 15 días se transfirieron a pocillos de 35 mm y después se expandieron en matraces de 75 cm² y 150 cm² de cultivo de células Vero en DMEM FCS al 5 %. Cuando los sincitios alcanzaron una confluencia del 80-90 %, las células se rasparon en un volumen pequeño de OptiMEM y se congelaron-descongelaron una vez. Después de la centrifugación a baja velocidad para granular los desechos celulares, el sobrenadante que contenía el

virus se almacenó a -80 °C. La titulación de la reserva del VS recombinante se determinó por un ensayo de dilución del límite del punto final en células Vero. La TCID₅₀ se calculó mediante el uso del método Kärber (Karber (1931) Arch. Exp. Path. Pharmac. 162: 480-483).

5 **[0035]** Se realizaron infecciones víricas de las líneas celulares de mesotelioma en una MOI = 1,0 durante 2 horas de incubación a 37 °C. Tres días después de la infección por VS, se observaron modificaciones morfológicas típicas de las células infectadas por VS, es decir, el desarrollo de un efecto citopático importante (CPE) en la mayor parte de las líneas de MPM tumorales (4/5), a diferencia de las células Met5A no cancerosas (**figura 1**). El CPE se demostró a través del desarrollo de sincitios más o menos importantes, lo finalmente condujo al desprendimiento en
10 sobrenadante de cultivo de cuerpos de inclusión citoplasmáticos de células tumorales muertas (**figura 1**). El desarrollo de estos sincitios gigantes multinucleados es característico de la infección por sarampión y se produce por la fusión de células infectadas HA⁺ con células de cultivo CD46⁺ adyacentes.

[0036] Pudo demostrarse una expresión de regulación ascendente significativa de cepas del VS atenuado vivo
15 en el receptor CD46 por las células de mesotelioma (**figuras 2-3**).

[0037] Con el fin de cuantificar la susceptibilidad a la infección por VS, las líneas celulares Met5A y M13 se infectaron con reserva del VS eGFP-recombinante (Combredet y col. (2003) J. Virol. 77: 11546-11554). Se usó la expresión del transgen de GFP como un marcador de la infección vírica, permitiendo de este modo la determinación
20 del porcentaje de células infectadas por citometría de flujo. El rendimiento de la infección por VS de ambas células de cultivo fue dependiente de la dosis (MOI variable de 0,01 a 5,0), indicando la especificidad de la señal eGFP. Mientras que Met5A se infectó por la cepa del VS (para MOI que variaba de 0,5), M13 también se infectó significativamente por VS, pero siempre a una MOI inferior (para MOI que variaba de 0,1). También se observó un aumento significativo del rendimiento de la infección de las células tumorales en comparación con las células
25 normales (para MOI 1,0) tanto en sistemas de cultivo celular separado (**figura 4**) como de cultivo conjunto (**figura 5**) (relación 1:3) 48 horas después de la infección. Además, la infección vírica también pudo demostrarse por la regulación descendente de la expresión de la superficie de CD46 observada en los cultivos celulares infectados.

[0038] Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados *in vitro*, los tumores de mesotelioma presentan una
30 susceptibilidad más importante tanto a la infección mediada por VS como a la actividad citolítica relacionada con el VS que el tejido mesotelial. En consecuencia, el MPM aparece como un candidato relevante para un planteamiento de viroterapia basado en la administración del virus del sarampión.

Ejemplo 2

35 **Muerte de células tumorales inducida por tratamientos con VS y UV.**

[0039] Después de demostrar que el VS es capaz de infectar células de mesotelioma, los inventores verificaron si la infección del virus también podría conducir a la muerte celular mediada por apoptosis.

40 **[0040]** Los cultivos de células M13 monocapa subconfluentes se infectaron por VS (MOI 1,0) o se irradiaron por UV-B (312 nm-5 kJ/m²) usando un instrumento UV Stratalinker2400 (Stratagene Europe, Amsterdam, Holanda), como control positivo para la apoptosis. Las células se recogieron en diferentes momentos tras el tratamiento, y la muerte celular se cuantificó como se describe por Ebstein y col. (2004) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 169: 1322-
45 1330 mediante tinciones concomitantes de fosatidilserina y Anexina-V.

[0041] Como se muestra en la **figura 6**, 24 horas de exposición de las células M13 a irradiación UV-B y 72 horas de infección de las células M13 con VS produjeron una tasa equivalente de muerte de células tumorales (comprendida entre el 70 % y el 80 % de células positivas a anexina-V), lo que indica que el VS induce la apoptosis
50 en las células tumorales infectadas. Las condiciones que indujeron la muerte de las células M13 definida de este modo se usaron en los siguientes experimentos.

[0042] Además, también se confirmó la eliminación de las células relacionadas con el virus por la observación de un efecto citopático importante, que conduce a la dislocación completa de la capa celular M13 72-96 horas
55 después de la infección (**figura 1**).

Ejemplo 3

Seguimiento del ciclo de replicación vírica en células tumorales infectadas por VS.

[0043] Con el fin de seguir la cinética del crecimiento vírico en cultivo de células M13 infectadas (MOI = 1,0), se realizaron RT-PCR específicas para receptores potenciales de ARNds vírico (Mda-5, TLR-3, RIG-I y PKR). Se usaron cebadores específicos para el gen β -actina como un control de experimento interno.

5

[0044] En resumen, las células M13 se incubaron con ligando de ácido poliinosínico:policitidílico (10 μ g/ml) o VS (MOI = 1,0) y los gránulos celulares se recogieron en diferentes momentos. Después, todo el ARN celular se extrajo usando kits RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se transcribieron a la inversa usando RTase (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Se usó el ADNc resultante como modelo para la amplificación por PCR usando cebadores específicos para Mda-5, TLR-3, RIG-I, PKR, IFN β y β -actina. Las secuencias de cebadores PCR se enumeran en la **Tabla 1**. Los productos PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa.

10

Tabla 1: Secuencias de cebador

Cebador	Secuencia	Tamaño del fragmento (pb)	SEQ ID NO:
β -actina	ATCTGGCACCACCTTCTACAATGAGCTGCG directa	837	3
	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC inversa		4
TLR-3	ATTGGGTCTGGGAACATTTCTCTTC directa	319	5
	GTGAGATTTAAACATTCCTCTTCGG inversa		6
Mda-5	GAGCAACTTCTTTCAACCAC directa	633	7
	GAACACCAGCATCTTCTCCA inversa		8
RIG-I	GAACGATTCCATCACTATCC directa	580	9
	GGCATCATTATATTTCCGCA inversa		10
PKR	CTTCTCAGCAGATACATCAG directa	689	11
	GTTACAAGTCCAAAGTCTCC inversa		12

15

[0045] Por lo tanto, puede mostrarse que se produjo un pico de replicación vírica entre 1 a 4 días después de la infección de las células M13 de mesotelioma. Además, también pudieron evidenciarse productos PCR correspondientes a receptores potenciales de ARNds vírico (Mda-5, TLR-3, RIG-I y PKR).

20 Ejemplo 4

Captación eficiente de células de mesotelioma apoptóticas por CD inmaduros.

[0046] Después, se estudió la captación por células dendríticas (CD) de apocuerpos de células tumorales M13 infectadas por VS (72 horas) y se comparó con la de células tumorales M13 infectadas por UV (24 horas).

25

[0047] Las células dendríticas se obtuvieron a partir de monocitos generados de recogidas de leucoféresis de donantes sanos HLA-A0201 (EFS, Nantes, Francia), después de obtener el consentimiento informado. La fracción enriquecida con monocitos (>85 % de pureza) se separó en primer lugar por centrifugación por gradiente de densidad Ficoll (PAA Laboratories, Les Mureaux, Francia). Después, los monocitos se enriquecieron por elutriación (centrifugación contracorriente) usando una centrífuga Beckman Avanti J20 equipada con un rotor JE5.0 y una cámara de elutriación de 40 ml. De forma habitual, la pureza de los monocitos elutriados estaba por encima del 80 %, como se evaluó por citometría de flujo en base a la detección del marcador CD14. Los monocitos se cultivaron en 2×10^8 células/ml con 500 IU/ml de GM-CSF y 200 IU/ml de IL-4 (Cell Genix Technology, Freiburg, Alemania).

30

Después, las células se dejaron diferenciar durante 6 días.

[0048] El día 6, las CD derivadas de monocitos se recogieron del sobrenadante de cultivo y se sembraron en cultivo para su carga posterior. Las CD inmaduras se incubaron con $2 \cdot 10^8$ células/ml de material apoptótico, derivado de células tumorales M13 alogénicas tratadas por UV o infectadas por VS, durante 24 horas más de cultivo conjunto (relación 1:1). El análisis del rendimiento de la fagocitosis de las CD se evaluó tanto por citometría de flujo como microscopía láser confocal, como se ha descrito previamente (Massé y col. (2002) Cancer Research 32: 1050-1056). En resumen, las células M13 tratadas por UV o por VS se marcaron con colorante de tinción de membrana PKH-26, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Después de 24 horas de cultivo conjunto, las CD se tiñeron con anticuerpos anti HLA-DR conjugados con FITC (Immunotech, Marseilles, Francia). Después de los lavados con PBS, las células se cosecharon y se analizaron en un sistema FACSCalibur (BD Biosciences, Grenoble, Francia), o con un microscopio TCS NT (Leica Instruments, Heidelberg, Alemania). Las CD que habían ingerido células apoptóticas se identificaron como células doble positivo a HLA-DR/PKH-26 (**figura**

40

45

7).

[0049] Como se muestra en la **figura 8**, puede demostrarse que las CD sumergieron eficientemente células de mesotelioma tratadas por UV y por VS a la misma velocidad, como se ilustra por un porcentaje similar de CD PKH26-positivas separadas basándose en la expresión de HLA-DR (65 % y 74 % para CD cargadas respectivamente con células M13 tratadas por UV o por VS).

[0050] Los experimentos de microscopía de exploración láser confocal confirmaron adicionalmente una internalización eficiente de las células M13 apoptóticas por las CD inmaduras en 24 horas de cultivo conjunto, independientemente de la estrategia inducida por muerte usada (infectadas por VS o irradiadas por UV).

Ejemplo 5

Las células tumorales infectadas con VS inducen la maduración espontánea de las CD, a diferencia de las células M13 apoptóticas inducidas por radiación UV.

[0051] A continuación, los inventores examinaron si el material celular obtenido a partir de células tumorales M13 infectadas por VS podía estimular eficientemente la maduración de las CD.

[0052] El estado de maduración de las CD se evaluó 24 horas después de la inmersión de las células tumorales eliminadas por exposición a la radiación o por la actividad citolítica mediada por el virus.

[0053] El fenotipo de las CD viables (separadas basándose en exclusión por tinción positiva a TOPRO-3) se investigó por la expresión superficial de moléculas CMH de Clase I y II (**figura 9**) y de los marcadores de maduración CD80, CD86, CD83 y CD40 (**figura 10**), completado por el análisis del patrón de secreción de citocinas realizado en el sobrenadante de cultivo conjunto (**figura 11**). Como controles, las CD se dejaron solas, o se maduraron con una combinación de ligando TLR3 y una citocina pro-inflamatoria (ácido poliinosínico:policitidílico/IFN α , como un imitador de la infección vírica), o se dispusieron directamente por contacto con el virus del sarampión (VS).

[0054] En resumen, la inmunotinción se realizó con un panel de anticuerpos monoclonales (todos adquiridos en Immunotech, Marseilles, Francia) específicos para HLA-ABC (clon B9.12.1), HLA-DR (clon B8.12.2), CD80 (clon MAB104), CD83 (clon HB15a), CD86 (clon HA5.2B7) y CD40 (clon MAB89). Las CD se incubaron con cada uno de los anticuerpos anteriores (1 μ g/ml) a 4 °C durante 30 min antes de la citometría de flujo. Se ensayó la secreción del patrón de citocinas en sobrenadantes recogidos 24 horas después de la inmersión. Las concentraciones de IL-10, IL-12, IL-6, IL-1 β y TNF α se midieron usando kits de matriz citométrica de microesferas disponibles en el mercado (BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cuantificación de IFN α se realizó con un ensayo ELISA (Biosource, Camarillo, Estados Unidos).

[0055] Pudo observarse un programa de maduración espontánea únicamente para las CD cargadas con apocuerpos obtenidos a partir de células de mesotelioma infectadas con VS, a un nivel básicamente equivalente al cóctel de maduración de control positivo usado en el experimento (PolyI:C/IFN α). La maduración espontánea se demostró por una regulación ascendente significativa de la expresión de moléculas de estimulación conjunta (para CD80, CD83, CD86, CD40 y HLA-ABC), y la producción de numerosas citocinas pro-inflamatorias (para IL-6, IL-1 β , TNF α e IFN α).

[0056] Sin embargo, en consonancia con informes anteriores, las CD pulsantes con células tumorales apoptóticas irradiadas por UV, así como la infección directa de CD por virus del sarampión (VS), no condujeron a este efecto.

[0057] En general, estos datos apoyan fuertemente un aumento de la inmunogenicidad de las células tumorales infectadas por VS con respecto a las células tumorales irradiadas por UV.

Ejemplo 6

Cebado cruzado de la respuesta de linfocitos T CD8 específicos de MSLN.

[0058] Finalmente, los inventores ensayaron si las CD cargadas con apocuerpos obtenidos a partir de células de mesotelioma infectadas con VS podían estimular una respuesta CD8 efectora específica para un antígeno tumoral asociado a MPM, tal como Mesotelina (MSLN).

[0059] Con el fin de evaluar esta cuestión, se realizó una inmunotinción para tetrámero en linfocitos T CD8 sensibilizados durante una semana con CD autólogas cargadas con material apoptótico obtenido a partir de células M13 tratadas por UV o VS. Como controles, se realizó un experimento similar con la línea de linfocitos T de linfoma Jurkat, escogida basándose en su susceptibilidad al VS y sus características de expresión negativa a MSLN (**figura 12**). Como controles de experimento internos, se consiguió la tinción del tetrámero específico a MelanA/Mart-1 (MelanA26-35L) en complemento a los específicos para los dos epítomos CTL derivados de MSLN seleccionados. Estos péptidos (MSLN 531-539 y MSLN 541-550) se identificaron por la exploración de la secuencia aminoacídica de MSLN (GenPept NP 005814) para buscar correspondencias con los motivos de consenso para la unión a HLA-A0201, usando dos algoritmos informáticos BIMAS y SYFPEITHI (**Tabla 2**):

Tabla 2: Características de los tetrámeros

Nombre del tetrámero	Localización	Secuencia	Puntuación de unión a HLA-A0201	
			SYFPEITHI	BIMAS
HLA-A2 VLP9	531-539	VLPLTVAEV (SEQ ID NO: 13)	29/30	272/285
HLA-A2 KLL10	541-550	KLLGPHVEGL (SEQ ID NO: 14)	30/31	312/312

[0060] En resumen, los linfocitos T CD8 se prepararon a partir de PBMC de donantes sanos HLA-A0201 por selección positiva con los sistemas de columna MACS usando un kit CD8 multisort (Miltenyi Biotec, Paris, Francia). Los linfocitos T CD8 sin tratar purificados (>90 % de pureza) se estimularon con CD autólogas cargadas con cada preparación apoptótica o CD no cargadas como control. El cultivo conjunto se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo (BD Falcon), mezclando $2 \cdot 10^4$ CD maduras con $2 \cdot 10^5$ linfocitos T respondedores (relación 1:10) en 200 μ l de medio RPMI 1640 de suero humano al 8 %, complementado con 10 ng/ml de IL-12 durante los 3 primeros días (AbCys SA, Paris, Francia) y con 10 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Therapeutics, Estados Unidos) durante los siguientes días. Se añadió IL-2 cada tres días, permitiendo una renovación del medio de cultivo regular. Después de 7-8 días de cultivo, los linfocitos T se cosecharon y se tiñeron con los tetrámeros específicos de MSLN como se indica a continuación.

[0061] Los péptidos de epítomos CD8 seleccionados (síntesis realizada por Eurogentec, Liege, Bélgica) se usaron para la producción de monómeros (Recombinant Proteins Production Platform (Plataforma de Producción de Proteínas Recombinantes), U601-IFR26, Nantes, Francia) como se ha descrito previamente (Labarriere y col. (2002) Int. J. Cancer 101: 280-286). Los monómeros HLA-A2 VLP9 y HLA-A2 KLL10 se oligomerizaron con estreptavidina marcada con PE (BD Biosciences). La tinción y el lavado se realizaron en BSA-PBS al 0,1 %. Los linfocitos T se tiñeron sucesivamente con 10 μ g/ml de multímeros pMHC marcados con PE a 4 °C durante 30 min, y con 1 μ g/ml de anticuerpos anti-CD8 conjugados por PE-Cy5 diluidos (clon RPA-T8, BD Biosciences) durante 30 min más a 4 °C. Las células se lavaron y se analizaron inmediatamente en un FACSCalibur.

[0062] De manera interesante, pudo observarse un aumento significativo del porcentaje de linfocitos T específicos de MSLN entre la selección de población CD8-positiva para cultivos conjuntos con CD cargadas con material apoptótico obtenido a partir de células M13 tratadas por VS con respecto a cultivos conjuntos con CD cargadas con material apoptótico obtenido a partir de células M13 tratadas por UV.

LISTA DE SECUENCIAS

40

[0063]

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

45 <120> MEDICAMENTOS Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE MESOTELIOMA

<130> BET08P1093

<150> EP 07291232.2

<151> 10-10-2007

<160> 14

50 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 18967

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Plásmido pTM-MVSchw
<400> 1

gcggccgcta atacgactca ctatagggcc aactttgttt ggtctgatga gtccgtgagg	60
acgaaacccg gagtcccggg tcaccaaaca aagttgggta aggatagttc aatcaatgat	120
catcttctag tgcacttagg attcaagatc ctattatcag ggacaagagc aggattaggg	180
atatccgaga tggccacact tttaaggagc ttagcattgt tcaaaagaaa caaggacaaa	240
ccaccatta catcaggatc cggtaggagc atcagaggaa tcaaacacat tattatagta	300
ccaatccctg gagattcctc aattaccact cgatccagac ttctggaccg gttggtgagg	360
ttaattggaa acccgatgt gagcggggcc aaactaacag gggcactaat aggtatatta	420
tccttatttg tggagtctcc aggtcaattg attcagagga tcaccgatga ccctgacgtt	480
agcataaggc tgttagaggt tgtccagagt gaccagtcac aatctggcct taccttcgca	540
tcaagaggta ccaacatgga ggatgaggcg gaccaatact tttcacatga tgatccaatt	600
agtagtgatc aatccagggt cggatgggtc gggaacaagg aaatctcaga tattgaagtg	660
caagaccctg agggattcaa catgattctg ggtaccatcc tagcccaaatt ttgggtcttg	720
ctcgcaaagg cggttacggc cccagacacg gcagctgatt cggagctaag aagggtggata	780
aagtacaccc aacaaagaag ggtagttggt gaatttagat tggagagaaa atgggtggat	840
gtggtgagga acaggattgc cgaggacctc tccttacgcc gattcatggt cgctctaate	900
ctggatatca agagaacacc cggaaacaaa cccaggattg ctgaaatgat atgtgacatt	960
gatacatata tcgtagaggc aggattagcc agttttatcc tgactattaa gtttgggata	1020
gaaactatgt atcctgctct tggactgcat gaatttgctg gtgagttatc cacacttgag	1080
tccttgatga acctttacca gcaaatgggg gaaactgcac cctacatggt aatcctggag	1140
aactcaattc agaacaagtt cagtgcagga tcataccctc tgctctggag ctatgccatg	1200

ggagtaggag	tggaacttga	aaactccatg	ggaggtttga	actttggccg	atcttacttt	1260
gatccagcat	atttttagatt	agggaagag	atggttaagga	ggtcagctgg	aaaggtcagt	1320
tccacattgg	catctgaact	cggtatcact	gccgaggatg	caaggcttgt	ttcagagatt	1380
gcaatgcata	ctactgagga	caagatcagt	agagcggttg	gacccagaca	agcccaagta	1440
tcattttctac	acggtgatca	aagtgagaat	gagctaccga	gattgggggg	caaggaagat	1500
aggagggtca	aacagagtcg	aggagaagcc	agggagagct	acagagaaac	cgggccagc	1560
agagcaagtg	atgcgagagc	tgcccatctt	ccaaccggca	caccctaga	cattgacact	1620
gcaacggagt	ccagccaaga	tccgcaggac	agtcaagggt	cagctgacgc	cctgcttagg	1680
ctgcaagcca	tggcaggaat	ctcggaagaa	caaggctcag	acacggacac	ccctatagtg	1740
tacaatgaca	gaaatcttct	agactaggtg	cgagaggccg	agggccagaa	caacatccgc	1800
ctaccatcca	tcattgttat	aaaaaactta	ggaaccagggt	ccacacagcc	gccagcccat	1860
caaccatcca	ctcccacgat	tgagagccaat	ggcagaagag	caggcacgcc	atgtcaaaaa	1920
cggactggaa	tgcacccggg	ctctcaaggc	cgagcccata	ggctcactgg	ccatcgagga	1980
agctatggca	gcatggtcag	aaatatcaga	caaccagga	caggagcgag	ccacctgcag	2040
ggaagagaag	gcaggcagtt	cgggtctcag	caaaccatgc	ctctcagcaa	ttggatcaac	2100
tgaaggcggt	gcacctcgca	tccgcgggtca	gggacctgga	gagagcgatg	acgacgctga	2160
aactttggga	atccccccaa	gaaatctcca	ggcatcaagc	actgggttac	agtgttatta	2220
cgtttatgat	cacagcgggt	aagcggttaa	gggaatccaa	gatgctgact	ctatcatgggt	2280
tcaatcaggc	cttgatgggt	atagcaccct	ctcaggagga	gacaatgaat	ctgaaaacag	2340
cgatgtggat	attggcgaa	ctgataccga	gggatatgct	atcactgacc	ggggatctgc	2400
tcccatctct	atggggttca	gggcttctga	tgttgaaact	gcagaaggag	gggagatcca	2460
cgagctcctg	agactccaat	ccagaggcaa	caactttccg	aagcttggga	aaactctcaa	2520
tgttcctccg	cccccgacc	cggtagggc	cagcacttcc	gggacacca	ttaaaagg	2580
cacagacgcg	agattagcct	catttggaac	ggagatcgcg	tctttattga	cagggtggtgc	2640
aaccaatgt	gctcgaaagt	cacctcgga	accatcagg	ccagggtgcac	ctgcggggaa	2700
tgtccccgag	tgtgtgagca	atgccgcact	gatacaggag	tggacaccgc	aatctggtac	2760
cacaatctcc	ccgagatccc	agaataatga	agaaggggga	gactattatg	atgatgagct	2820
gttctctgat	gtccaagata	ttaaaacagc	cttgccaaa	atacacgagg	ataatcagaa	2880
gataatctcc	aagctagaat	cactgctggt	attgaaggga	gaagttgagt	caattaagaa	2940
gcagatcaac	aggcaaaata	tcagcatatc	caccctggaa	ggacacctct	caagcatcat	3000
gatcgccatt	cctggacttg	ggaaggatcc	caacgacccc	actgcagatg	tcgaaatcaa	3060
tcccgacttg	aaacccatca	taggcagaga	ttcaggccga	gcactggccg	aagttctcaa	3120

gaaacccggt gccagccgac aactccaagg aatgacaaat ggacggacca gttccagagg 3180
 acagctgctg aaggaatttc agctaaagcc gatcgggaaa aagatgagct cagccgtcgg 3240
 gtttgttcct gacaccggcc ctgcatcacg cagtgtaatc cgctccatta taaaatccag 3300
 ccggctagag gaggatcgga agcgttacct gatgactctc cttgatgata tcaaaggagc 3360
 caatgatctt gccagttcc accagatgct gatgaagata ataatgaagt agctacagct 3420
 caacttacct gccaacccca tgccagtcca cccaactagt acaacctaaa tccattataa 3480
 aaaacttagg agcaaagtga ttgctccca aggtccacaa tgacagagac ctacgacttc 3540
 gacaagtcgg catgggacat caaagggtcg atcgctccga tacaaccac cacctacagt 3600
 gatggcaggc tgggtgcccc ggtcagagtc atagatcctg gtctaggcga caggaaggat 3660
 gaatgcttta tgtacatggt tctgctgggg gttgttgagg acagcgattc cctagggcct 3720
 ccaatcgggc gagcatttgg gttcctgccc ttaggtgttg gcagatccac agcaaagccc 3780
 gaaaaactcc tcaaagaggc cactgagctt gacatagttg ttagacgtac agcagggttc 3840
 aatgaaaaac tgggtgttcta caacaacacc ccactaactc tcctcacacc ttggagaaag 3900
 gtcctaacaa caggagtggt cttcaacgca aaccaagtgt gcaatgcggt taatctgata 3960
 ccgctcgata ccccgagag gttccgtggt gtttatatga gcatcaccgc tctttcggat 4020
 aacgggtatt acaccgttcc tagaagaatg ctggaattca gatcgggtcaa tgcagtggcc 4080
 ttcaacctgc tggtgacct taggattgac aaggcgatag gccctgggaa gatcatcgac 4140
 aatacagagc aacttcctga ggcaacattt atggtccaca tcgggaactt caggagaaag 4200
 aagagtgaag tctactctgc cgattattgc aaaatgaaaa tcgaaaagat gggcctgggt 4260
 tttgcacttg gtgggatagg gggcaccagt cttcacatta gaagcacagg caaaatgagc 4320
 aagactctcc atgcacaact cgggttcaag aagaccttat gttaccgct gatggatatt 4380
 aatgaagacc ttaatcgatt actctggagg agcagatgca agatagtaag aatccaggca 4440
 gttttgcagc catcagttcc tcaagaattc cgcatttacg acgacgtgat cataaatgat 4500
 gaccaaggac tattcaaagt tctgtagacc gtagtgccca gcaatgcccg aaaacgaccc 4560
 ccctcacaat gacagccaga agggccggac aaaaaagccc cctccgaaag actccacgga 4620
 ccaagcgaga ggccagccag cagccgacgg caagcgcgaa caccaggcgg ccccgacaca 4680
 gaacagccct gacacaaggc caccaccagc caccccaatc tgcactctcc tcgtgggacc 4740
 cccgaggacc aaaccccaag gctgcccccg atccaaacca ccaaccgat cccaccacc 4800
 cccgggaaag aaacccccag caattggaag gccctctccc ctcttctca acacaagaac 4860
 tccacaaccg aaccgcacaa gcgaccgagg tgaccaacc gcaggcatcc gactccctag 4920
 acagatcctc tctccccggc aaactaaaca aaacttaggg ccaaggaaca tacacacca 4980
 acagaacca gaccccgcc cacggcgccg cgcaccaac ccccgacaac cagagggagc 5040
 ccccaacca tcccgcggc tccccgggtg cccacaggca gggacacca ccccgaca 5100

gaccagcac	ccaaccatcg	acaatccaag	acgggggggc	cccccaaaa	aaaggcccc	5160
aggggccgac	agccagcacc	gcgaggaagc	cccccaccc	cacacacgac	cacggcaacc	5220
aaaccagaac	ccagaccacc	ctgggccacc	agctcccaga	ctcggccatc	accccgagca	5280
aaggaaaggc	cacaaccgcg	gcaccccagc	cccgatccgg	cggggagcca	cccaaccoga	5340
accagcacc	aagagcgatc	cccgaaggac	ccccgaaccg	caaaggacat	cagtatccca	5400
cagcctctcc	aagtcccccg	gtctcctcct	cttctcgaag	ggacccaaaag	atcaatccac	5460
cacaccgac	gacactcaac	tccccacccc	taaaggagac	accgggaatc	ccagaatcaa	5520
gactcatcca	atgtccatca	tgggtctcaa	ggtgaacgct	tctgccatat	tcatggcagt	5580
actgttaact	ctccaaacac	ccaccggtca	aatccattgg	ggcaatctct	ctaagatagg	5640
ggtggttaga	ataggaagtg	caagctacaa	agttatgact	cgttcagacc	atcaatcatt	5700
agtcataaaa	ttaatgccc	atataactct	cctcaataac	tgacagaggg	tagagattgc	5760
agaatacagg	agactactga	gaacagtttt	ggaaccaatt	agagatgcac	ttaatgcaat	5820
gaccagaat	ataagaccgg	ttcagagtgt	agcttcaagt	aggagacaca	agagatttgc	5880
gggagtagtc	ctggcagggtg	cgcccttagg	cgttgccaca	gctgctcaga	taacagccgg	5940
cattgcactt	caccagtcca	tgctgaactc	tcaagccatc	gacaatctga	gagcgagcct	6000
ggaaactact	aatcaggcaa	ttgagacaat	cagacaagca	gggcaggaga	tgatattggc	6060
tggtcagggt	gtccaagact	acatcaataa	tgagctgata	ccgtctatga	accaactatc	6120
ttgtgattta	atcgccagca	agctcgggct	caaattgctc	agatactata	cagaaatcct	6180
gtcattattt	ggccccagtt	tacgggaccc	catatctgcg	gagatatcta	tccaggcttt	6240
gagctatgcg	cttgaggagg	acatcaataa	ggtgttagaa	aagctcggat	acagtggagg	6300
tgatttactg	ggcatcttag	agagcggagg	aataaaggcc	cggataactc	acgtcgacac	6360
agagtcctac	ttcattgtcc	tcagtatagc	ctatccgacg	ctgtccgaga	ttaagggggt	6420
gattgtccac	eggctagagg	gggtctcgta	caacataggc	tctcaagagt	ggtataccac	6480
tgtgccaag	tatgttgcaa	cccagggtta	ccttatctcg	aattttgatg	agtcategtg	6540
tactttcatg	ccagagggga	ctgtgtgcag	ccaaaatgcc	ttgtaccoga	tgagtctctt	6600
gctccaagaa	tgctccggg	ggtacaccaa	gtcctgtgct	cgtacactcg	tatccgggtc	6660
ttttgggaac	cggttcattt	tatcacaagg	gaacctata	gccaatgtg	catcaatcct	6720
ttgcaagtgt	tacacaacag	gaacgatcat	taatcaagac	cctgacaaga	tcctaacata	6780
cattgctgcc	gatcactgcc	cggtagtcga	ggtgaacggc	gtgaccatcc	aagtcgggag	6840
caggaggtat	ccagacgctg	tgtacttgca	cagaattgac	ctcggtcctc	ccatatcatt	6900
ggagaggttg	gacgtaggga	caaactctgg	gaatgcaatt	gctaagttgg	aggatgcaa	6960
ggaattgttg	gagtcacg	accagatatt	gaggagtatg	aaaggtttat	cgagcactag	7020

catagtctac	atcctgattg	cagtgtgtct	tggagggttg	atagggatcc	ccgctttaat	7080
atgttgctgc	agggggcggt	gtaacaaaaa	gggagaacaa	gttggtatct	caagaccagg	7140
cctaaagcct	gatcttacgg	gaacatcaaa	atcctatgta	aggtcgctct	gatcctctac	7200
aactcttgaa	acacaaatgt	cccacaagtc	tcctcttcgt	catcaagcaa	ccaccgcacc	7260
cagcatcaag	cccacctgaa	attatctccg	gcttccctct	ggccgaacaa	tatcggtagt	7320
taatcaaaac	ttaggggtgca	agatcatcca	caatgtcacc	acaacgagac	cggataaatg	7380
ccttctacaa	agataacccc	catccaagg	gaagtaggat	agtcattaac	agagaacatc	7440
ttatgattga	tagaccttat	gttttgctgg	ctgttctgtt	tgtcatgttt	ctgagcttga	7500
tcgggttgct	agccattgca	ggcattagac	ttcatcgggc	agccatctac	accgcagaga	7560
tcataaaaag	cctcagcacc	aatctagatg	taactaactc	aatcgagcat	cagggtcaagg	7620
acgtgctgac	accactcttc	aaaatcatcg	gtgatgaagt	gggcctgagg	acacctcaga	7680
gattcactga	cctagtgaag	ttaatctctg	acaagattaa	attccttaat	ccggataggg	7740
agtacgactt	cagagatctc	acttggtgta	tcaacccgcc	agagagaatc	aaattggatt	7800
atgatcaata	ctgtgcagat	gtggctgctg	aagagctcat	gaatgcattg	gtgaactcaa	7860
ctctactgga	gaccagaaca	accaatcagt	tcctagctgt	ctcaaagga	aactgctcag	7920
ggcccactac	aatcagaggt	caattctcaa	acatgtcgct	gtccctgtta	gacttgtatt	7980
taggtcgagg	ttacaatgtg	tcactctatag	tcactatgac	atcccaggga	atgtatgggg	8040
gaacttacct	agtggaaaag	cctaactctga	gcagcaaaaag	gtcagagttg	tcacaactga	8100
gcatgtaccg	agtgtttgaa	gtagggtgta	tcagaaatcc	gggtttgggg	gctccgggtg	8160
tccatatgac	aaactatctt	gagcaaccag	tcagtaatga	tctcagcaac	tgtatgggtg	8220
ctttggggga	gctcaaaactc	gcagcccttt	gtcacgggga	agattctatc	acaattccct	8280
atcagggatc	agggaaaggt	gtcagcttcc	agctcgtcaa	gctaggtgtc	tggaaatccc	8340
caaccgacat	gcaatcctgg	gtccccttat	caacggatga	tccagtgata	gacaggcttt	8400
acctctcatc	tcacagaggt	gttatcgctg	acaatcaagc	aaaatgggct	gtcccgacaa	8460
cacgaacaga	tgacaagttg	cgaatggaga	catgcttcca	acaggcgtgt	aagggtaaaa	8520
tccaagcact	ctgcgagaat	cccagtgagg	caccattgaa	ggataacagg	attccttcat	8580
acggggctct	gtctgttgat	ctgagtctga	cagttgagct	taaaatcaaa	attgcttcgg	8640
gattcggggc	attgatcaca	cacggttcag	ggatggacct	atacaaatcc	aaccacaaca	8700
atgtgtattg	gctgactatc	ccgccaatga	agaacctagc	cttaggtgta	atcaacacat	8760
tggagtggat	accgagattc	aaggttagtc	cctacctctt	cactgtccca	attaaggaag	8820
caggcgaaga	ctgccatgcc	ccaacatacc	tacctgcgga	ggtggatggg	gatgtcaaac	8880
tcagttccaa	tctgggtgatt	ctacctgggc	aagatctcca	atatgttttg	gcaacctacg	8940
atacttcag	ggttgaacat	gctgtgggtt	attacgttta	cagcccaagc	cgctcatttt	9000

```

cttactttta tccttttagg ttgcctataa aggggggtccc catcgaatta caagtggaat 9060
gcttcacatg ggaccaaaaa ctctggtgcc gtçactttctg tgtgcttgcg gactcagaat 9120
ctggtggaca tatcactcac tctgggatgg tgggcatggg agtcagctgc acagtcaccc 9180
gggaagatgg aaccaatcgc agatagggct gctagtgaac caatcacatg atgtcaccca 9240
gacatcaggc ataccacta gtgtgaaata gacatcagaa ttaagaaaaa cgtaggggtcc 9300
aagtggttcc ccgttatgga ctçgctatct gtcaaccaga tçttataccc tgaagttcac 9360
ctagatagcc cgatagttag caataagata gtagccatcc tggagtatgc tçgagtccct 9420
cacgçttaca gcctggagga ccctacactg tgtcagaaca tcaagcaccg cçtaaaaaac 9480
ggattttcca accaaatgat tataaacaat gtggaagttg ggaatgtcat caagtccaag 9540
cttaggagtt atccggccca ctctcatatt ccatatcçaa attgtaatca ggattttatt 9600
aacatagaag acaaagagtc aacgaggaag atccgtgaac tcctcaaaaa ggggaattcg 9660
ctgtactcca aagtcagtga taaggttttc caatgçttaa gggacactaa ctacgggçtt 9720
ggcctaggct ccgaattgag ggaggacatc aaggagaaag ttattaactt gggagtttac 9780
atgcacagct ccçagtgggt tgagccçttt ctgttttgggt ttacagtcaa gactgagatg 9840
aggtcagtga ttaaatcaca aaccçatact tgccatagga ggagacacac acctgtattc 9900
ttcactggta gttcagttga gttgçtaatc tctçgtgacc ttgttgçtat aatcagtaaa 9960
gagtçtcaac atgtatatta cctgacattt gaactgggtt tgatgtattg tgatgtcata 10020
gaggggaggt taatgacaga gaccgçtatg actattgatg ctaggtatac agagçttçta 10080
ggaagagtca gatacatgtg gaaactgata gatggttttçt tcçctgçact çgggaatcca 10140
acttatcaaa ttgtagccat gctggagçct çtttçacttg çttacçtgca gctgagggat 10200
ataacagtag aactcagagg tgçtttççtt aaccactgçt ttactgaaat açatgatgtt 10260
çttgacçaaa açgggttttç tgatgaagggt acttatçatg agttaactga agçtçtagat 10320
tacattttca taactgatga catacatçtg açaggggaga ttttçtçatt tttcagaagt 10380
ttçggççacc ccagacttga agcagtaacg gçtgçtgaaa atgttaggaa atacatgaat 10440
cagççtaaaçg tcattgtgta tgagactçtg atgaaaggçt atgççatatt ttgtggaatc 10500
ataatcaacg gçtatçgtga çaggçacggg ggcagttggç caccgçtgac cçtçççççtg 10560
catgçtgçag açacaatççg gaatgçtcaa gçttcaggtg aagggttaac açatgagçag 10620
tgçgttgata actggaaatc ttttgçtgga gtgaaatttg gçtgçtttat gççtçttagc 10680
çtggaatagt atçtgacaat gtacçtaaaç gacaaggçac ttgçtgçtçt cçaaagggaa 10740
tgggattçag tttacççgaa agagtçtçtg çgttaçgacc çtçççaaagg aacçgggtca 10800
çggagggçttg tagatgtttt ççttaatgat tçgagçtttg açççatatga tgtgataatg 10860
tatgttgtaa gtggagçtta cçtççatgac cçtgagttca aççtgtçtta çagççtgaaa 10920

```

gaaaaggaga tcaaggaaac aggtagactt tttgctaaaa tgacttaca aatgagggca 10980
 tgccaagtga ttgctgaaaa tctaattctca aacgggattg gcaaattatt taaggacaat 11040
 gggatggcca aggatgagca cgatttgact aaggcactcc acactctagc tgtctcagga 11100
 gtccccaag atctcaaaga aagtcacagg gggggggccag tcttaaaaac ctactcccga 11160
 agcccagtc acacaagtac caggaaactg agagcagcaa aagggtttat agggttccct 11220
 caagtaattc ggcaggacca agacactgat catccggaga atatggaagc ttacgagaca 11280
 gtcagtgc atctcacgac tgatctcaag aagtactgcc ttaattggag atatgagacc 11340
 atcagcttgt ttgcacagag gctaaatgag atttacggat tgcctcatt tttccagtgg 11400
 ctgcataaga ggcttgagac ctctgtcctg tatgtaagt accctcattg ccccccgac 11460
 cttgacgccc atatccggt atataaagtc cccaatgatc aaatcttcat taagtaccct 11520
 atgggaggta tagaagggt ttgtcagaag ctgtggacca tcagcaccat tccctatcta 11580
 tacctggctg cttatgagag cggagtaagg attgcttcgt tagtgcaagg ggacaatcag 11640
 accatagccg taacaaaaag ggtaccagc acatggcctt acaacctta gaaacgggaa 11700
 gctgctagag taactagaga ttactttgta attcttaggc aaaggctaca tgatattggc 11760
 catcacctca aggcaaatga gacaattgtt tcatcacatt tttttgtcta ttcaaaagga 11820
 atatattatg atgggctact tgtgtcccaa tcaactcaaga gcatcgcaag atgtgtattc 11880
 tggtcagaga ctatagtga tgaacaagg gcagcatgca gtaattattg tacaacaatg 11940
 gctaaaagca tcgagagagg ttatgaccgt taccttgc attcctgaa cgtcctaaaa 12000
 gtgatacagc aaattctgat ctctcttggc ttcacaatca attcaaccat gaccgggat 12060
 gtagtcatac ccctctcac aaacaacgac ctcttaataa ggatggcact gttgcccgct 12120
 cctattgggg ggatgaatta tctgaatatg agcaggctgt ttgtcagaaa catcggtgat 12180
 ccagtaacat catcaattgc tgatctcaag agaattgatc tcgcctcact aatgcctgaa 12240
 gagaccctcc atcaagtaat gacacaacaa ccgggggact cttcattcct agactgggct 12300
 agcgaccctt actcagcaaa tcttgatgt gtccagagca tcaactagact cctcaagaac 12360
 ataactgcaa gggttgcct gatccatagt ccaaaccacaa tgttaaaagg attattccat 12420
 gatgacagta aagaagagga cgagggactg gcggcattcc tcatggacag gcatattata 12480
 gtacctaggg cagctcatga aatcctggat catagtgtca caggggcaag agagtctatt 12540
 gcaggcatgc tggataccac aaaaggcttg attcgagcca gcatgaggaa ggggggggta 12600
 acctctcgag tgataaccag attgtccaat tatgactatg aacaattcag agcagggatg 12660
 gtgctattga caggaagaaa gagaaatgtc ctcatgaca aagagtcag ttcagtgcag 12720
 ctggcgagag ctctaagaag ccatatgtgg gcgaggctag ctcgaggacg gcctatttac 12780
 ggccctgagg tccctgatgt actagaatct atgcgaggcc acctatttcg gcgtcatgag 12840
 acatgtgtca tctgcgagtg tggatcagtc aactacggat gggtttttgt cccctcgggt 12900

tgccaactgg atgatattga caaggaaaça tcatccttga gagtcccata tattggttct 12960
 accactgatg agagaacaga catgaagctt gccttcgtaa gagccccaag tcgatccttg 13020
 cgatctgctg ttagaatagc aacagtgtac tcatgggctt acggtgatga tgatagctct 13080
 tggaacgaag cctggttggt ggctaggcaa agggccaatg tgagcctgga ggagctaagg 13140
 gtgatcactc ccatctcaac ttogactaat ttagcgcata ggttgaggga tcgtagcact 13200
 caagtgaat actcaggtac atcccttgct cgagtggcga ggtataccac aatctccaac 13260
 gacaatctct catttgctcat atcagataag aaggttgata ctaactttat ataccaacaa 13320
 ggaatgcttc taggggtggg tggttttagaa acattgttct gactcgagaa agataccgga 13380
 tcatctaaca cgggtattaca tcttcacgtc gaaacagatt gttgcgtgat cccgatgata 13440
 gatcatocca ggataccag ctcccgaag ctagagctga gggcagagct atgtaccaac 13500
 ccattgatat atgataatgc acctttaatt gacagagatg caacaaggct atacaccag 13560
 agccatagga ggcaccttgt ggaatttggt acatgggtcca caccccaact atatcacatt 13620
 ttagctaagt ccacagcact atctatgatt gacctggtaa caaaatttga gaaggaccat 13680
 atgaatgaaa ttccagctct cataggggat gacgatatca atagtctcat aactgagttt 13740
 ctgctcatag agccaagatt attcactatc tacttgggcc agtgtgcggc catcaattgg 13800
 gcatttgatg tacattatca tagaccatca gggaaatatc agatgggtga gctgtgtca 13860
 tcgttccttt ctagaatgag caaaggagtg ttaagggtgc ttgtcaatgc tctaagccac 13920
 ccaaagatct acaagaaatt ctggcattgt ggtattatag agcctatcca tggctcttca 13980
 cttgatgctc aaaacttgca cacaactgtg tgcaacatgg tttacacatg ctatatgacc 14040
 tacctogacc tgttggtgaa tgaagagtta gaagagttca catttctctt gtgtgaaagc 14100
 gacgaggatg tagtaccgga cagattcgac aacatccagg caaaacactt atgtgttctg 14160
 gcagatttgt actgtcaacc agggacctgc ccaccaatc gaggtctaag accggtagag 14220
 aaatgtgcag ttctaaccga ccatatcaag gcagaggcta tggtatctcc agcaggatct 14280
 tcgtggaaca taaatccaat tattgtagac cattactcat gctctctgac ttatctccgg 14340
 cgaggatcga tcaaacagat aagattgaga gttgatccag gattcatttt cgacgcctc 14400
 gctgaggtaa atgtcagtca gccaaagatc ggcagcaaca acatctcaa tatgagcatc 14460
 aaggctttca gacccccaca cgatgatgtt gcaaaattgc tcaaagatat caacacaagc 14520
 aagcacaatc ttccatttc agggggcaat ctgcgaatt atgaaatcca tgctttccgc 14580
 agaatcgggt tgaactcatc tgcttgctac aaagctgttg agatatcaac attaattagg 14640
 agatgccttg agccagggga ggacggcttg ttcttgggtg agggatcggg ttctatgttg 14700
 atcacttata aagagatact taaactaaac aagtgttct ataatagtgg ggtttccgcc 14760
 aattctagat ctggtcaaag ggaattagca ccctatccct ccgaagttgg ccttgctgaa 14820

cacagaatgg gagtaggtaa tattgtcaaa gtgctcttta acgggaggcc cgaagtcacg 14880
tgggtaggca gtgtagattg cttcaatttc atagttagta atatccctac ctctagtggtg 14940
gggtttatcc attcagatat agagaccttg cctgacaaag atactataga gaagctagag 15000
gaattggcag ccatcttatac gatggctctg ctcctgggca aaataggatc aatactgggtg 15060
attaagctta tgcctttcag cggggatttt gttcagggat ttataagtta tgtaggggtct 15120
cattatagag aagtgaacct tgtataacct agatacagca acttcatctc tactgaatct 15180
tatttggtta tgacagatct caaggctaac cggctaatac atcctgaaaa gattaagcag 15240
cagataattg aatcatctgt gaggacttca cctggactta taggtcacat cctatccatt 15300
aagcaactaa gctgcataca agcaattgtg ggagacgcag ttagtagagg tgatatcaat 15360
cctactctga aaaaacttac acctatagag cagggtgtga tcaattgcgg gttggcaatt 15420
aacggaccta agctgtgcaa agaattgatc caccatgatg ttgcctcagg gcaagatgga 15480
ttgcttaatt ctatactcat cctctacagg gagttggcaa gattcaaaga caaccaaaga 15540
agtcaacaag ggatgttcca cgcttaccct gtattggtta gtagcaggca acgagaactt 15600
atatctagga tcacccgcaa attctggggg cacattcttc tttactccgg gaacaaaaag 15660
ttgataaata agtttatcca gaatctcaag tccggctatc tgataactaga cttacaccag 15720
aatatcttcg ttaagaatct atccaagtca gagaaacaga ttattatgac gggggggttg 15780
aaacgtgagt ggggtttttaa ggtaacagtc aaggagacca aagaatggta taagttagtc 15840
ggatacagt ccttgattaa ggactaattg gttgaactcc ggaaccctaa tcctgcccta 15900
gggtggttagg cattatattg aatatattaa agaaaacttt gaaaatacga agtttctatt 15960
cccagctttg tctggtggeg ggcattggtc cagcctcctc gctggcgccg gctgggcaac 16020
attccgaggg gaccgtcccc tcggtaatgg cgaatgggac gcggccgatc cggctgctaa 16080
caaagcccg aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 16140
ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg 16200
atgcgccgcg gggccctatg gtaccagct tttgttcctt ttagtgaggg ttaattccga 16260
gcttggcgta atcatggtca tagctgttct ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc 16320
cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttaggt 16380
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcggtgc 16440
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt 16500
ccgcttcctc gctcactgac tcgctgogct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 16560
ctcactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 16620
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggttt 16680
tccataggct cggccccctt gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 16740
gaaacccgac aggactataa agataccagg cgttcccccc tggaagctcc ctcgtgcgct 16800

ctctgtttcc gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 16860
 tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttecgctcca 16920
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact 16980
 atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 17040
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtaggcta 17100
 actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctcgcc tctgctgaag ccagttacct 17160
 tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggg agcggtaggt 17220
 tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 17280
 tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca 17340
 tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga agttttaaat 17400
 caatctaaag tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagtggag 17460
 cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactg cccgtcgtgt 17520
 agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag 17580
 acccacgctc accgggtcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 17640
 gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 17700
 ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca 17760
 tcgtggtgtc acgctcgtcg tttgggatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 17820
 ggcgagttac atgatcccc atgttgtgaa aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga 17880
 tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gcttatggca gcactgcata 17940
 attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca 18000
 agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 18060
 ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg 18120
 ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 18180
 caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag 18240
 gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa ggcgcacacg gaaatgttga atactcatac 18300
 tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcgataca 18360
 tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt cccgaaaag 18420
 tgccacctga aattgtaaac gttaatat tttgtaaaatt cgcgttaa ttttggttaa 18480
 tcagctcatt ttttaacca taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat 18540
 agaccgagat aggggttagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg 18600
 tggactccaa cgtcaaagg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggcca ctacgtgaac 18660
 catcacccta atcaagtttt ttggggctga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccta 18720

aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag 18780
 ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg 18840
 taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtcccat tcgccattca 18900
 ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagccac 18960
 cgcggtg 18967

<210> 2

<211> 12082

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido pEMC-LSchw

<400> 2

10

aagcttttgc gatcaataaa tggatcacia ccagtatctc ttaacgatgt tcttcgcaga 60
 tgatgattca ttttttaagt atttggetag tcaagatgat gaatcttcat tatctgatat 120
 attgcaaact actcaatata tagactttct gttattatta ttgatccaat caaaaaataa 180
 attagaagcc gtgggtcatt gttatgaatc tctttcagag gaatacagac aattgacaaa 240
 attcacagac tttcaagatt ttaaaaaact gtttaacaag gtccctattg ttacagatgg 300
 aaggggtcaa cttaataaag gatatttgtt cgactttgtg attagtttga tgcgattcaa 360
 aaaagaatcc tctctagcta ccaccgcaat agatcctgtt agatacatag atcctcgctc 420
 caatatcgca ttttctaacg tgatggatat attaaagtcg aataaagtga acaataatta 480
 attctttatt gtcacatga acggcggaca tattcagttg ataatcggcc ccatgttttc 540
 aggtaaaagt acagaattaa ttagacgagt tagacgttat caaatagctc aatataaatg 600
 cgtgactata aaatattcta acgataatag atacggaacg ggactatgga cgcattgataa 660
 gaataatttt gaagcatttg aagcaactaa actatgtgat gtcttggaat caattacaga 720
 tttctccgtg ataggtatcg atgaaggaca gttctttcca gacattgttg aattgatctc 780
 gatcccgca aattaatacg actcactata gggagaccac aacggtttcc ctctagcggg 840
 atcaattccg cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat 900
 aaggccggtg tgcgtttgtc tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg 960
 tgagggcccg gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tctaggggt ctttccctc 1020
 tcgccaaagg aatgcaaggc ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt 1080
 cttgaagaca aacaacgtct gtagcgacc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg 1140
 acaggtgcct ctgcggccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac 1200
 cccagtgcc cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg 1260
 tattcaacaa ggggtgaag gatgccaga aggtaccca ttgtatggga tctgatctgg 1320
 ggccctcgtg cacatgcttt acatgtgtt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc 1380

gaaccacggg gacgtggttt tcctttgaaa aacacgataa taccatggac tcgctatctg	1440
tcaaccagat cttataccct gaagttcacc tagatagccc gatagttacc aataagatag	1500
tagccatect ggagtatgct cgagtcctc acgcttacag cctggaggac cctacactgt	1560
gtcagaacat caagcaccgc ctaaaaaacg gattttccaa ccaaattgatt ataaacaatg	1620
tggaaagtgg gaatgtcatc aagtccaagc ttaggagtta tccggcccac tctcatatc	1680
catatccaaa ttgtaatcag gattttattta acatagaaga caaagagtca acgaggaaga	1740
tccgtgaact cctcaaaaag gggaattcgc tgtactcaa agtcagtgat aaggttttcc	1800
aatgcttaag ggacactaac tcacggcttg gcctaggctc cgaattgagg gaggacatca	1860
aggagaaagt tattaacttg ggagtttaca tgcacagctc ccagtgggtt gagccctttc	1920
tgttttggtt tacagtcaag actgagatga ggtcagtgat taaatcacia acccatactt	1980
gccataggag gagacacaca cctgtattct tcaactggtag ttcagttgag ttgctaactc	2040
ctcgtgacct tgttgctata atcagtaaag agtctcaaca tgtatattac ctgacatttg	2100
aactggtttt gatgtattgt gatgtcatag aggggagggt aatgacagag accgctatga	2160
ctattgatgc taggtataca gagcttctag gaagagtcag atacatgtgg aaactgatag	2220
atggttttct cctgcactc gggaatccaa cttatcaa atgtagccatg ctggagctc	2280
tttcaactgc ttacctgcag ctgagggata taacagtaga actcagaggt gctttcctta	2340
accactgctt tactgaaata catgatgttc ttgaccaaaa cgggttttct gatgaaggta	2400
cttatcatga gtttaactgaa gctctagatt acattttcat aactgatgac atacatctga	2460
caggggagat tttctcat ttcagaagtt tcggccaccc cagacttgaa gcagtaacgg	2520
ctgctgaaaa tgtaggaaa tacatgaatc agcctaaagt cattgtgtat gagactctga	2580
tgaaaggtea tgccatattt tgtggaatca taatcaacgg ctatcgtgac aggcacggag	2640
gcagtggcc accgctgacc ctccccctgc atgctgcaga cacaatccgg aatgctcaag	2700
cttcaggaga agggtaaca catgagcagt gcgttgataa ctggaaatct tttgctggag	2760
tgaaatttgg ctgctttatg cctcttagcc tggatagtga tctgacaatg tacctaaagg	2820
acaaggcact tgctgctctc caaagggaat gggattcagt ttacccgaaa gagttcctgc	2880
gttacgaccc tcccaaggga accgggtcac ggaggcttgt agatgttttc cttaatgatt	2940
cgagctttga cccatattgat gtgataatgt atgttgtaag tggagettac ctccatgacc	3000
ctgagttcaa cctgtcttac agcctgaaag aaaaggagat caaggaaaca ggtagacttt	3060
ttgctaaaaat gacttacaaa atgagggcat gccaaagtgt tgctgaaaaat ctaatctcaa	3120
acgggattgg caaatat tttt aaggacaatg ggatggccaa ggatgagcac gatttgacta	3180
aggcactcca cactctagct gtctcaggag tcccaaaga tctcaaagaa agtcacaggg	3240
gggggccagt cttaaaaacc tactcccgaa gccagtgcca cacaagtacc aggaacgtga	3300

gagcagcaaa agggttttata gggttccctc aagtaattcg gcaggaccaa gacactgac 3360
 atccggagaa tatggaagct tacgagacag tcagtgcatt tatcacgact gatctcaaga 3420
 agtactgcct taattggaga tatgagacca tcagcttggt tgcacagagg cttaatgaga 3480
 ttacaggatt gccctcattt ttccagtggc tgcataagag gcttgagacc tctgtcctgt 3540
 atgtaagtga ccttcattgc ccccccagacc ttgacgcca tatcccgtta tataaagtcc 3600
 ccaatgatca aatcttcatt aagtacccta tgggaggtat agaagggtat tgtcagaagc 3660
 tgtggaccat cagcaccatt ccctatctat acctggctgc ttatgagagc ggagtaagga 3720
 ttgcttcgtt agtgcaaggg gacaatcaga ccatagccgt aacaaaaagg gtaccagca 3780
 catggcccta caaccttaag aaacgggaag ctgctagagt aactagagat tactttgtaa 3840
 ttcttaggca aaggctacat gatattggcc atcacctcaa ggcaaatgag acaattgttt 3900
 catcacattt ttttgtctat tcaaaaggaa tatattatga tgggctactt gtgtcccaat 3960
 cactcaagag catcgcaaga tgtgtattct ggtcagagac tatagttgat gaaacaagg 4020
 cagcatgcag taatattgct acaacaatgg ctaaaagcat cgagagaggt tatgaccgtt 4080
 accttgcata ttccctgaac gtcctaaaag tgatacagca aattctgac tctcttggt 4140
 tcacaatcaa ttcaaccatg acccgggatg tagtcatacc cctcctcaca aacaacgacc 4200
 tcttaataag gatggcactg ttgcccgctc ctattggggg gatgaattat ctgaatatga 4260
 gcaggctgtt tgtcagaaac atcggtgac cagtaacatc atcaattgct gatctcaaga 4320
 gaatgattct cgctcacta atgcctgaag agaccctcca tcaagtaatg acacaacaac 4380
 cgggggactc ttcatctcta gactgggcta gcgaccctta ctcagcaaat cttgtatgtg 4440
 tccagagcat cactagactc ctcaagaaca taactgcaag gtttgcctg atccatagt 4500
 caaaccatgt gttaaaagga ttattccatg atgacagtaa agaagaggac gagggactgg 4560
 cggcattcct catggacagg catattatag tacctagggc agctcatgaa atcctggatc 4620
 atagtgtcac aggggcaaga gagtctattg caggcatgct ggataccaca aaaggcttga 4680
 ttcgagccag catgaggaag ggggggttaa cctctcgagt gataaccaga ttgtccaatt 4740
 atgactatga acaattcaga gcagggatgg tgctattgac aggaagaaag agaaatgtcc 4800
 tcattgacaa agagtcatgt tcagtgcagc tggcgagagc tctaagaagc catatgtggg 4860
 cgaggctagc tcgaggacgg cctatttacg gccttgaggt cctgatgta ctagaatcta 4920
 tgcgaggcca ccttattcgg cgtcatgaga catgtgtcat ctgcgagtgt ggatcagtca 4980
 actacggatg gttttttgtc cctcggggtt gccaaactgga tgatattgac aaggaaacat 5040
 catccttgag agtcccatat attggttcta cactgatga gagaacagac atgaagcttg 5100
 ccttcgtaag agccccaagt cgatccttgc gatctgctgt tagaatagca acagtgtact 5160
 catgggctta cggatgatgat gatagctctt ggaacgaagc ctgggtgttg gctaggcaaa 5220
 gggccaatgt gagcctggag gagctaaggg tgatcactcc catctcaact tcgactaatt 5280

tagcgcatag	gttgagggat	cgtagcactc	aagtgaata	ctcaggtaca	tccttgtcc	5340
gagtggcgag	gtataccaca	atctccaacg	acaatctctc	atttgtcata	tcagataaga	5400
aggttgatac	taactttata	taccaacaag	gaatgcttct	agggttgggt	gttttagaaa	5460
cattgtttcg	actcgagaaa	gataccggat	catctaacac	ggtattacat	cttcacgtcg	5520
aaacagattg	ttgcgtgatc	ccgatgatag	atcatcccag	gatacccagc	tcccgaagc	5580
tagagctgag	ggcagagcta	tgtaccaacc	cattgatata	tgataatgca	cctttaattg	5640
acagagatgc	aacaaggcta	tacaccaga	gccataggag	gcaccttgtg	gaatttgta	5700
catggtccac	accccaacta	tatcacattt	tagctaagtc	cacagcacta	tctatgattg	5760
acctggtaac	aaaatttgag	aaggaccata	tgaatgaaat	ttcagctctc	ataggggatg	5820
acgatatcaa	tagtttcata	actgagtttc	tgctcataga	gccaagatta	ttcactatct	5880
acttgggcca	gtgtgcggcc	atcaattggg	catttgatgt	acattatcat	agaccatcag	5940
ggaaatatca	gatgggtgag	ctgttgatcat	cgttcctttc	tagaatgagc	aaaggagtgt	6000
ttaagtgct	tgtcaatgct	ctaagccacc	caaagatcta	caagaaattc	tggcatgtg	6060
gtattataga	gcctatccat	ggtccttcac	ttgatgctca	aaacttgac	acaactgtgt	6120
gcaacatggt	ttacacatgc	tatatgacct	acctcgacct	gttggtgaat	gaagagttag	6180
aagagtac	atttctcttg	tgtgaaagcg	acgaggatgt	agtaccggac	agattcgaca	6240
acatccaggc	aaaacactta	tgtgttctgg	cagatttgta	ctgtcaacca	gggacctgcc	6300
caccaattcg	aggtctaaga	ccggtagaga	aatgtgcagt	tctaaccgac	catatcaagg	6360
cagaggctat	gttatctcca	gcaggatctt	cgtggaacat	aatccaatt	attgtagacc	6420
attactcatg	ctctctgact	tatctccggc	gaggatcgat	caaacagata	agattgagag	6480
ttgatccagg	attcattttc	gacgccctcg	ctgaggtaaa	tgtcagtcag	ccaaagatcg	6540
gcagcaacaa	catctcaa	atgagcatca	aggctttcag	acccccacac	gatgatgttg	6600
caaaattgct	caaagatatc	aacacaagca	agcacaatct	tcccatttca	gggggcaatc	6660
tcgccaatta	tgaaatccat	gctttccgca	gaatcgggtt	gaactcatct	gcttgctaca	6720
aagctgttga	gatatcaaca	ttaattagga	gatgccttga	gccaggggag	gacggcttgt	6780
tcttgggtga	gggatcgggt	tctatgttga	tcacttataa	agagatactt	aaactaaaca	6840
agtgccttcta	taatagtggg	gtttccgcca	attctagatc	tgggtcaaagg	gaattagcac	6900
cctatccctc	cgaagttggc	cttgtcgaac	acagaatggg	agtaggtaat	attgtcaaag	6960
tgctcttta	cgggaggccc	gaagtcacgt	gggtaggcag	tgtagattgc	ttcaatttca	7020
tagttagtaa	tatccctacc	tctagtgtgg	ggtttatcca	ttcagatata	gagaccttgc	7080
ctgacaaaaga	tactatagag	aagctagagg	aattggcagc	catcttatcg	atggctctgc	7140
tcttgggcaa	aataggatca	atactggtga	ttaagcttat	gcctttcagc	ggggattttg	7200

```

ttcagggatt tataagttat gtagggctctc attatagaga agtgaacctt gtatacccta 7260
gatacagcaa cttcatctct actgaatctt atttggttat gacagatctc aaggetaacc 7320
ggctaataaa tcctgaaaag attaaagcagc agataattga atcatctgtg aggacttcac 7380
ctggacttat aggtcacatc ctatccatta agcaactaag ctgcatacaa gcaattgtgg 7440
gagacgcagt tagtagaggt gatatcaatc ctactctgaa aaaacttaca cctatagagc 7500
aggtgctgat caattgcggg ttggcaatta acggacctaa gctgtgcaaa gaattgatcc 7560
accatgatgt tgcctcaggg caagatggat tgcttaattc tatactcatc ctctacaggg 7620
agttggcaag attcaaagac aaccaaagaa gtcaacaagg gatgttccac gcttaccocg 7680
tattggtaag tagcaggcaa cgagaactta tatctaggat caccgcgcaa ttctgggggc 7740
acattcttct ttactcggg aacaaaaagt tgataaataa gtttatccag aatctcaagt 7800
ccggctatct gatactagac ttacaccaga atatcttctg taagaatcta tccaagtcag 7860
agaaacagat tattatgacg ggggggttga aacgtgagtg ggtttttaag gtaacagtca 7920
aggagaccaa agaatggtat aagttagtcg gatacagtcg cctgattaag gactaattgg 7980
ttgaactccg gaaccctaatt cctgccctag gtgggttaggc attatttacc tcgagggggc 8040
cggatocact agttctagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8100
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa acgtcgcgca ggtgacaatg tcgagctagc tatgaattcc 8160
ccggggagct cactagtga tccctgcagc tcgagaggcc taattaatta agtcgacgat 8220
ccggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa 8280
ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga 8340
actatatccg gatcgagatc aattctgtga gcgtatggca aacgaaggaa aaatagttat 8400
agtagccgca ctcgatggga catttcaacg taaaccgttt aataatattt tgaattttat 8460
tccattatct gaaatggtgg taaaactaac tgctgtgtgt atgaaatgct ttaaggaggc 8520
ttccttttct aaacgattgg gtgaggaaac cgagatagaa ataataggag gtaatgatat 8580
gtatcaatcg gtgtgtagaa agtggtacat cgactcataa tattatattt tttatctaaa 8640
aaactaaaaa taaacattga ttaaatttta atataatact taaaaatgga tgtgtgtctg 8700
ttagataaac cgtttatgta ttttgaggaa attgataatg agttagatta cgaaccagaa 8760
agtgcaaatg aggtcgcaaa aaaactgccg tatcaaggac agttaaact attactagga 8820
gaattatttt ttcttagtaa gttacagcga cacggatatat tagatgggtgc caccgtagtg 8880
tatataggat ctgctcccg tacacatata cgttatttga gagatcattt ctataattta 8940
ggagtgatca tcaaattgat gctaattgac ggccgccatc atgacccat tttaaatgga 9000
ttgcgtgatg tgactctagt gactcggttc gttgatgagg aatatctacg atccatcaaa 9060
aaacaactgc atccttctaa gattatttta atttctgatg tgagatccaa acgaggagga 9120
aatgaaccta gtacggcgga ttactaagt aattacgctc taçaaaatgt catgattagt 9180

```

atTTTaaacc	ccgtggcgtc	tagtcttaaa	tggagatgcc	cgTTTccaga	tcaatggatc	9240
aaggactttt	atatcccaca	cggtaataaa	atgttacaac	ctTTTgctcc	ttcatattca	9300
gggcccgcgt	tttacaacgt	cgtgactggg	aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaatcgcc	9360
ttgcagcaca	ttcccctttc	gccagctggc	gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	9420
cttcccaaca	gttgcgcgag	ctgaatggcg	aatggcgcg	cgcgccctgt	agcgggcgcat	9480
taagcgcgcc	gggtgtggtg	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	agcgccctag	9540
cgcccgcctc	tttcgctttc	ttcccttcct	ttctcgccac	gttcgcccgc	tttcccgcgc	9600
aagctctaaa	tcgggggctc	cctttagggg	tccgatttag	tgctttacgg	cacctcgacc	9660
ccaaaaaact	tgattagggg	gatggttcac	gtagtggggc	atcgccctga	tagacggttt	9720
ttcgcccttt	gacgttgagg	tccacgttct	ttaatagtgg	actcttggtc	caaactggaa	9780
caacactcaa	ccctatctcg	gtctattctt	ttgatttata	agggattttg	ccgatttcgg	9840
cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaaatTT	aacaaaatat	9900
taacgtttac	aatttcccag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	9960
tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	10020
gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttcogtg	tcgcccttat	10080
tccttttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	10140
aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaaactg	atctcaacag	10200
cggtaaagtc	cttgagaggt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	10260
agttctgcta	tgtggcgcg	tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	10320
ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	10380
tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataacac	10440
tgccggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	10500
caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	10560
accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	10620
attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	10680
ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttcgg	gctggctggg	ttattgctga	10740
taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	10800
taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggtgaacg	10860
aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	10920
agtttactca	tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	10980
ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	11040
ctgagcgcca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	11100

cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 11160
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 11220
tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 11280
tacatacctc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtctgtg 11340
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 11400
gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 11460
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatatcc 11520
ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cagcaggag cttccagggg gaaacgcctg 11580
gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 11640
ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 11700
ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttctcgcg ttatcccctg attctgtgga 11760
taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 11820
cagcaggtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 11880
gcgttggcg attcattaat gcagctggca cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag 11940
tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 12000
tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa 12060
cagctatgac catgattacg cc 12082

<210> 3

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 3

10

atctggcacc acaccttcta caatgagctg cg

32

<210> 4

<211> 32

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 4

20

cgtcatactc ctgctgtctg atccacatct gc

32

<210> 5

<211> 25

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5	
attgggtctg ggaacatttc tcttc	25
5 <210> 6	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
10 <223> Cebador	
<400> 6	
gtgagattta aacattcctc ttcgg	25
15 <210> 7	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
20 <223> Cebador	
<400> 7	
gagcaacttc ttcaaccac	20
25 <210> 8	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
30 <223> Cebador	
<400> 8	
gaacaccagc atcttctcca	20
35 <210> 9	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
40 <223> Cebador	
<400> 9	
gaacgattcc atcactatcc	20
45 <210> 10	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
50 <223> Cebador	
<400> 10	
ggcatcatta tatttcgca	20
55 <210> 11	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	

ES 2 550 938 T3

<223> Cebador
<400> 11

cttctcagca gatacatcag 20

5

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador
<400> 12

gttacaagtc caaagtctcc 20

15

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Epítipo MSLN 531-539
<400> 13

Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val
1 5

25

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Epítipo MSLN 541-550
<400> 14

Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu
1 5 10

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar células dendríticas vacunales destinadas a tratar un mesotelioma maligno en un individuo, que comprende las siguientes etapas:
5
 - infección *in vitro* de células de mesotelioma maligno recogidas del individuo por una cepa de sarampión atenuada para producir un lisado celular;
 - poner en contacto células dendríticas con el lisado celular para producir células dendríticas vacunales.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células dendríticas provienen del individuo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las células dendríticas son células dendríticas obtenidas de monocitos.
- 15 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el mesotelioma maligno es un mesotelioma pleural maligno.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus atenuado del sarampión es una cepa Edmonston.
20
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el virus atenuado del sarampión se selecciona entre el grupo que consiste en una cepa Schwartz y una cepa Moraten.
7. Células dendríticas vacunales que pueden obtenerse por el método de acuerdo con cualquiera de las
25 reivindicaciones 1 a 6, en el que dichas células dendríticas vacunales sobreexpresan CD80, CD83, CD86, CD40 y HLA-ABC y producen IL-6, IL-1 β , TNF α e IFN α .
8. Una composición farmacéutica que comprende células dendríticas vacunales de acuerdo con la reivindicación 7 como principio activo, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
30
9. Células dendríticas vacunales de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de mesotelioma maligno en un individuo.
10. Células dendríticas vacunales de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso de acuerdo con la
35 reivindicación 9, en las que el mesotelioma maligno es mesotelioma pleural maligno.

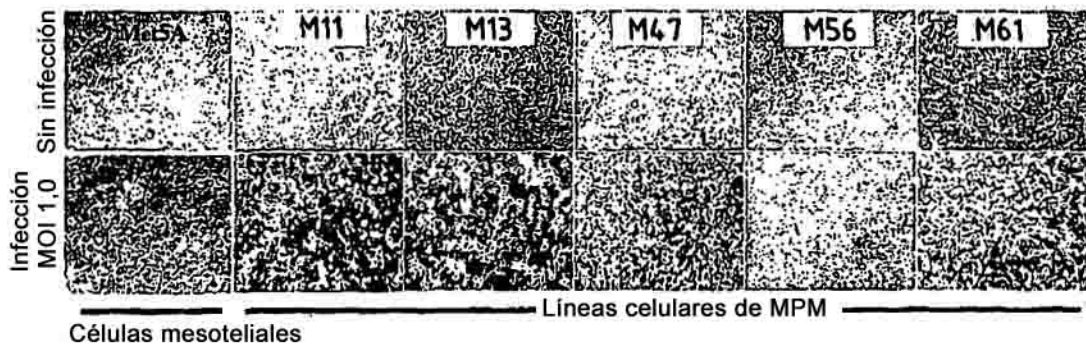


FIG.1

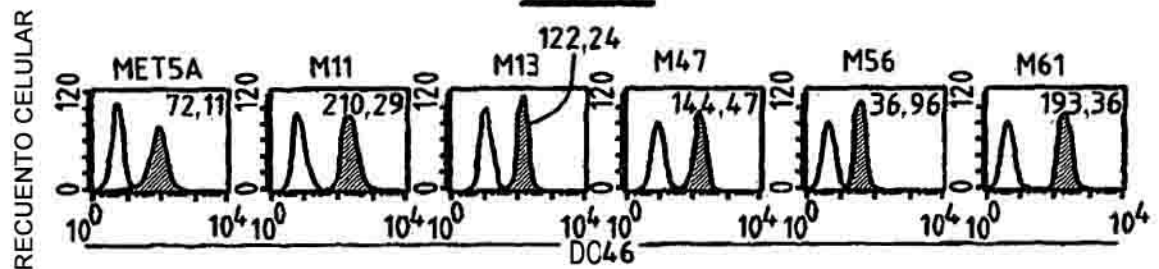


FIG.2

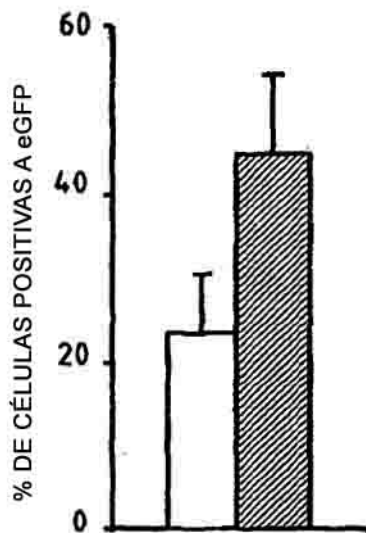


FIG.3

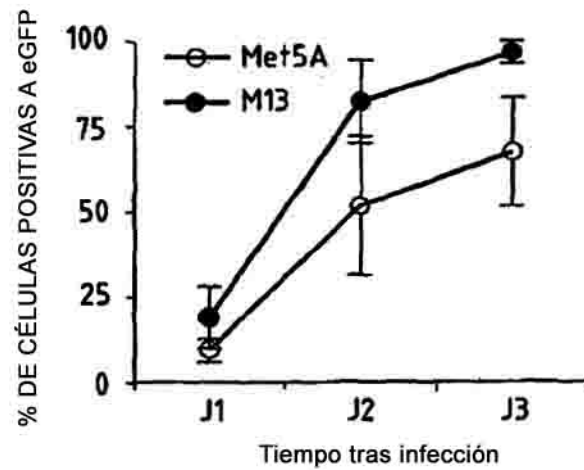


FIG.4

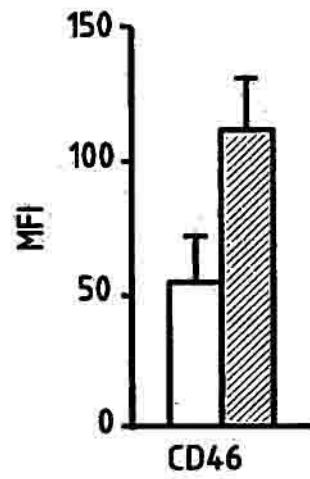


FIG.5

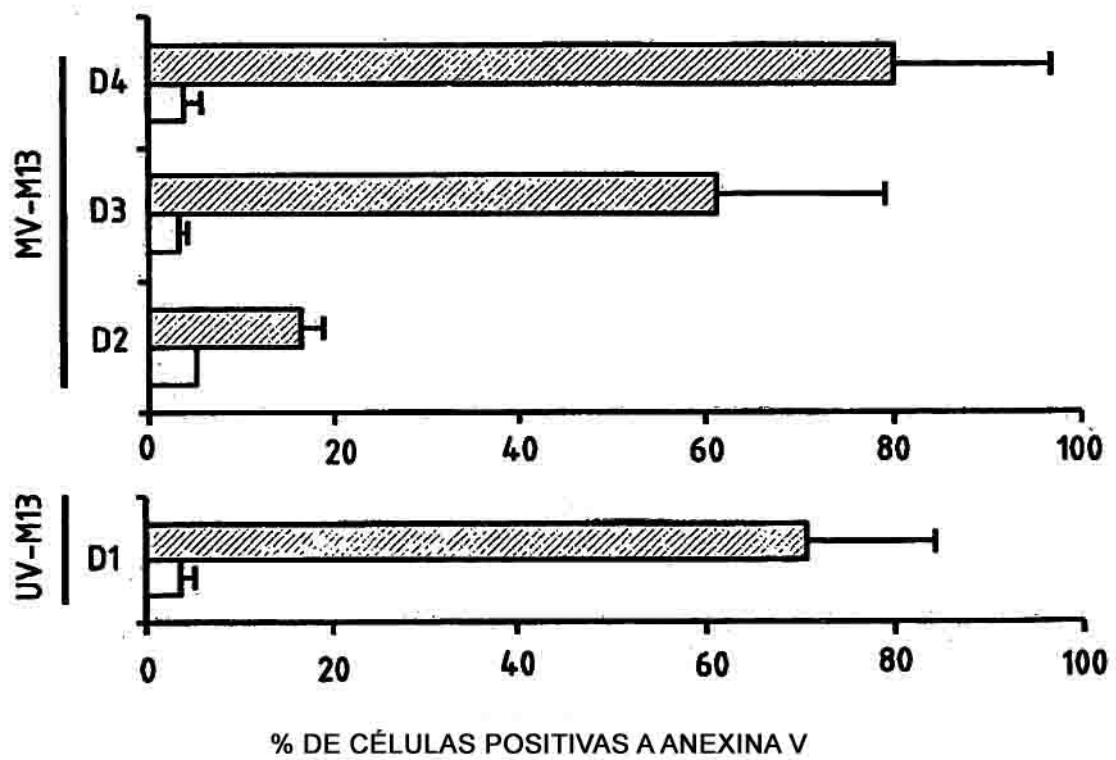


FIG.6

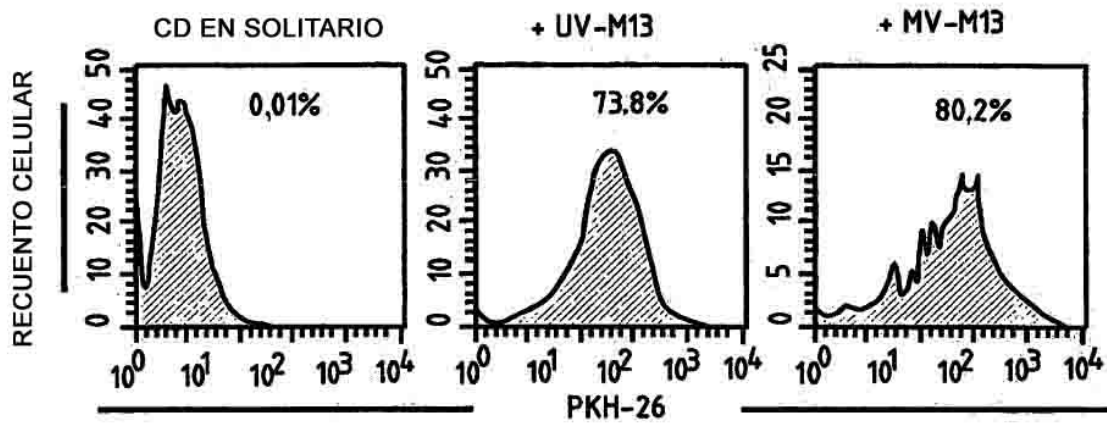


FIG.7

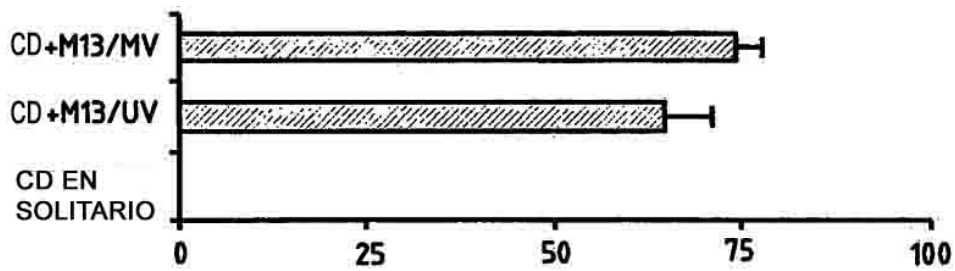


FIG.8

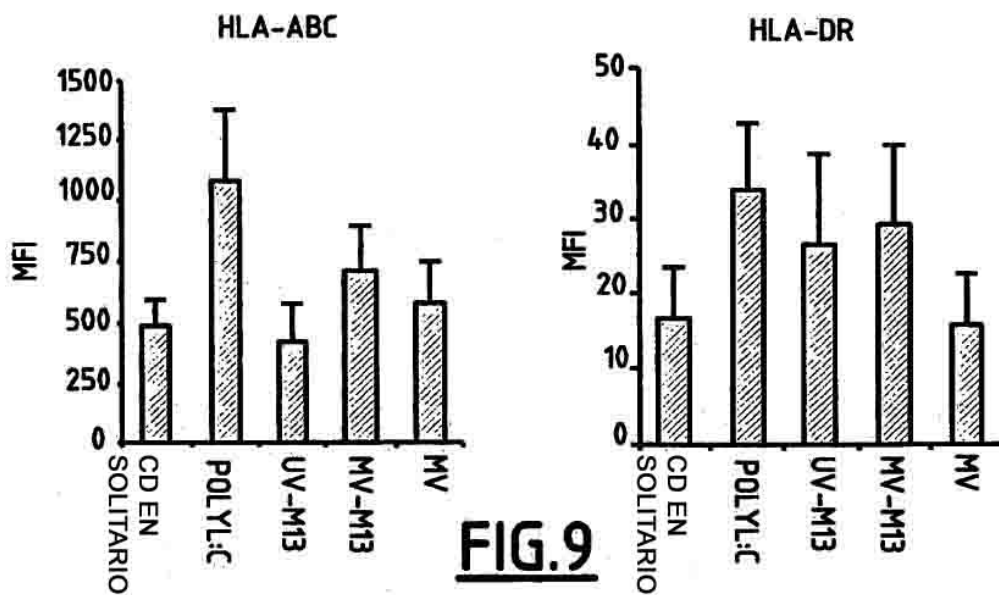


FIG.9

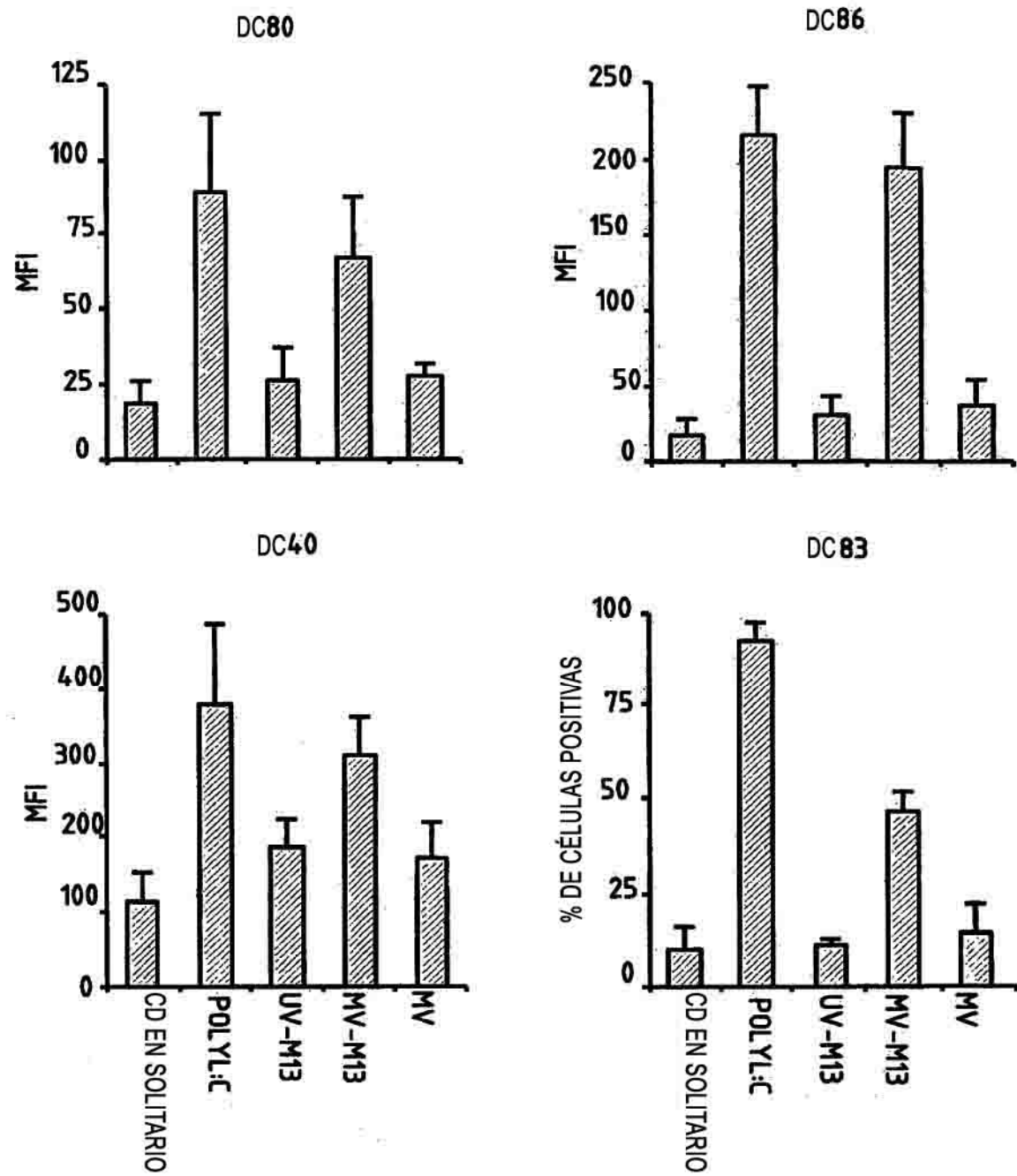


FIG.10

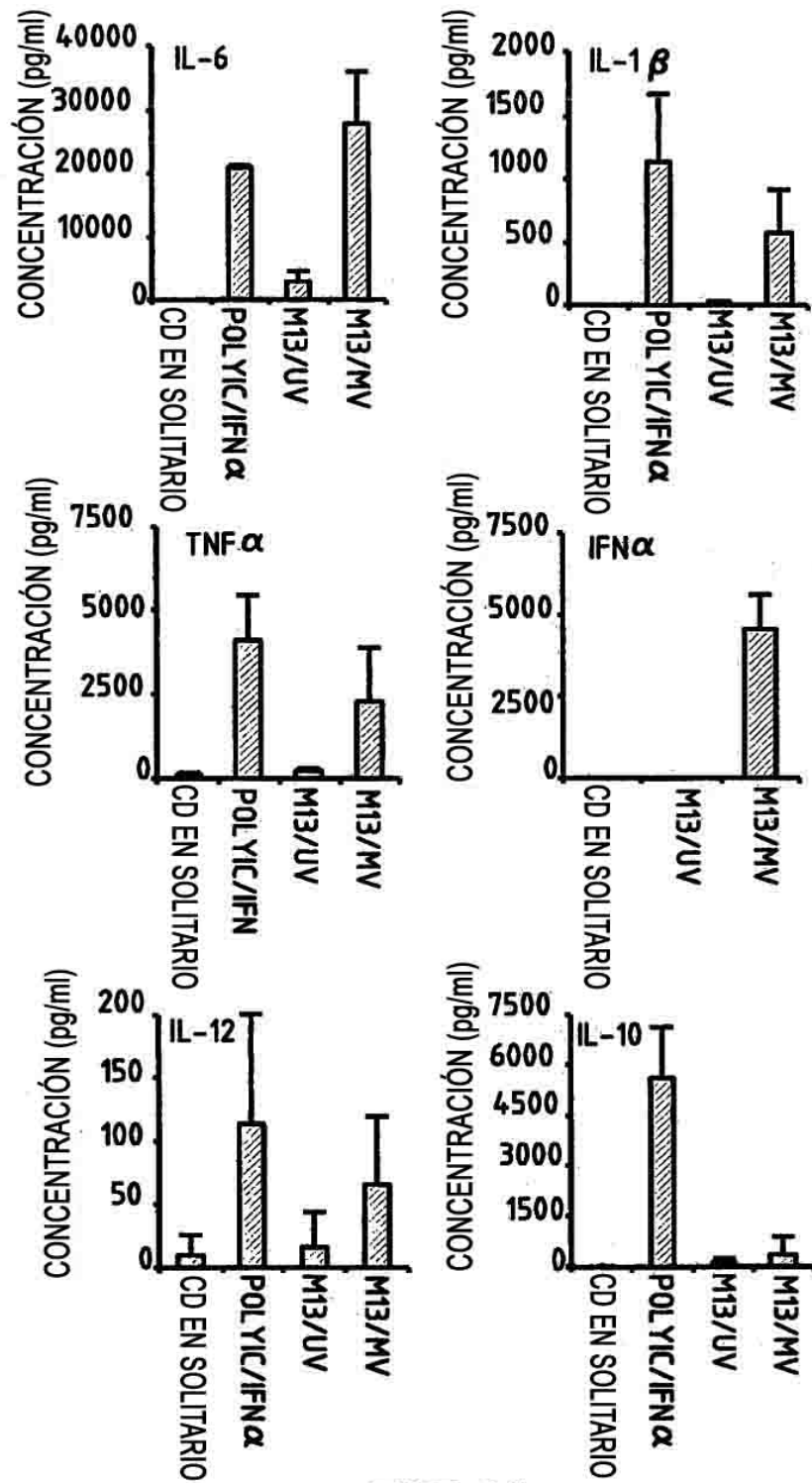


FIG.11

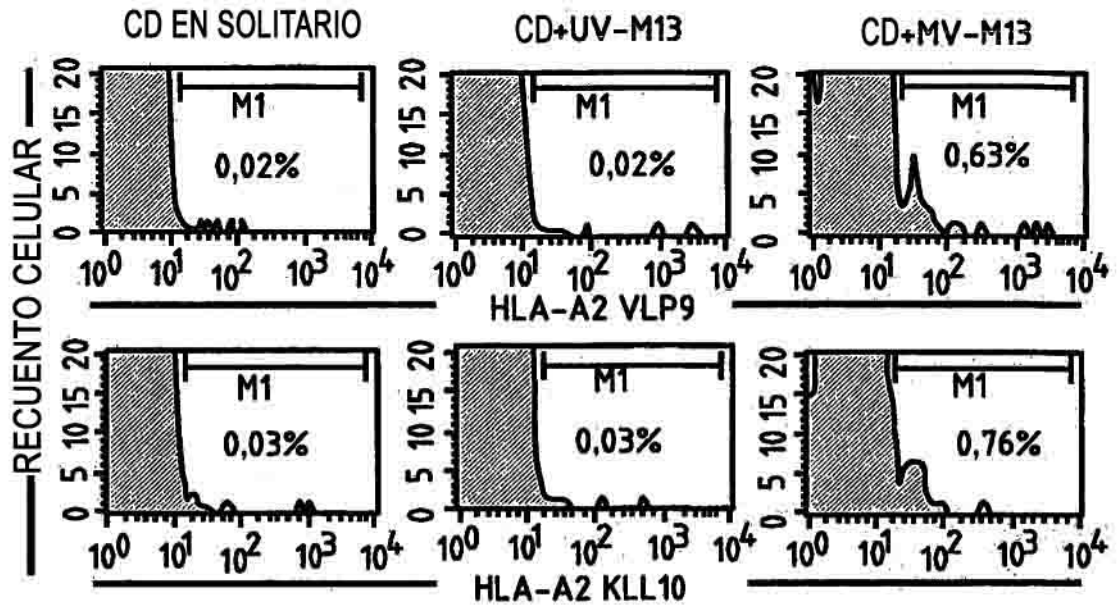


FIG.12