

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 336**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2010 PCT/US2010/038996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10148203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10790193 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2443242**

54 Título: **Células productoras para vectores retrovirales de replicación competente**

30 Prioridad:

17.06.2009 US 218063 P

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**TOCAGEN INC. (100.0%)
3030 Bunker Hill Street Suite 230
San Diego, CA 92109**

72 Inventor/es:

**JOLLY, DOUGLAS, J. y
IBANEZ, CARLOS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 609 336 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

Células productoras para vectores retrovirales de replicación competente

5 **Referencia a solicitudes de patente relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad a tenor de 35 U.S.C. §119 sobre la solicitud provisional de n.º de serie 61/218,063, presentada el 17 de junio de 2009.

10 **Campo de la técnica**

La divulgación se refiere a métodos para producir vectores retrovirales recombinantes de replicación competente, líneas celulares útiles para producir tales vectores y métodos de fabricación y utilización de las líneas celulares.

15 **Antecedentes**

El ciclo de vida de los retrovirus implica una etapa donde el material genético del virus se inserta en el genoma de una célula huésped. Esta etapa es esencial porque el ácido nucleico viral insertado, el provirus, se replica a través de la maquinaria de la célula huésped.

20 Como parte de este proceso, el genoma de ARN del retrovirus se replica a través de un intermedio de ADN bicatenario antes de la inserción en el genoma de la célula huésped. La conversión inicial de la molécula de ARN viral en una molécula de ADN de doble cadena (ADNdc) se realiza mediante una transcriptasa inversa. El ADNdc se integra a continuación en el genoma de la célula huésped mediante una integrasa para replicarse adicionalmente
25 mediante la maquinaria de la célula huésped. La transcriptasa inversa y la integrasa necesarias para la conversión del ARN en ADNdc y para la integración en el genoma del huésped son transportadas dentro de la partícula vírica durante la infección. El ADN proviral se transcribe finalmente utilizando la maquinaria huésped en múltiples copias de ARN. Estas moléculas de ARN se traducen después en péptidos o proteínas virales o se integran en partículas víricas que se liberan de la célula al medio o el medio extracelular.

30 Un genoma de ARN retroviral generalmente comprende 6 regiones típicas que conducen a la expresión de múltiples proteínas. Estas regiones incluyen las secuencias de los genes *gag*, *pol* y *env* asociadas con una señal de empaquetamiento, una señal psi (ψ) y flanqueadas por regiones de repetición terminal largas en 5' y / o 3'. El gen *gag* conduce a la expresión de los componentes proteicos del núcleo nucleoproteico del virus, mientras que los
35 productos del gen *pol* están implicados en la síntesis de polinucleótidos y recombinación. El gen *env* codifica los componentes de la envuelta de la partícula de retrovirus. Las regiones LTR 5' y 3' incluyen promotores y ayudan a la integración del genoma viral en el ADN cromosómico de la célula huésped. La señal psi se refiere a la señal de empaquetado retroviral que controla el empaquetamiento eficiente del ARN en la partícula vírica.

40 Debido a su capacidad para formar provirus, los retrovirus son útiles para modificar el genoma de una célula diana o huésped y se han hecho diversas modificaciones a los retrovirus para su uso en terapia génica. La terapia génica usando vectores retrovirales se realiza generalmente añadiendo un polinucleótido heterólogo al genoma viral que
45 codifica o produce un polipéptido o transcrito de interés, empaquetando el genoma recombinante en una partícula vírica e infectando una célula huésped diana. A continuación, la célula diana incorporará el gen exógeno como una parte de un provirus.

La mayoría de los vectores retrovirales se han vuelto "defectuosos" para evitar la propagación incontrolada y la producción de viriones. Sin embargo, se ha informado poco sobre el desarrollo de sistemas de vectores retrovirales competentes para la replicación.

50 En el documento XP55039486 (Carsten Finger et al 2005; Cancer Gene Therapy, vol. 12, páginas 464 to 474) se describen vectores retrovirales en replicación que mediaban la producción y la secreción continuas de productos génicos terapéuticos a partir de células cancerosas.

55 En el documento XP55064325 (Thorsten S Gutjahr: 16 March 2000, páginas 1-114) se describe una línea celular HT1080 productora de retrovirus.

Sumario

60 La divulgación proporciona líneas celulares y células productoras de partículas víricas útiles para producir vectores retrovirales recombinantes competentes para la replicación para terapia génica.

65 La divulgación proporciona generalmente una línea celular productora de retrovirus para la producción de una partícula de retrovirus competente para la replicación, comprendiendo la línea celular una línea celular de fibrosarcoma, de osteosarcoma o de timoma, expresando de forma estable dicha línea celular una genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, un polinucleótido heterólogo y un factor psi

retroviral (Ψ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona específicamente una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce una partícula de retrovirus competente para la replicación, expresando de forma estable
5 dicha línea celular HT1080 un genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, polinucleótido heterólogo y el factor *psi* retroviral (Ψ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante, donde la partícula de retrovirus competente para la replicación comprende el genoma retroviral recombinante y donde la línea celular HT1080 se ha adaptado para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona específicamente un método para producir una línea
10 celular productora de retrovirus como se ha definido anteriormente, comprendiendo el método: transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende, de 5' a 3': Una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano con una región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; señal ψ de empaquetamiento; una
15 secuencia de codificación de gag para el antígeno específico del grupo de MLV; una secuencia de codificación de pol para la poliproteína polimerasa de MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; una secuencia de codificación 4070A para la proteína de la cubierta de la cepa 4070A de MLV; un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador de ácido nucleico; una secuencia de codificación de la citosina desaminasa modificada; una tira de polipurina; y una repetición terminal larga U3-R-U5 de MLV; cultivar las células
20 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, produciendo de este modo una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación; y adaptar línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación y adaptar la línea celular HT1080 productora de retrovirus para su cultivo en medio sin suero y en suspensión.

En una realización, la partícula de retrovirus competente para la replicación se expresa de manera estable. En otra
25 realización, la semivida es mayor que 7 días a 2-8 °C. En otra realización más, las partículas víricas producidas a partir de la línea celular no muestran pérdida de infectividad después de 12 meses de almacenamiento de la línea celular a 65 °C. En otra realización más, el vector producido es aproximadamente 100 % estable durante 3 meses o
30 más y el mismo vector producido a partir de una línea celular transfectada transitoriamente con el mismo retrovirus competente para la replicación pierde al menos cinco veces la actividad a las 2 a 8 semanas en las mismas condiciones de almacenamiento, en comparación con los títulos iniciales. En otra realización más, el retrovirus competente para la replicación comprende: una proteína GAG retroviral; una proteína POL retroviral; una envoltura
35 retroviral; un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminales largas (LTR) en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico gag, un dominio de ácido nucleico pol y un dominio de ácido nucleico env; un casete que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o un dominio de ácido nucleico regulador unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, donde el casete se sitúa de 5' a 3' de LTR y en 3' del dominio de ácido nucleico env que codifica la
40 envoltura retroviral; y secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetado e integración en una célula diana, donde el RCR mantiene una mayor competencia de replicación después de 6 pases en comparación con un vector pACE. En una realización, la secuencia polinucleotídica retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o el virus de la leucemia de mono de gibón (GALV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous, el virus de la leucemia de
45 gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114. En una realización adicional, el MLV es un LMV anfitriónico. En otra realización más, el retrovirus es un gammaretrovirus. En una realización, la secuencia promotora está asociada con un gen regulador del crecimiento. En aún otra realización, el dominio regulador de ácido nucleico comprende un promotor pol II. En otra realización más, la secuencia promotora comprende una secuencia promotora específica de tejido, tal como un elemento de respuesta a andrógenos. En una realización, el
50 elemento de respuesta a andrógenos deriva de un promotor de probasina.

El vector retroviral producido por la línea celular productora comprende varios dominios. Por ejemplo, el promotor
55 comprende un promotor de CMV que tiene una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más bases de ácido nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción; un polinucleótido del dominio R-U5 de CMV comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 a
60 aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos 95 % idénticas a una secuencia como se expone en las SEQ ID N° 19, 20 o 22, donde el polinucleótido estimula la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma; el dominio de ácido nucleico gag comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 a aproximadamente el nucleótido 2819 de las SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad de al menos el 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % con la misma; el domino pol comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de la misma; el domino env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 a
65 aproximadamente el nucleótido 8323 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de la misma; el IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el

nucleótido número 8327 a aproximadamente el nucleótido 8876 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 95 %, 98 % o 99 % de la misma; y el ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en las SEQ ID NO:3, 5, 11, 13, 15 o 17.

5 La divulgación también proporciona una preparación libre de células que comprende partículas víricas obtenidas de la línea celular productora de retrovirus descrita en el presente documento. En algunas realizaciones se prepara una preparación farmacéutica a partir de las partículas víricas aisladas.

10 La invención también proporciona un método para producir una línea celular productora de vectores descrita en el presente documento, que comprende transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende de 5' a 3': Una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano con una región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; señal ψ de empaquetamiento; una secuencia de codificación de gag para el antígeno específico del grupo de MLV; una secuencia de codificación de pol para la poliproteína polimerasa de MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; una secuencia de codificación 4070A para la proteína de la cubierta de la cepa 4070A de MLV; un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador de ácido nucleico; una secuencia de codificación de la citosina desaminasa modificada; una tira de polipurina; y una repetición terminal larga U3-R-U5 de MLV; cultivar las células 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, produciendo de este modo una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación; y adaptar línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación y adaptar la línea celular HT1080 productora de retrovirus para su cultivo en medio sin suero y en suspensión. La divulgación también proporciona una línea celular generada por el método anterior.

25 La divulgación también proporciona un método para producir una composición para terapia génica que comprende cultivar la línea celular descrita en el presente documento para producir partículas víricas y purificar sustancialmente las partículas víricas.

30 La divulgación también proporciona un banco celular que comprende la línea celular de la divulgación. En algunas realizaciones, la línea celular de la divulgación se cultiva en suspensión. En algunas realizaciones, la línea celular de la divulgación se cultiva en medio libre de suero. En alguna realización, la línea celular se cultiva en medio libre de suero.

35 Se presenta una copia electrónica de una lista de secuencias y se incorpora en el presente documento en su totalidad.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en las figuras y la descripción adjunta que se presentan a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción y figuras y de las reivindicaciones.

40

Descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un proceso general de producción de una línea celular productora y un banco de la divulgación.

45 La **Figura 2** muestra un gráfico de datos de muerte celular que muestran que los vectores modificados son más eficaces en comparación con el CD original de tipo salvaje. El gráfico también muestra que la estructura principal modificada (T5.0007) es más eficaz destruyendo que la estructura principal de pACE-CD. También se muestra una tabla que cataloga las diversas construcciones de vectores y sus nombres.

50 La **Figura 3A-F** muestra (a) un esquema de un vector retroviral recombinante de la divulgación; (b y c) un mapa del plásmido de un polinucleótido de la divulgación (Promotor de CMV:1 - 582; R: 583 - 650; U5: 651 - 1202; sitio de unión al cebador (PBS):728 - 776; sitio de corte y empalme en 5': 788 - 789; gag: 1203 - 2819; pol: 2820 - 6358; sitio de corte y empalme en 3': 3314 - 3315; 4070A env: 6359 - 8323; IRES de EMCV: 8327 - 8876; yCD2:8877 - 9353; tira de polipurina (PPT): 9386 - 9404; U3:9405 - 9854; R:9855 - 9921; U5:9922 - 9998; (d y e) a una secuencia de un polinucleótido de la divulgación (SEQ ID NO:19); (f) un esquema de una RCR de primera y segunda generación de la divulgación.

55 La **Figura 4** muestra que se observan niveles más altos de proteína yCD2 en comparación con la proteína yCD de tipo salvaje en células U - 87 infectadas.

60 La **Figura 5** muestra que un vector de la divulgación es genéticamente estable después de 12 ciclos de pases virales según se evaluó usando amplificación por PCR. La figura también demuestra que los vectores de la divulgación son más estables después de pases más largos comparados con el vector pACE-CD (Kasahara et al.). En particular, pAC3-CD es más estable que pACE- CD, lo que demuestra que la estructura principal cambiada ha hecho que el vector sea más estable. Además, pACE-yCD1 (T5.0001) y -yCD2 (T5-0002) son más estables que pAC-yCD.

65 La **Figura 6A-B** muestra actividad de destrucción de células. (A) Ensayos de muerte celular; y (B) actividad específica de citosina desaminasa de células infectadas con diferentes vectores. (A) muestra que la citosina desaminasa y el vector de la divulgación destruyen las células infectadas al menos tan bien y tal vez mejor que el

original pACE-CD cuando las células infectadas con U87 están expuestas a niveles crecientes de 5-FC. (B) muestra que la actividad de CD específica de la divulgación (T5.0007, T5.0001 y T5.0002) está aumentada en comparación con pACE-CD (T5.0000) y es está en el orden $T5.0000 < T5.0007 < T5.0001 < T5.0002$.

La **Figura 7** muestra que los tumores U-87 (humanos) tratados con el vector CD de la divulgación (también denominados "Toca 511", "pAC3-yCD2 (V)" y "T5.0002", véase, por ejemplo, la Figura 2) *in vivo* y explantados de ratones tratados con 4 ciclos de 5-FC siguen siendo sensibles al fármaco.

La **Figura 8** muestra información de dosificación en un modelo de ratón de xenoinjerto humano (U87) de cáncer de cerebro.

La **Figura 9** muestra información de dosificación y el efecto terapéutico en un modelo de ratón singénico.

La **figura 10** muestra las curvas de dosis de potencia (véase el ejemplo 8) para el lote T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) a los 12 meses a ≤ -65 °C.

La **figura 11** muestra curvas de COSE de potencia para 3 lotes, M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) a los 6 meses a ≤ -65 °C.

La **figura 12** muestra los títulos diarios de los candidatos clonales HT1080 + T5.0002 para la producción de títulos de cultivos confluentes.

La **figura 13** muestra la propagación viral del vector T5.0006 (GFP) en tres líneas celulares de glioma canino a los días 1, 3 y 6 días de infección.

La **figura 14** muestra las tendencias de los títulos medidos de los lotes T003-002-40L y GMP a ≤ -65 °C durante 12 meses.

La **figura 15** muestra análisis de la transducción de Toca 511 y Toca 621 sobre la cinética del crecimiento de células tumorales S91 subQ. Se inyectaron tumores S91 con el vector 10 días después de la implantación.

La **figura 16** muestra la extensión de T5.0006 purificado (vector GFP) producido en una línea productora estable a través de tumores subcutáneos U87 en ratones desnudos, con el tiempo (0, 5, 9, 12, 26 días).

25 Descripción detallada

Como se usa en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, las formas "uno", "una" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales genes y la referencia a "el vector" incluye la referencia a uno o más vectores, y así sucesivamente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica de los métodos y composiciones divulgados se pueden usar cualquier método y reactivo similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen ejemplos de métodos y materiales.

Asimismo, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. De forma similar, "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

También se entenderá que cuando las descripciones de diversas realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderían que, en algunos casos específicos, una realización se puede describir de forma alternativa utilizando un lenguaje "consistente esencialmente en" o "que consiste en".

Las publicaciones tratadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan ricamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento nada se tiene que interpretar como admisión de que los inventores no tienen el derecho de antedatar dicha divulgación en virtud de la divulgación previa.

El término "RCR" tal como se utiliza en el presente documento pretende significar un retrovirus competente para la replicación (RCR). Un virus competente para la replicación es una partícula vírica que tiene la capacidad para replicarse por sí misma en una célula huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector plasmídico de RCR" significa un plásmido que incluye todo o parte de un genoma retroviral, que incluye secuencias retrovirales de repetición largas (LTR), una señal de empaquetamiento (ψ), y pueden incluir uno o más polinucleótidos que codifican una o más proteínas o polipéptidos de interés, tal como un agente terapéutico o un marcador seleccionable. El término "terapéutico" se usa en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de reemplazo.

Los términos "que transfecta" o "transfección" tal como se usan en el presente documento, se entiende que significan la transferencia de al menos un ácido nucleico exógeno en una célula. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN o una combinación de ambos. El ácido nucleico exógeno se refiere a un ácido nucleico que no se encuentra como resultado de la división celular del huésped o la multiplicación de la célula huésped.

Con el término "virus" tal como se usa en el presente documento se pretende significar el virus físico o partícula de

retrovirus.

La expresión "línea celular", como se usa en el presente documento, se refiere a células cultivadas que se pueden pasar (dividir) más de una vez. La divulgación se refiere a líneas celulares que se pueden pasar más de 2 veces, hasta 200 veces o más e incluye cualquier número entero entre ellas.

Las expresiones "expresión estable" y "que se expresa de forma estable" como se usa en el presente documento se entiende que significan que el material genético se está expresando de forma estable y/o está integrado de forma permanente y estable en el genoma de la célula huésped y, por lo tanto, tiene el mismo potencial de expresión en el tiempo que el material genético nativo de la célula huésped.

Las expresiones "expresión transitoria" y "que se expresa de forma transitoria" como se usa en el presente documento se entiende que significan que el periodo de expresión del material genético es temporal y/o no está integrado de forma permanente y estable en el genoma de la célula huésped y, por lo tanto, no tiene el mismo potencial de expresión en el tiempo que el material genético nativo de la célula huésped.

Como se usa en el presente documento, el término secuencia de ácido nucleico "heteróloga" o transgén se refiere a (i) una secuencia que normalmente no existe en un retrovirus de tipo salvaje, (ii) una secuencia que se origina a partir de una especie extraña o (iii) si procede de la misma especie, se puede modificar sustancialmente de su forma original. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico sin cambios que no se expresa normalmente en una célula es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

El término "terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una acción que previene, invierte o retarda el curso natural de una enfermedad o sus síntomas. Una acción terapéutica puede ser preventiva, curativa o simplemente paliativa y no significa que el paciente humano o animal afectado no muera de la enfermedad.

En un aspecto, una línea celular productora de la divulgación es capaz de crecer en suspensión o en un medio libre de suero. La línea celular productora también puede crecer tanto en medio libre de suero como en suspensión simultáneamente. Aunque el medio libre de suero y la capacidad para crecer en suspensión son las condiciones típicas, las células de la divulgación (por ejemplo, células 293T) pueden cultivarse de manera adherente con medio que contenga suero normal para lograr fines concretos. Tales fines pueden ser, por ejemplo, facilitar la transfección de células o seleccionar clones de células. En la presente invención, la línea celular HT180 se ha adaptada para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

El tipo de células productoras utilizadas para generar el retrovirus (descrito con más detalle a continuación) es útil para la producción de partículas víricas competentes para la replicación para liberación génica y terapia génica.

La divulgación proporciona un método para generar una línea celular productora que comprende transformar o transfectar un primer tipo de células de mamífero con un vector de plásmido de RCR de la divulgación, cultivar el primer tipo de célula para producir partículas retrovirales, obtener un medio libre de células del primer tipo celular que produce las partículas retrovirales, donde el medio libre de células comprende partículas retrovirales, poner en contacto un segundo tipo de célula de mamífero con el medio para infectar el segundo tipo de células y cultivar el segundo tipo de células para producir una línea celular productora que produce un vector retroviral competente para la replicación para su uso en la transformación de células de mamíferos. El primer tipo de célula puede ser casi cualquier tipo de célula de mamífero que sea capaz de producir virus después de la transfección y puede incluir células HeLa, COS, de ovario de hámster chino (CHO) y HT1080, y la transfección puede ser con fosfato cálcico u otros agentes, tales como formulaciones lipídicas conocidas por los expertos en la técnica como útiles para la transfección.

En la presente invención, el primer tipo de célula es una célula 293 de riñón embrionario humano (también denominada a menudo células HEK 293, células 293, o menos exactamente células HEK), que son una línea celular derivada originalmente de células renales embrionarias humanas cultivadas en cultivo tisular. Las células HEK 293 se generaron mediante la transformación de cultivos de células renales embrionarias humanas normales con ADN de adenovirus 5 cortados. Las células HEK 293 son fáciles de cultivar y transfectar muy fácilmente y se han usado ampliamente en la investigación de biología celular durante muchos años. También se usan en la industria biotecnológica para producir proteínas y virus terapéuticos para terapia génica.

En otra realización, el primer tipo de célula es una célula de mamífero transformada con un antígeno T grande de SV40. En una realización concreta se utilizan células 293T HEK. Una variante importante de esta línea celular es la línea de células 293T que contiene el antígeno T grande de SV40, lo que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40. Esto permite la amplificación de los plásmidos transfectados y la expresión temporal extendida de los productos génicos deseados.

El término "célula 293 humana", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la línea celular HEK 293T, la línea celular 293 humana (ATCC N.º CRL 1573) (Graham et al., J. Gen. Virol., Vol. 36, páginas 59-72 (1977)), o una línea celular formada mediante transfección de células 293 con uno o más vehículos de expresión (por ejemplo,

5 vectores plasmídicos), incluyendo polinucleótidos que codifican diversas proteínas *gag*, *pol* y *env*. La envoltura puede ser una envoltura anfotrópica, una envoltura ecotrópica, una envoltura xenotrópica, una envoltura GALV, una envoltura RD114, una envoltura FeLV u otra envoltura retroviral. La envoltura también puede ser una envoltura de una fuente heteróloga, tal como una envoltura de alfavirus. Tales células también pueden incluir otros polinucleótidos
 5 tales como, por ejemplo, polinucleótidos que codifican marcadores seleccionables. Ejemplos de tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, 293T/17 (ATCC No. CCRL 11268); Anjou 65 (ATCC N.º CCRL 11269); Bosc 23 (CCRL 11270); y CAK8, también conocida como la línea celular (ATCC N.º CCRL 11554).

10 El primer tipo de célula (por ejemplo, células HEK 293T) puede transformarse con un vector plasmídico RCR de la divulgación en cualquier número de medios, incluyendo fosfato de calcio y similares. En la técnica se conocen las condiciones de cultivo típicas para células de mamífero, en particular células 293 humanas.

15 Una vez transformado el primer tipo de célula, se cultiva en condiciones para la producción de partículas víricas. Tales condiciones incluyen típicamente células de realimentación en medios apropiados, CO₂ y humedad. Las condiciones de cultivo también pueden incluir la adición de antibióticos, antifúngicos, factores de crecimiento y similares. Típicamente, el medio de realimentación se recoge después de 24, 48, 72 o 96 horas, y tal procedimiento se conoce como procedimiento de transfección de expresión transitoria.

20 Los medios de las células cultivadas anteriores pueden usarse directamente en cultivos adicionales. Como alternativa, las partículas víricas en el medio de células cultivadas pueden aislarse usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia, incluyendo centrifugación, técnicas de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico y similares.

25 Cuando el medio se usa directamente, los medios se pueden añadir al medio utilizado en el cultivo del segundo tipo celular. Cuando las partículas víricas se purifican en primer lugar sustancialmente, las partículas pueden lavarse o resuspenderse en un tampón o medio apropiado o en una concentración particular para la infectividad antes de la adición al segundo tipo celular, dando lugar a la generación de una línea celular productora de expresión estable.

30 En la presente invención, el segundo tipo celular es una línea celular HT1080 o un derivado de la misma. La línea celular HT1080 de fibrosarcoma humano (ATCC, n.º de catálogo CCL-121) se puede obtener directamente de la colección Americana de Cultivos Tipo (P.O. Box 1549, Manassas, VA). El método incluye infectar las células HT1080 con un RCR de la divulgación para proporcionar una célula huésped transfectada de forma estable. La célula huésped transfectada de forma estable puede cultivarse para producir partículas víricas para su uso en terapia génica o liberación génica o puede "depositarse en el banco" para su uso posterior, y puede ser un grupo de células transfectadas o una línea celular clonada. Las células depositadas en el banco se pueden congelar y almacenar usando técnicas conocidas en la materia.
 35

40 Típicamente, las células se cultivarán en medio libre de suero. En una realización, las células se cultivan en un medio libre de animales o un medio definido utilizado para la preparación de sustancias biológicas para su administración a seres humanos. En la presente invención, la línea celular HT180 productora de retrovirus se ha adaptado para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

45 Inesperadamente, el proceso descrito anteriormente produce partículas víricas para terapia génica a partir de la línea celular productora de expresión estable que tienen una estabilidad incrementada en comparación con la partícula vírica producida mediante un procedimiento de expresión transitoria.

50 La partícula vírica de RCR (por ejemplo, AC3-yCD2 (V)) se puede purificar sustancialmente a partir de los medios de las células HT1080 + T5.002. El vector purificado puede lavarse, diluirse y resuspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. Como alternativa, el vector purificado puede almacenarse por congelación o liofilización.

55 En una realización, AC3-yCD2 (V) se administrará como partículas retrovirales en solución. La formulación del vector lleno final se denomina Toca 511 y se suministrará como una solución acuosa estéril que contiene los siguientes excipientes de formulación (en mg / ml): sacarosa 10,0, manitol 10,0, NaCl 5,3, seroalbúmina humana (HSA, Baxter) 1,0 y ácido ascórbico 0,10.

Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, se puede usar cualquier número de vectores retrovirales de la divulgación con la línea celular productora y el proceso divulgados en el presente documento.

60 En los ejemplos específicos proporcionados en el presente documento, TOCA 511 se usa para demostrar los métodos y composiciones de la invención. Como se describe en el presente documento, TOCA 511 se refiere a un vector retroviral competente para la replicación codificado en un plásmido designado pAC3-yCD2 (también conocido como T5.0002). El vector viral está compuesto por un retrovirus competente para la replicación derivado de un virus de la leucemia murina (MLV) que codifica todos los componentes retrovirales (*gag*, *pol* y *env*) requeridos para la replicación viral, con la envoltura ecotrópica original reemplazada con la envoltura anfotrópica del virus 4070A.
 65

El vector TOCA 511 codifica un gen de la citosina desaminasa (CD) de levadura. Esta secuencia génica se ha insertado aguas abajo de un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) derivado del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), que se inserta aguas abajo del gen *env* viral como se muestra en la Figura 5, a continuación. El gen en el vector TOCA 511 es un gen modificado de la citosina desaminasa de levadura. La justificación del uso de un gen de la CD modificado es permitir una conversión *in vivo* más eficiente del profármaco flucitosina oral (5-FC) en el agente citotóxico activo fluorouracilo (5-FU).

Los métodos y composiciones de la divulgación son aplicables a otros vectores y vectores retrovirales recombinantes. La divulgación describe varios vectores de modificación y recombinantes que pueden ser producidos por las líneas celulares y métodos de la divulgación.

Los métodos y líneas celulares de la divulgación incluyen construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias de ácido nucleico que codifican un ácido nucleico heterólogo de interés (por ejemplo, una citosina desaminasa, tal como los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en las SEQ ID NO: 1-13), un gen de interferón gamma o cualquiera de un número de genes terapéuticos, tales como los divulgados en la solicitud de patente publicada WO2010036986. En una realización, el vector viral es un vector retroviral.

Los términos "vector", "construcción vectorial" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, con el fin de transformar el huésped y estimular la expresión (por ejemplo, la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores típicamente comprenden el ADN de un agente transmisible, donde se inserta ADN extraño que codifica una proteína mediante tecnología de enzima de restricción. Un tipo habitual de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un gran número de vectores, incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, se han descrito para la replicación y / o expresión en diversos huéspedes eucariotas y procariontes. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, Wis.), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA) o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y muchas células huésped apropiadas, usando métodos divulgados o citados en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes incluirán a menudo uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo resistencia a los antibióticos y uno o más casetes de expresión.

Los términos "expresa" y "expresión" significan permitir o hacer que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo produciendo una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un correspondiente gen o secuencia de ADN. Una secuencia de ADN se expresa dentro o a través de una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El propio producto de expresión, por ejemplo, la proteína resultante, también se puede decir que es "expresado" por la célula. Un polinucleótido o polipéptido se expresa de forma recombinante, por ejemplo, cuando se expresa o se produce en una célula huésped extraña, bajo el control de un promotor extraño o nativo, o en una célula huésped nativa bajo el control de un promotor extraño.

En una realización, el vector es un vector viral. En una realización adicional, el vector viral es un vector retroviral competente para la replicación capaz de infectar solo las células de mamífero en replicación. Los retrovirus se han clasificado de varias maneras, pero la nomenclatura se ha normalizado en la última década (véase ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en la red en ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/ y el libro de texto "Retroviruses," Eds. Coffin, Hughes y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997. El vector retroviral competente para la replicación deriva de la familia de virus Retroviridae y puede comprender un miembro de la subfamilia de Orthoretrovirinae, o más típicamente comprende un retrovirus del género gammaretrovirus. En una realización, un vector retroviral competente para la replicación comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en 5' un polinucleótido que codifica una citosina desaminasa. En una realización, el polinucleótido que codifica una citosina desaminasa está en 3' de un polinucleótido de *env* de un vector retroviral.

La divulgación proporciona vectores retrovirales modificados. Los vectores retrovirales modificados pueden derivar de miembros de la familia retroviridae. La clasificación de esta familia ha cambiado varias veces durante los últimos diez a quince años. En la actualidad, la familia Retroviridae se compone de dos subfamilias: Spumaretrovirinae, que tiene un solo género, espumavirus (o virus espumosos), tal como el virus espumoso humano y de simio (HFV), y la subfamilia Orthoretrovirinae, que tiene 6 géneros, betaretrovirus (por ejemplo, MMTV), gammaretrovirus (por ejemplo, MLV), alfaretrovirus (por ejemplo ALV), deltaetrovirus (por ejemplo, BLV y HTLV-1) lentivirus (por ejemplo, VIH 1) y retrovirus epsilon. Estas clasificaciones se hacen sobre la base de características moleculares comunes, tales como los marcos de lectura relativos para *gag*, *pol* y *env*, el procesamiento de las poliproteínas, los ARNt individuales usados para cebar la transcripción inversa y la naturaleza de las estructuras LTR. El método original de clasificación de retrovirus fue en los grupos A, B, C y D sobre la base de la morfología de las partículas, como se observó en el microscopio electrónico durante la maduración viral. Las partículas de tipo A representan las partículas inmaduras de los virus de tipo B y D observadas en el citoplasma de las células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas de tipo B brotan como viriones maduros de la membrana plasmática mediante la

envoltura de partículas intracitoplásmicas de tipo A. En la membrana poseen un núcleo toroidal de 75 nm, del cual se proyectan proyecciones de glicoproteínas largas. Después de la gemación, las partículas de tipo B contienen un núcleo excéntrico denso para los electrones. El betaretrovirus virus de tumor mamario de ratón (MMTV) tiene una morfología de tipo B, pero los betaretrovirus también pueden tener una estructura de tipo D. Las partículas de tipo D se asemejan a las partículas de tipo B en que muestran como estructuras anulares en el citoplasma celular infectado, que brotan de la superficie de la célula, pero el virión incorpora proyecciones cortas de glicoproteínas en la superficie. Los núcleos densos para los electrones también están localizados excéntricamente dentro de las partículas. El virus Mason Pfizer de mono (MPMV), también un betaretrovirus, es el prototipo de virus de tipo D. No se pueden observar partículas intracitoplásmicas en las células infectadas por virus de tipo C. En su lugar, las partículas maduras brotan directamente de la superficie celular a través de una condensación en forma de 'C' creciente que luego se cierra sobre sí misma y queda encerrada por la membrana plasmática. Las proyecciones de glicoproteína de la envoltura pueden ser visibles, junto con un núcleo uniformemente denso para los electrones. La gemación se puede producir desde la membrana plasmática superficial o directamente en vacuolas intracelulares. Los alfaetaretrovirus, los gammaretrovirus, los deltaetrovirus y los epsilonetrovirus tienen el aspecto estructural del tipo C.

Los retrovirus se definen por la forma en que replican su material genético. Durante la replicación, el ARN se convierte en ADN. Después de la infección de la célula, se genera una molécula de doble cadena de ADN a partir de las dos moléculas de ARN que se transportan en la partícula vírica mediante el proceso molecular conocido como transcripción inversa. La forma de ADN se integra covalentemente en el genoma de la célula huésped como un provirus, a partir del cual se expresan ARN víricos con la ayuda de factores celulares y / o víricos. Los ARN víricos expresados se empaquetan en partículas y se liberan como virión infeccioso.

La partícula de retrovirus está compuesta por dos moléculas de ARN idénticas. Cada genoma de tipo silvestre tiene una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo, que está protegida en el extremo 5' y poliadenilada en la cola 3'. La partícula del virus diploide contiene las dos cadenas de ARN en complejo con proteínas *gag*, enzimas víricas (productos del gen *pol*) y moléculas de ARNt del huésped dentro de una estructura 'núcleo' de proteínas *gag*. Alrededor y de esta cápside y protegiéndola hay una bicapa lipídica, derivada de las membranas de las células huésped y que contiene proteínas de la envoltura vírica (*env*). Las proteínas *env* se unen a un receptor celular para el virus y la partícula entra típicamente en la célula huésped a través de endocitosis mediada por receptor y / o fusión de membrana.

Después de que la envoltura externa se desprende, el ARN del virus se copia a ADN mediante transcripción inversa. Esto está catalizado por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región *pol* y utiliza el ARNt de la célula huésped empaquetado en el virión como cebador para la síntesis de ADN. De esta manera, el genoma del ARN se convierte en el genoma de ADN más complejo.

El ADN lineal bicatenario producido mediante transcripción inversa puede o no tener que circularizarse en el núcleo. Ahora, el provirus tiene dos repeticiones idénticas en cada extremo, conocidas como repeticiones terminales largas (LTR). Los extremos de las dos secuencias LTR producen el sitio reconocido por un producto de *pol*, la proteína integrasa, que cataliza la integración, de tal manera que el provirus está siempre unido a dos pares de bases (pb) del ADN del huésped desde los extremos de las LTR. Se observa una duplicación de secuencias celulares en los extremos de ambas LTR, que recuerdan el patrón de integración de elementos genéticos transponibles. Se piensa que la integración ocurre esencialmente de forma aleatoria dentro del genoma de la célula diana. Sin embargo, modificando las repeticiones terminales largas es posible controlar la integración de un genoma de retrovirus.

La transcripción, el corte y empalme del ARN y la traducción del ADN vírico integrado están mediadas por proteínas de la célula huésped. Se generan transcripciones de corte y empalme variadas. En el caso de los retrovirus humanos, las proteínas víricas HIV-1/2 y HTLV-I / II también se usan para regular la expresión génica. La interacción entre los factores celulares y víricos es un factor en el control de la latencia del virus y la secuencia temporal en que se expresan los genes víricos.

Los retrovirus pueden transmitirse horizontal y verticalmente. La transmisión infecciosa eficiente de retrovirus requiere la expresión en la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de la envoltura de virus, aunque los virus pueden usar rutas de entrada no específicas, independientes del receptor, con baja eficiencia. Además, el tipo de célula diana debe ser capaz de soportar todas las etapas del ciclo de replicación después de que el virus se ha unido y ha penetrado. La transmisión vertical se produce cuando el genoma del virus se integra en la línea germinal del huésped. A continuación, el provirus es transmitido de generación en generación como si fuera un gen celular. Por lo tanto, se establecen provirus endógenos que frecuentemente están latentes, pero que pueden activarse cuando el huésped se expone a los agentes adecuados.

Como se ha mencionado anteriormente, el intermedio de ADN integrado se denomina provirus. La terapia génica previa o los sistemas de liberación de genes utilizan métodos y retrovirus que requieren la transcripción del provirus y el ensamblaje en virus infecciosos cuando están en presencia de un virus auxiliar apropiado o en una línea celular que contiene secuencias apropiadas que permiten la encapsidación sin producción coincidente de un virus auxiliar contaminante. Como se describe más adelante, no se requiere un virus auxiliar para la producción del retrovirus

recombinante de la divulgación, puesto que las secuencias para la encapsidación se proporcionan en el genoma, proporcionando de este modo un vector retroviral competente para la replicación para la liberación o terapia génicas.

5 El genoma retroviral y el ADN proviral de la divulgación tienen al menos tres genes: *gag*, *pol* y *env*, estos genes pueden estar flanqueados por una o dos repeticiones terminales largas (LTR), o en el provirus están flanqueadas por dos repeticiones terminales largas (LTR) y secuencias que contienen secuencias que actúan en cis, tales como psi. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas (de la matriz, la cápside y la nucleocápside); el gen *pol* codifica las proteínas ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), proteasa e integrasa; y el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura viral. Las LTR en 5' y/o 3' controlan la transcripción y la poliadenilación de los ARN de los viriones. La LTR contiene todas las demás secuencias de acción en cis necesarias para la replicación del virus. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef* y *vpx* (en VIH-1, HIV-2 y / o SIV).

15 Adyacente a la LTR en 5' se encuentran secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador en ARNt) y para la encapsidación eficaz del ARN del virus en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o empaquetamiento del ARN del retrovirus en el virión infeccioso) no están en el genoma viral, el resultado es un defecto cis que evita la encapsidación del ARN vírico genómico. Este tipo de vector modificado es lo que se ha usado típicamente en los sistemas de liberación génica anteriores (es decir, sistemas que carecen de elementos que son necesarios para la encapsidación del virión).

20 En una primera realización, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar un gen que no está en división, una célula en división o una célula que tiene un trastorno proliferativo celular. El retrovirus recombinante competente para la replicación de la divulgación comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una GAG vírica, una POL vírica, una ENV vírica y un polinucleótido heterólogo que se expresa después de que el vector vírico infecta una célula diana, encapsulada dentro de un virión.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está precedida por un promotor y está unida operablemente al promotor.

30 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está precedida por un sitio interno de entrada al ribosoma interno (IRES) y está operativamente unida a los IRES.

Un sitio internos de entrada al ribosoma ("IRES") se refiere a un segmento de ácido nucleico que estimula la entrada o retención de un ribosoma durante la traducción de una secuencia de codificación normalmente en 3' del IRES. En algunas realizaciones, el IRES puede comprender un sitio donante/aceptor de corte y empalme, sin embargo, los IRES preferidos carecen de un sitio donante/aceptor de corte y empalme. Normalmente, la entrada de los ribosomas en el ARN mensajero tiene lugar a través de la tapa situada en el extremo 5' de todos los ARNm eucarióticos. Sin embargo, hay excepciones a esta regla universal. La ausencia de una tapa en algunos ARNm víricos sugiere la existencia de estructuras alternativas que permiten la entrada de ribosomas en un sitio interno de estos ARN. Hasta la fecha, se ha identificado una serie de estas estructuras, denominadas IRES por su función, en la región no codificante 5' de los ARNm del virus no protegidos, tales como, en particular, los picornavirus, tales como el virus de la poliomielitis (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) y el virus EMCV (virus de la encefalomiocarditis (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636-2643). La divulgación proporciona el uso de un IRES en el contexto de un vector de retrovirus competente para la replicación.

45 Dependiendo del uso pretendido del vector de retrovirus de la divulgación, cualquier número de secuencias polinucleotídicas o de ácidos nucleicos heterólogos se pueden insertar en el vector de retrovirus. Algunos ejemplos se dan en el documento WO2010/036986. Por ejemplo, para los estudios *in vitro* usados habitualmente se pueden usar genes marcadores o genes indicadores, incluyendo resistencia a antibióticos y moléculas fluorescentes (por ejemplo, GFP). Las secuencias polinucleotídicas adicionales que codifican cualquier secuencia polipeptídica deseada también se pueden insertar en el vector de la divulgación. Cuando se busca la liberación *in vivo* de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, pueden usarse secuencias tanto terapéuticas como no terapéuticas. Por ejemplo, la secuencia heteróloga puede codificar una molécula terapéutica, que incluye moléculas antisentido o ribozimas dirigidas a un gen particular asociado con un trastorno proliferativo celular, la secuencia heteróloga puede ser un gen suicida (por ejemplo, HSV-tk o PNP o citosina desaminasa), un ARN de interferencia pequeño o micro-ARN, un factor de crecimiento o una proteína terapéutica (por ejemplo, Factor IX). Otras proteínas terapéuticas aplicables a la divulgación se identifican fácilmente en la materia.

60 En una realización, el polinucleótido heterólogo dentro del vector comprende una citosina desaminasa que se ha optimizado para la expresión en una célula humana. En una realización adicional, la citosina desaminasa comprende una secuencia que se ha optimizado para codones humanos y comprende mutaciones que aumentan la estabilidad de la citosina desaminasa (por ejemplo, degradación reducida o estabilidad térmica aumentada) en comparación con una citosina desaminasa de tipo silvestre. En aún otra realización, el polinucleótido heterólogo codifica una construcción de fusión que comprende una citosina desaminasa (optimizada para codones humanos o no optimizada, mutada o no mutada) unida operablemente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de UPRT u OPRT. En otra realización, el polinucleótido heterólogo comprende un polinucleótido CD de la

divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15, o 17).

En otra realización, el vector de retrovirus competente para la replicación puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que comprende una citosina desaminasa (como se describe en el presente documento) y puede comprender además un polinucleótido que comprende una molécula de miARN o ARNic unida a un promotor específico de tejido o de tipo celular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "interferencia de ARN" (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediado por ácidos nucleicos de interferencia cortos (ARNic). La expresión "agente capaz de mediar en la interferencia de ARN" se refiere a ARNic, así como a vectores de ADN y ARN que codifican ARNic cuando se transcriben dentro de una célula. Como se usa en el presente documento, el término "ANic" se refiere a ácido nucleico de interferencia corto. Con el término se pretende abarcar cualquier molécula de ácido nucleico que sea capaz de mediar en la interferencia de ARN específica de secuencia, por ejemplo ARN de interferencia corto (ARNic), ARN de doble cadena (ARNbc), microARN (miARN), ARN de horquilla corto (ARNhc), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNic modificado químicamente, ARN silenciador de genes postranscripcional (ARNsgpt) y otros.

El intervalo adecuado para diseñar longitudes del tallo de un dúplex en horquilla incluye longitudes del tallo de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos y 600-700 nucleótidos. El intervalo adecuado para diseñar longitudes dl bucle de un dúplex en horquilla incluye longitudes del bucle de 4-25 nucleótidos, 25-50 nucleótidos, o más si la longitud del tallo del dúplex de la horquilla es sustancial. En cierto contexto, las estructuras en horquilla con regiones dúplex que son más largas de 21 nucleótidos pueden estimular el silenciamiento dirigido por ARNic eficaz, con independencia de la secuencia del bucle y la longitud.

Los retrovirus replicantes de la divulgación también pueden usarse para modificar la enfermedad mediante la expresión de ARNic o miARN modificado por ingeniería genética (Dennis, Nature, 418: 122 2002) que apaga o disminuye la expresión de genes clave que gobiernan la proliferación o la supervivencia de células enfermas, incluyendo células tumorales. Dichas dianas incluyen genes como Rad 51, una enzima central en la reparación del ADN y sin la cual el crecimiento celular se restringe drásticamente. Otras dianas incluyen muchas de las moléculas de la vía de señalización que controlan el crecimiento celular (Marquez y McCaffrey Hum Gene Ther. 19:27 2008). Los vectores se replicarán a través del tumor y antes de que se produzca la inhibición del crecimiento, el virus se integra primero en el genoma del huésped y continúa haciendo que el virus después del crecimiento de esa célula se inhiba. Los métodos para seleccionar secuencias funcionales de miARN o ARNic son conocidos en la técnica. Es una característica clave en general en el diseño eficaz de secuencias de ARNic o miARN eficaces es, generalmente, evitando los efectos "fuera de la diana". Sin embargo, para el uso de vectores de replicación que son altamente específicos de las células tumorales, tales como las de la divulgación, estos efectos secundarios no son muy importantes, ya que se espera que, en último término, las células mueran. El vector de esta divulgación se haría usando células de otras especies para las que la proteína correspondiente no está significativamente dirigida. Dichas células incluyen líneas celulares de perro o líneas celulares de pollo. Como alternativa, el virus se produce mediante transfección transitoria en células derivadas de 293 humanas u otra línea celular que permite una transfección transitoria eficiente. Para este uso, el virus no necesita expresar un IRES y la secuencia de ARNic o miran simplemente puede insertarse en un sitio conveniente en el genoma del virus. Este sitio incluye la región aguas abajo de la envoltura y aguas arriba de la 3'LTR del retrovirus de replicación. Como alternativa, se pueden insertar unidades de transcripción de polIII en el genoma del virus con los ARNic o miARN apropiados, preferiblemente aguas abajo del gen de la envoltura en 3'. Pueden insertarse diferentes secuencias de ARNic o miARN para asegurar una regulación por disminución eficiente del gen diana o la regulación por disminución de más de un gen. Se pueden obtener secuencias y dianas adecuadas a partir de fuentes conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo:

- La base de datos de ARNic de MIT/ICBP <http://web.mit.edu/sirna/> - "The MIT [Massachusetts Institute of Technology]/ICBP [Integrative Cancer Biology Program] siRNA Database es un esfuerzo realizado a nivel universitario para catalogar estos reactivos validarse de forma experimental y poner la información a disposición de otros investigadores, tanto dentro como fuera de la comunidad del MIT. (Massachusetts Institute of Technology).
- Recursos de RNAi Central - http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl RNAi, incluyendo herramientas de diseño de ARNic o ARNhc. (Hannon Lab, Cold Spring Harbor Laboratory)
- La web de ARNi, <http://www.maiweb.com/> General resource.
- El programa de diseño de ARNic específico de dianas siDIRECT - <http://genomics.jp/sidirect/> Online target-specific para interferencia de ARN de mamífero. (Universidad de Tokio, Japón).
- Base de datos de ARNic – Una exhaustiva base de datos de ARNic que contiene dianas de ARNic contra todas las secuencias de ARNm conocidas a lo largo de diversos organismos. (Parte del sitio web de biología de los sistemas de Protein Lounge) Base de datos de ARNic y recursos para estudios de interferencia de ARN <http://www.mainterference.org/>

- Selector de ARNic, <http://bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm>. Se usó un conjunto de normas para evaluar la funcionalidad del ARNic en base a los parámetros termodinámicos (Khvorova *et al.*, 2003, Schwarz *et al.*, 2003) y determinantes relacionados con la secuencia desarrollados por Dharmacon (Reynolds *et al.*, 2004). La especificidad se determina usando BLAST contra las bases de datos UniGene. (Wistar Institute)
- 5 • Buscador de dianas de ARNic http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html (Ambion)

Los retrovirus de replicación de la divulgación también pueden expresar dianas para ARNic de origen natural que están restringidos en cuando a la expresión a tipos celulares concretos, de modo que la replicación del vector se inhibe significativamente en dichos tipos de células. Para fines antitumorales, algunas células normales en el cuerpo que se replican de forma natural en algún nivel son células hematopoyéticas, células del revestimiento del intestino y algunas células endoteliales. Estos son entonces sitios potenciales donde el virus que está en la circulación podría infectar productivamente. En general esto sería indeseable. Cualquier infección dispersa de células como estas puede inhibirse mediante la inclusión de una diana para ARNic de origen natural o una combinación de ARNic en estos tipos de células. Ya se ha demostrado alguna viabilidad del uso de dianas de ARNic para suprimir las respuestas inmunitarias. (Brown *et al.* Nat Biotechnol. 2007 25:1457-67). Estos dianas son pequeñas secuencias de ARN con una coincidencia homóloga con las secuencias de ARNic que se producen de forma natural. Estas secuencias pueden insertarse en cualquier sitio conveniente en los vectores de la presente invención sin, en general, una consecuencia perjudicial significativa para la viabilidad del vector, que no sea en una célula del tipo deseado. Los vectores se pueden fabricar y utilizar como se ha descrito anteriormente. La diana del ARNic puede insertarse en 3' del transgén pero antes de la 3'LTR o aguas arriba del IRES, pero después del extremo 3' de la envoltura. En general, la diana no se insertaría en las secuencias de codificación de proteínas.

En otras realizaciones adicionales, el polinucleótido heterólogo puede comprender una citocina, tal como una interleucina, interferón gamma o similar.

Generalmente, el virus recombinante de la divulgación es capaz de transferir una secuencia de ácido nucleico a una célula diana.

La expresión "dominio regulador de ácido nucleico" se refiere colectivamente a secuencias promotoras (por ejemplo, secuencias promotoras de *pol* II), señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, potenciadores y similares, que colectivamente proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia de codificación una célula receptora. No todas estas secuencias de control deben estar siempre presentes, con la condición de que la secuencia de codificación seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente la secuencia de ácido nucleico reguladora a partir de bases de datos y materiales públicos. Adicionalmente, un experto en la técnica puede identificar una secuencia reguladora que sea aplicable para el uso pretendido, por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

La expresión "región promotora" se utiliza en el presente documento en su sentido habitual para hacer referencia a una región nucleotídica que comprende una secuencia reguladora de ADN, donde la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). La secuencia reguladora puede ser homóloga o heteróloga de la secuencia génica deseada. Por ejemplo, se puede utilizar una amplia gama de promotores, incluyendo promotores de virus o de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga está típicamente bajo el control de las señales promotoras-potenciadoras de LTR del virus o un promotor interno y señales retenidas dentro de la LTR del retrovirus todavía puede dar lugar a una integración eficiente del vector en el genoma de la célula huésped. Por consiguiente, los vectores de retrovirus recombinantes de la divulgación, las secuencias, genes y / o fragmentos génicos deseados pueden insertarse en varios sitios y bajo diferentes secuencias reguladoras. Por ejemplo, un sitio para la inserción puede ser el sitio proximal del promotor / potenciador del virus (es decir, el locus del gen dirigido por LTR 5'). Como alternativa, las secuencias deseadas pueden insertarse en un sitio distal de la secuencia reguladora (por ejemplo, la secuencia IRES en 3' del gen *env*) o cuando hay dos o más secuencias heterólogas presentes, una secuencia heteróloga puede estar bajo el control de una primera región reguladora y una segunda secuencia heteróloga bajo el control de una segunda región reguladora. Otros sitios distales incluyen secuencias promotoras del virus, donde la expresión de la secuencia o secuencias deseadas es mediante corte y empalme del cistron proximal del promotor, se puede usar un promotor heterólogo interno como SV40 o CMV, o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

En una realización, el genoma del retrovirus de la divulgación contiene un IRES que comprende un sitio de clonación para la inserción de una secuencia polinucleotídica deseada. En una realización, el IRES se localiza en 3' del gen *env* en el vector del retrovirus, pero en 5' del ácido nucleico heterólogo deseado. De acuerdo con esto, una secuencia polinucleotídica heteróloga que codifica un polipéptido deseado puede estar operativamente unida al IRES.

En otra realización, se incluye una secuencia polinucleotídica de direccionamiento como parte del vector de

retrovirus recombinante de la divulgación. La secuencia polinucleotídica dirigida es un ligando dirigido (por ejemplo, hormonas peptídicas, tales como heregulina, anticuerpos de cadena sencilla, un receptor o un ligando para un receptor), un elemento regulador específico de tejido o específico de tipo celular (por ejemplo, un promotor o potenciador específico de tejido o específico de tipo de célula), o una combinación de un ligando dirigido y un

5 elemento regulador específico de tejido/específico de tipo celular. Preferiblemente, el ligando dirigido está unido operativamente a la proteína *env* del retrovirus, creando una proteína *env* retroviral quimérica. Las proteínas GAG vírica, POL vírica y ENV vírica pueden derivar de cualquier retrovirus adecuado (por ejemplo, derivado de MLV o de lentivirus). En otra realización, la proteína ENV vírica no deriva de retrovirus (por ejemplo, alfavirus, CMV o VSV).

10 El retrovirus recombinante de la divulgación está, por lo tanto, genéticamente modificado de tal manera que el virus está dirigido a un tipo de célula particular (por ejemplo, células de músculo liso, células hepáticas, células renales, fibroblastos, queratinocitos, células madre mesenquimatosas, células de médula ósea, condrocitos, células epiteliales, células intestinales, células neoplásicas, células de glioma, células neuronales y otras conocidas en la técnica), de forma que el genoma de ácido nucleico se libera a una diana que no está en división, una célula diana

15 en división o a una célula diana que tiene un trastorno proliferativo celular. El direccionamiento se puede lograr de dos maneras. La primera forma dirige el retrovirus a una célula diana mediante la unión a células que tienen una molécula sobre la superficie externa de la célula. Este método de dirigir el retrovirus utiliza la expresión de un ligando dirigido sobre la capa del retrovirus para ayudar a dirigir el virus a células o tejidos que tienen un receptor o molécula de unión que interacciona con el ligando dirigido sobre la superficie del retrovirus. Después de la infección de una

20 célula por el virus, el virus inyecta su ácido nucleico en la célula y el material genético del retrovirus puede integrarse en el genoma de la célula huésped. El segundo método de dirigir utiliza elementos reguladores específicos de células o de tejidos para estimular la expresión y la transcripción del genoma viral en una célula diana que utiliza activamente los elementos reguladores, como se describe con mayor detalle a continuación. A continuación, el material genético de retrovirus transferido se transcribe y se traduce en proteínas dentro de la célula huésped. El

25 elemento regulador dirigido está típicamente unido a la LTR en 5' y / o 3', creando una LTRB quimérica.

Mediante la inserción de una secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés en el vector viral de la divulgación, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando de un receptor sobre una célula diana específica, el vector es ahora específico de la diana. Los vectores víricos pueden hacerse específicos de la diana a través de la unión de,

30 por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se puede lograr usando un anticuerpo para dirigir el vector viral. Los expertos en la técnica conocerán, o pueden determinar fácilmente, secuencias de polinucleótidos específicos que pueden insertarse en el genoma del virus o proteínas que se pueden unir a una envoltura vírica para permitir la liberación específica de la diana del vector vírico que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés.

35 De este modo, la divulgación incluye, en una realización, una proteína *env* quimérica que comprende una proteína *env* del retrovirus unida operativamente a un polipéptido dirigido. El polipéptido de orientación puede ser una molécula receptora específica de célula, un ligando para un receptor específico de célula, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para un epítipo antigénico específico de célula o cualquier otro ligando fácilmente identificado en la

40 técnica que sea capaz de unirse o interactuar con una célula diana. Entre los ejemplos de polipéptidos o moléculas dirigidos se incluyen anticuerpos bivalentes usando biotina-estreptavidina como enlazadores (Etienne-Julan et al., J. Of General Virol., 73, 3251-3255 (1992); Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 9079-9083 (1989)), virus recombinante que contiene en su envoltura una secuencia que codifica una región variable del anticuerpo monocatenario contra un hapteno (Russell et al., Nucleic Acids Research, 21, 1081-1085 (1993)),

45 clonación de ligandos de hormonas peptídicas en la envoltura del retrovirus (Kasahara et al., Science, 266, 1373-1376 (1994)), construcciones quiméricas EPO/*env* (Kasahara et al., 1994), anticuerpo monocatenario contra el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la envoltura del MLV ecotrópico, lo que da lugar a una infección específica de células HeLa que expresan el receptor de LDL (Somia et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92, 7570-7574 (1995)), de forma similar, la gama de huéspedes del ALV se puede alterar mediante la incorporación de un ligando

50 de integrina, lo que permite al virus cruzar la barrera de las especies para infectar específicamente células de glioblastoma de rata (Valsesia-Wittmann et al., J. Virol. 68, 4609-4619 (1994)), y Dornberg y colaboradores (Chu y Dornberg, J. Virol 69, 2659-2663 (1995)) han comunicado el direccionamiento específico de tejido del virus de necrosis del bazo (SNV), un retrovirus aviar, usando envolturas que contienen anticuerpos monocatenarios contra marcadores tumorales.

55 La divulgación proporciona un método de producción de un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula diana, que comprende transfectar una célula huésped adecuada con lo siguiente: un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una *gag* vírica, una *pol* vírica y una *env* vírica, donde el vector contiene un sitio de clonación para la introducción de un gen heterólogo, operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico reguladora, y la recuperación del virus recombinante.

60

El retrovirus y los métodos de la divulgación proporcionan un retrovirus competente para la replicación que no requiere virus auxiliar ni secuencia de ácido nucleico o proteínas adicionales para propagar y producir viriones. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación codifican, por ejemplo, un antígeno

65 específico de grupo y transcriptasa inversa, (e integrasa y enzimas proteasas necesarias para la maduración y la transcripción inversa), respectivamente, como se ha tratado anteriormente. Las *gag* y *pol* víricas pueden derivar de

un lentivirus, tal como VIH o un gammaretrovirus tal como MoMLV. Además, el genoma de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación incluye una secuencia que codifica una proteína de la envoltura del virus (ENV). El gen *env* puede derivar de cualquier retrovirus. La proteína *env* puede ser una proteína anfotrópica de la envoltura que permite la transducción de células de seres humanos y de otras especies, una proteína ecotrópica de la envoltura, que es capaz de transducir solo células de ratón y de rata, una envoltura xenotrópica, una envoltura GALV, una envoltura RD114, una envoltura de FeLV u otra envoltura de retrovirus. La envoltura también puede ser una envoltura de una fuente heteróloga, tal como un alfavirus, CMV o VSV. Además, puede ser deseable dirigir el virus recombinante mediante la unión de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un ligando en particular dirigido a un receptor de un tipo celular en particular. Como se ha mencionado anteriormente, los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana mediante la inserción de, por ejemplo, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se logra a menudo usando un anticuerpo para dirigir el vector retroviral a un antígeno en un tipo de célula en particular (por ejemplo, un tipo celular encontrado en un cierto tejido, o un tipo de célula cancerosa). Los expertos en la técnica conocerán, o pueden determinar fácilmente sin experimentación excesiva, métodos específicos para lograr la liberación de un vector retroviral a un objetivo específico. En otra realización, el gen *env* no deriva de un retrovirus (por ejemplo, alfavirus, CMV o VSV). Entre los ejemplos de genes *env* derivados de retrovirus se incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). También pueden usarse otros genes *env*, tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (proteína G), la envoltura de citomegalovirus (CMV) o la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.

En una realización, el genoma retroviral deriva de un gammaretrovirus y, más particularmente, un gammaretrovirus de mamífero. Por "derivado" se entiende que la secuencia polinucleotídica parental es un gammaretrovirus de tipo salvaje que se ha modificado mediante inserción o eliminación de secuencias de origen natural (por ejemplo, inserción de un IRES, inserción de un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido o ácido nucleico inhibidor de interés, mezcla de un promotor más eficaz de un retrovirus o virus diferente en lugar del promotor de tipo salvaje y similares).

A diferencia de los retrovirus recombinantes producidos por métodos estándar en la técnica que son defectuosos y requieren ayuda para producir partículas de vectores infecciosas, la divulgación proporciona un retrovirus que es competente para la replicación.

En otra realización, la divulgación proporciona vectores retrovirales que son dirigidos usando secuencias reguladoras. Se pueden utilizar secuencias reguladoras específicas de células o tejidos (por ejemplo, promotores) para dirigir la expresión de secuencias génicas en poblaciones de células específicas. Los promotores de mamífero y víricos adecuados para la divulgación se describen en otra parte del presente documento. Por consiguiente, en una realización, la divulgación proporciona un retrovirus que tiene elementos promotores específicos de tejido en el extremo 5' del genoma retroviral. Preferiblemente, los elementos / secuencias reguladoras específicas de tejido están en la región U3 de la LTR del genoma retroviral, incluyendo, por ejemplo, promotores y potenciadores específicos de células o tejidos a células neoplásicas (por ejemplo, potenciadores y promotores específicos de células tumorales) y promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclina).

Las secuencias de control de la transcripción de la divulgación también pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas de forma natural con un gen que codifica un superantígeno, una citocina o una quimiocina.

En algunas circunstancias, puede ser deseable regular la expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes promotores del virus con intensidades variables de actividad, dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamífero, el promotor temprano inmediato de CMV se utiliza a menudo para proporcionar una fuerte activación de transcripción. También se han utilizado versiones modificadas del promotor de CMV que son menos potentes cuando se desean niveles reducidos de expresión del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, se usan a menudo promotores retrovirales tales como las LTR de VLM o VTMM. Otros promotores virales que pueden usarse incluyen SV40, LTR de VRS, LTR de VIH-1 y VIH-2, promotores de adenovirus tales como de la región E1A, E2A o MLP, LTR de VAA, virus del mosaico de coliflor, VHS-TK y virus de sarcoma aviar.

De manera similar, pueden usarse promotores selectivos o específicos de tejidos para efectuar la transcripción en tejidos específicos o células de modo que se reduzca la toxicidad potencial o los efectos no deseados a tejidos no seleccionados como diana. Por ejemplo, pueden usarse promotores tales como el PSA, probasina, fosfatasa de ácido prostático o calicreína glandular específica de la próstata (hK2), para dirigir la expresión génica en la próstata. Otros promotores/dominios reguladores que se pueden usar se exponen en la Tabla 1.

En ciertas indicaciones, puede ser deseable activar la transcripción en momentos específicos tras la administración del vector de terapia génica. Esto puede hacerse con promotores tales como aquéllos que son regulables por hormonas o citocinas. Por ejemplo, en las aplicaciones de terapia génica donde la indicación es un tejido gonadal donde se producen o al que se envían esteroides específicos, puede ser ventajoso el uso de promotores regulados

- por andrógenos o estrógenos. Tales promotores que son regulables por hormonas incluyen VTMM, MT-1, ecdisona y RuBisco. Se pueden usar otros promotores regulados por hormonas tales como aquellos que responden a hormonas tiroideas, hipofisarias y suprarrenales. Los promotores que responden a citocinas y proteínas inflamatorias que pueden usarse, incluyen cininógeno K y T (Kageyama *et al.*, 1987), c-fos, TNF-alfa, proteína reactiva C (Arcone *et al.*, 1988), haptoglobina (Oliviero *et al.*, 1987), suero amiloide A2, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poli y Cortese, 1989), complemento C3 (Wilson *et al.*, 1990), IL-8, alfa-1 glicoproteína ácida (Prowse y Baumann, 1988), alfa-1 antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner *et al.*, 1998), angiotensinógeno (Ron *et al.*, 1991), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por glucocorticoide y metales pesados), estromelina (inducible por éster de forbol, interleucina-1 y EGF), alfa-2-macroglobulina y alfa-1-antiquimotripsina. También pueden usarse promotores específicos de tumores, tales como osteocalcina, elemento respondedor a la hipoxia (HRE), MAGE-4, ACE, alfa-fetoproteína, GRP78/BiP y tirosinasa, para regular la expresión génica en células tumorales.
- 15 Además, esta lista de promotores no debe interpretarse como que es exhaustiva o limitante, los expertos en la técnica conocerán otros promotores que pueden usarse junto con los promotores y métodos dados a conocer en el presente documento.

TABLA 1 PROMOTORES ESPECÍFICOS DE TEJIDO

| Tejido | Promotor |
|---------------------|---|
| Páncreas | Insulina Elastina Amilasa pdr-1 pdx-1 glucoquinasa |
| Hígado | Albúmina PEPCK potenciador de HBV α fetoproteína apolipoproteína C α -1 antitripsina vitelogenina, NF-AB Transtiretina |
| Músculo esquelético | Cadena H de miosina creatina quinasa de músculo Distrofina calpaína p94 α -actina esquelética troponina 1 rápida |
| Piel | Queratina K6 Queratina K1 |
| Pulmón | CFTR Citoqueratina humana 18 (K18) Proteínas tensioactivas pulmonares A, B y C CC-10 P1 |
| Músculo liso | sm22 α SM-alfa-actina |
| Endotelio | Endotelina-1 E-selectina factor de von Willebrand TIE (Korhonen <i>et al.</i> , 1995) KDR / flk-1 tirosinasa de melanocitos |
| Tejido adiposo | Lipoproteína lipasa (Zechner <i>et al.</i> , 1988) Adiposina (Spiegelman <i>et al.</i> , 1989) acetil-CoA carboxilasa (Pape y Kim, 1989) glicerofosfato deshidrogenasa (Dani <i>et al.</i> , 1989) adipocito P2 (Hunt <i>et al.</i> , 1986) |
| Sangre | β -globina |
| Glioma | GFAP, nestina, Msi 1 (J. Huang <i>et al.</i> Acta Biochim Biophys Sin 2010, 42: 274-280) |

- 20 Los "elementos reguladores específicos de los tejidos" son elementos reguladores (por ejemplo, promotores) que son capaces de dirigir la transcripción de un gen en un tejido mientras permanece en gran parte "silencioso" en otros. Se entenderá, sin embargo, que los promotores específicos de tejidos pueden tener una cantidad detectable de actividad "de fondo" o "base" en los tejidos donde son silenciosos. El grado en el que un promotor se activa selectivamente en un tejido diana se puede expresar como una relación de selectividad (actividad en un tejido / actividad diana en un tejido de control). A este respecto, un promotor específico de tejido útil en la práctica de la divulgación tiene típicamente una relación de selectividad mayor de aproximadamente 5. Preferiblemente, la relación de selectividad es mayor que aproximadamente 15.
- 25 Se entenderá además que ciertos promotores, aunque no están restringidos en actividad a un solo tipo de tejido, puede mostrar, sin embargo, selectividad en cuanto a que pueden ser activos en un grupo de tejidos y menos activos o silenciosos en otro grupo. Tales promotores se denominan también "específicos de tejido" y se contemplan para su uso con la divulgación. Por ejemplo, los promotores que son activos en una diversidad de neuronas del sistema nervioso central (SNC) pueden ser terapéuticamente útiles en la protección contra el daño debido a accidentes cerebrovasculares, que puede afectar a cualquiera de varias regiones diferentes del cerebro. De acuerdo con ello, los elementos reguladores específicos de tejido utilizados en la divulgación tienen aplicabilidad a la regulación de las proteínas heterólogas, así como una aplicabilidad como una secuencia polinucleotídica diana en los presentes vectores retrovirales.
- 30 Los vectores retrovirales y el polinucleótido CD y el polipéptido de la divulgación pueden usarse para tratar una amplia gama de enfermedades y trastornos que incluyen una serie de enfermedades y trastornos proliferativos de células (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 4.405.712 y 4.650.764; Friedmann, 1989, Science, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932, R. Crystal, 1995, Science 270:404-410, véase también, The Development of Human Gene Therapy, Theodore Friedmann, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. ISBN 0-87969-528-5.
- 45

La frase célula "que no se divide" se refiere a una célula que no pasa por mitosis. Las células que no se dividen pueden estar bloqueadas en cualquier punto del ciclo celular (por ejemplo, G₀/G₁, G₁/S, G₂/M), siempre que la célula no se esté dividiendo de forma activa. Para la infección *ex vivo*, una célula en división se puede tratar para bloquear la división celular mediante técnicas estándar utilizadas por los expertos en la técnica, incluyendo irradiación, tratamiento con afidocolina, inanición de suero e inhibición de contacto. Sin embargo, debe entenderse que la infección *ex vivo* se realiza a menudo sin bloquear las células, ya que muchas células ya están detenidas (por ejemplo, células madre). Por ejemplo, un vector lentivirus recombinante es capaz de infectar muchas células que no se dividen, independientemente del mecanismo usado para bloquear la división celular o el punto en el ciclo celular donde la célula está bloqueada. Entre los ejemplos de células preexistentes que no se dividen en el cuerpo se incluyen células neuronales, musculares, hepáticas, de piel, de corazón, de pulmón y de médula ósea, y sus derivados. Para las células en división pueden usarse vectores gamma-retrovirales, ya que solo son capaces de infectar células que se están dividiendo.

Por célula "en división" se entiende una célula que experimenta mitosis activa, o meiosis. Tales células de división incluyen células madre, células de la piel (por ejemplo, fibroblastos y queratinocitos), gametos y otras células en división conocidas en la técnica. De interés particular y abarcadas por el término célula en división son células que tienen trastornos proliferativos celulares, tales como células neoplásicas. El término "trastorno proliferativo celular" se refiere a una afección caracterizada por un número anormal de células. La afección puede incluir tanto el crecimiento celular hipertrófico (la multiplicación continua de células que da como resultado un crecimiento excesivo de una población de células dentro de un tejido) como hipotrófico (falta o deficiencia de células dentro de un tejido) o un exceso de afluencia o migración de células hacia un área de un cuerpo. Las poblaciones celulares no son necesariamente células transformadas, tumorigénicas o malignas, sino que también pueden incluir células normales. Los trastornos proliferativos de las células incluyen trastornos asociados con un crecimiento excesivo de tejidos conectivos, tales como diversas afecciones fibróticas, incluyendo esclerodermia, artritis y cirrosis hepática. Los trastornos proliferativos celulares incluyen trastornos neoplásicos, tales como carcinomas de cabeza y cuello. Los carcinomas de cabeza y cuello incluirían, por ejemplo, carcinoma de la boca, esófago, garganta, laringe, glándula tiroides, lengua, labios, glándulas salivales, nariz, senos paranasales, nasofaringe, bóveda nasal superior y tumores sinusales, estesioneuroblastoma, cáncer de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma senonasal indiferenciado (CSNI), cerebro (incluyendo glioblastomas) o neoplasia sanguínea. También se incluyen los carcinomas de los ganglios linfáticos regionales, incluidos los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos prelaríngeos, los ganglios linfáticos yuxtaesofágicos pulmonares y los ganglios linfáticos submandibulares (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds., Isselbacher, et al., McGraw-Hill, Inc., 13ª Edición, pág. 1850-1853, 1994). Otros tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a los mismos, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer de páncreas, leucemia, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de piel y cáncer de ovarios.

La divulgación también proporciona terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de una secuencia polinucleotídica terapéutica apropiada (por ejemplo, antisentido, ribozimas, genes suicidas, ARN_i), en células del sujeto que tiene el trastorno proliferativo. La liberación construcciones polinucleotídicas se puede lograr utilizando el vector retroviral recombinante de la divulgación, particularmente si está basado en MLV, que será capaz de infectar solo a las células en división y que continúa haciéndolo en células infectadas, incluso después de que las células dejen de dividirse.

Además, los métodos terapéuticos (por ejemplo, la terapia génica o los métodos de administración génica) como se describen en el presente documento pueden realizarse *in vivo* o *ex vivo*. Puede ser preferible eliminar la mayoría de un tumor antes de la terapia génica, por ejemplo quirúrgicamente o por radiación. La cirugía o la radiación también se pueden utilizar después de la terapia génica. En algunos aspectos, la terapia retroviral puede estar precedida o seguida de quimioterapia.

De este modo, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide, una célula en división o una célula neoplásica, en ella, el retrovirus recombinante comprende una GAG del virus; una POL del virus; una ENV del virus; un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a un IRES o a un promotor interno; y secuencias de ácido nucleico que actúan en *cis* necesarias para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la integración. El retrovirus recombinante puede ser un lentivirus, tal como el VIH, o puede ser un gammaretrovirus. Como se ha divulgado anteriormente para el método de producción de un retrovirus recombinante, el retrovirus recombinante de la divulgación puede incluir además al menos una de las proteínas VPR, VIF, NEF, VPX, TAT, REV y VPU. Aunque no se desea estar limitado por una teoría particular, se cree que uno o más de estos genes / productos proteicos son importantes para aumentar el título viral del retrovirus recombinante producido (por ejemplo, NEF) o puede ser ventajoso para la infección y el empaquetamiento del virión en células con altos niveles de elementos de restricción vírica (por ejemplo, VIF para células con APOBEC3G activo o equivalente).

La divulgación también proporciona un método de transferencia de ácido nucleico a una célula diana para proporcionar la expresión de un ácido nucleico particular (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Por lo tanto, en otra realización, la divulgación proporciona un método para la introducción y expresión de un ácido nucleico heterólogo en una célula diana que comprende infectar la célula diana con el virus recombinante de la divulgación y expresar el ácido nucleico heterólogo en la célula diana. Como se ha mencionado anteriormente, la célula diana

puede ser cualquier tipo de célula, incluyendo los tipos de células en división, que no se dividen, neoplásicas, inmortalizadas, modificadas y otras reconocidas por los expertos en la técnica, siempre que sean capaces de infectarse con un retrovirus.

5 Puede ser deseable modular la expresión de un gen en una célula mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga) mediante el método de la divulgación, donde la secuencia de ácido nucleico da lugar, por ejemplo, a una molécula antisentido o ribozima. El término "modular" prevé la supresión de la expresión de un gen cuando está sobreexpresado o el aumento de la expresión cuando está subexpresado. Cuando un trastorno proliferativo celular está asociado con la expresión de un gen, pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos que interfieren con la expresión del gen a nivel de la traducción. Este enfoque utiliza, por ejemplo, ácido nucleico antisentido, ribozimas o agentes triplex para bloquear la transcripción o la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o triplex, o escindiéndolo con una ribozima.

15 Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias de al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, Scientific American, 262:40, 1990). En la célula, los ácidos nucleicos antisentido hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARNm que sea de doble cadena. Se prefieren oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que son fácilmente sintetizados y son menos propensos a causar problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula diana. El uso de métodos antisentido para inhibir la traducción *in vitro* de genes es bien conocido en la técnica (Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172:289, 1988).

25 El ácido nucleico antisentido puede usarse para bloquear la expresión de una proteína mutante o un producto génico predominantemente activo, tal como una proteína precursora amiloide que se acumula en la enfermedad de Alzheimer. Tales métodos son también útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, el parkinsonismo hereditario y otras enfermedades. De particular interés son el bloqueo de genes asociados con trastornos proliferativos de células. Los ácidos nucleicos antisentido también son útiles para la inhibición de la expresión de proteínas asociadas con la toxicidad.

30 La utilización de un oligonucleótido para detener la transcripción se conoce como la estrategia triplex, ya que el oligómero se enrolla alrededor del ADN de doble hélice formando una hélice de tres cadenas. Por lo tanto, estos compuestos triplex pueden diseñarse para reconocer un sitio único en un gen elegido (Maher, et al., Antisense Res. and Dev., 1(3):227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):569, 1991).

35 Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN monocatenario de una manera análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Mediante la modificación de las secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconozcan secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindir las (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988). Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicos de secuencia, solo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

45 Puede ser deseable transferir un ácido nucleico que codifica un modificador de la respuesta biológica (por ejemplo, una citocina). Se incluyen en esta categoría agentes inmunopotenciadores que incluyen ácidos nucleicos que codifican una serie de citocinas clasificadas como "interleucinas". Estas incluyen, por ejemplo, las interleucinas 1 a 15. También se incluyen en esta categoría, aunque no necesariamente funcionan según los mismos mecanismos, los interferones y, en particular, el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM - CSF). Otros polipéptidos incluyen, por ejemplo, factores angiogénicos y factores antiangiogénicos. Puede ser deseable suministrar tales ácidos nucleicos a células de médula ósea o macrófagos para tratar deficiencias enzimáticas o defectos inmunes. Los ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento, péptidos tóxicos, ligandos, receptores u otras proteínas fisiológicamente importantes también se pueden introducir en células diana específicas.

55 Por ejemplo, HER2 (véase, por ejemplo, las SEQ ID NO: 23 y 24), un miembro de la familia del receptor de EGF, es la diana para la unión del fármaco trastuzumab (Herceptin TM, Genentech). Trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La actividad está dirigida. Preferentemente, a células que expresan HER2 con niveles de sobreexpresión 2+ y 3+ mediante inmunohistoquímica en lugar de células 1+ y sin expresión (ficha técnica de Herceptin, Crommelin 2002). El aumento de la expresión de HER2 mediante la introducción de un vector que expresa HER2 o HER2 truncado (que expresa solo los dominios extracelular y transmembrana) en tumores bajos de HER2 puede facilitar el desencadenamiento óptimo de CCDA y superar la resistencia de desarrollo rápido a HER2 que se observa en el uso clínico.

65 La sustitución de yCD2 para el dominio intracelular de HER2 permite la expresión en la superficie celular de HER2 y la localización citosólica de yCD2. El dominio extracelular de HER2 (DEC) y el dominio transmembrana (TM) (aproximadamente 2026 pb desde aproximadamente la posición 175 a 2200) pueden amplificarse por PCR (Yamamoto et al., Nature 319:230-234, 1986; Chen et al., Canc. Res., 58:1965-1971, 1998) o sintetizarse

químicamente (BioBasic Inc., Markham, Ontario, Canadá) e insertarse entre el IRES y el gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19. Como alternativa, el gen yCD puede ser escindido y reemplazado por un polinucleótido que codifica un polipéptido HER2 o fragmento del mismo. Se puede amplificar o sintetizar químicamente otro HER2 truncado con solo el dominio IV de unión a Herceptin de los dominios DEC y TM (aproximadamente 290 pb desde la posición 1910 a 2200) (Landgraf 2007; Garrett et al., J. of Immunol., 178:7120-7131, 2007) y usar como se ha indicado anteriormente. Una modificación adicional de esta forma truncada con el péptido señal nativo (aproximadamente 69 pb desde la posición 175-237) fusionado al dominio IV y al TM puede sintetizarse químicamente y utilizarse como se ha indicado anteriormente. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

Como alternativa, HER2 y las modificaciones divulgadas anteriormente se pueden expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENV y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum et al., Mol. Therapy, 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes GAG y POL y yCD2 de la SEQ ID NO 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a HER2, HER2 ECDTM, HER2 ECDIVTM, o HER2 SECDIVTM.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente da lugar a la producción de viriones de progenie capaces de codificar yCD2 y HER2 (o variante) en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

Otro aspecto del desarrollo de resistencia al trastuzumab se refiere a la interferencia con la señalización intracelular requerida para la actividad del trastuzumab. Las células resistentes muestran pérdida de PTEN y menor expresión de p27kip1 [Fujita, Brit J. Cancer, 94:247, 2006; Lu et al., Journal of the National Cancer Institute, 93(24): 1852-1857, 2001; Kute et al., Cytometry Part A 57A:86-93, 2004).

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica PTEN (SEQ ID NO: 25) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19 o 22, o con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente, o como sustituto de yCD2. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica PTEN se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y yCD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, PTEN se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al., J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENV y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu, Rev Med Virol. 2000, Baum, Mol. Ther. 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a PTEN.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente da lugar a la producción de viriones de progenie capaces de codificar yCD2 y PTEN (o variante) o PTEN solo en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

De un modo similar, un polinucleótido que codifica p27kip1 (SEQ ID NO: 27 y 28) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19 o con una secuencia enlazadora. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica p27kip1 se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y yCD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente previamente o en lugar del gen yCD2.

Como alternativa, p27kip1 se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de *env* diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser un vector retroviral de "primera generación" competente para la replicación o no replicativo que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENVI y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum 2006, citado anteriormente). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO: 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a p27kip1.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 y TT da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar *yCD2* y p27kip1 (o variante) en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

En otro ejemplo, CD20 es la diana para la unión del fármaco rituximab (Rituxan™, Genentech). Rituximab es un mediador de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y CCDA. Las células con mayor intensidad de fluorescencia media por citometría de flujo muestran una sensibilidad mejorada a rituximab (van Meerten et al., Clin Cancer Res 2006; 12(13):4027-4035, 2006). El aumento de la expresión de CD20 mediante la introducción de un vector que expresa CD20 en células B bajas en CD20 puede facilitar el desencadenamiento óptimo de CCDA.

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica CD20 (SEQ ID NO: 29 y 30) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen *yCD2* en el vector pAC3-*yCD2*(-2) SEQ ID NO: 19 o 22, o con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente, o como sustituto del gen *yCD2*. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica CD se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y *yCD2* o con un enlazador como se ha descrito anteriormente. Como otra alternativa, la secuencia CD20 puede insertarse en el vector pAC3-*yCD2* después de la escisión del gen CD por digestión con Psi1 y Not1.

En otro ejemplo adicional, un polinucleótido que codifica CD20 (SEQ ID NO: 29 y 30) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse en un vector que contiene un gen *env* no anfotrópico u otra proteína de superficie adecuada (Tedder et al., PNAS, 85:208-212, 1988). La ENV y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO: 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a CD20.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 o 22 da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar *yCD2* y CD20 en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con Rituxan y/o 5-FC. De forma similar, la infección de un tumor con un vector que codifica solo el marcador CD20 puede hacer que el tumor sea tratable mediante el uso de Rituxan.

Los niveles de las enzimas y cofactores implicados en el anabolismo pirimidínico pueden ser limitantes. La expresión de OPRT, timidina quinasa (TK), uridina monofosfato quinasa y pirimidina nucleósido fosforilasa es baja en las células cancerosas resistentes a 5-FU en comparación con las líneas sensibles (Wang et al., Cancer Res., 64:8167-8176, 2004). Los análisis en poblaciones grandes muestran una correlación de los niveles enzimáticos con el desenlace de la enfermedad (Fukui et al., Int'l. J. OF Mol. Med., 22:709-716, 2008). La coexpresión de CD y otras enzimas del anabolismo de las pirimidinas (PAE) puede explotarse para aumentar la actividad y, por lo tanto, el índice terapéutico de los fármacos de fluoropirimidina.

Para aumentar adicionalmente la estabilidad genética (véase, por ejemplo, la Figura 5) de vectores que contienen *yCD2* / PAE, el gen que codifica la enzima puede sintetizarse químicamente con mutaciones aleatorias a lo largo de la secuencia. Estas mutaciones pueden ser esencialmente aleatorias o pueden consistir únicamente en mutaciones en la posición de oscilación para cada aminoácido. La biblioteca de secuencias mutadas se inserta aguas abajo del gen *yCD2* tal como se ha descrito previamente para las SEQ ID NO: 11 y 13 para crear una biblioteca de plásmidos que pueda usarse entonces para generar una biblioteca de partículas infecciosas mediante transfección transitoria de células 293T o equivalentes. Las células sensibles pueden infectarse con retrovirus que codifican el polipéptido

de fusión y someterse a selección con sustancias químicas apropiadas. Por ejemplo, la herpes timidina quinasa (TK) mutagenizada aleatoriamente se sintetiza químicamente (Bio Basic Inc, Markham, Canadá). La secuencia sintética se inserta en 3' de la secuencia de yCD2 en la SEQ ID NO: 19 o por sí misma en los huesos traseros del vector pAC3-yCD2 después de la escisión del gen CD2. La mezcla de vectores retrovirales se empaqueta como se ha descrito anteriormente. Las células LMTK de fibroblasto de ratón se infectan con el vector y se seleccionan según la actividad de TK en medio HAT (Hiller et al., Mol. Cell Biol. 8(8):3298-3302, 1988). El paso en serie de sobrenadantes de células resistentes a células LMTK- recientes seleccionadas de nuevo en medio HAT da como resultado la selección de vectores estables que expresan TK. Las células TK+ resistentes pueden aislarse y las secuencias de TK rescatarse mediante técnicas estándar basadas en PCR para el análisis de mutaciones (Cowell et al., CDNA Library Protocols, Publicado por Humana Press, 1996). De esta manera, las secuencias se seleccionan tanto para la expresión de la proteína funcional como para la estabilidad genómica de la construcción del vector retroviral. Se pueden emplear estrategias similares para la UPRT (SEQ ID NO: 11, 13), OPRT (SEQ ID NO: 15, 17) (Olah et al., Cancer Res. 40:2869-2875, 1980; y Suttle, Somatic Cell & Mol. Genet., 15(5):435-443, 1989) y otros genes de interés.

Como alternativa, OPRT, UPRT, TK u otro PAE se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra glicoproteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENVI y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus [Palu 2000, Baum 2006, citado anteriormente]. Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se delecionan los genes GAG y POL, la ENV corresponde a un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g y el IRES o un promotor tal como RSV está operativamente unido directamente a OPRT, UPRT, TK u otro gen de PAE.

La infección mixta de células por virus VSV-g pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro (Emi et al., J. Virol. 65:1202, 1991). Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 y 20 da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar YCD2 y OPRT en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con 5-FC.

El retrovirus recombinante de la divulgación puede usarse para el tratamiento de un trastorno neuronal por ejemplo, puede contener, opcionalmente, un gen exógeno, por ejemplo, un gen que codifica un receptor o un gen que codifica un ligando. Tales receptores incluyen receptores que responden a dopamina, GABA, adrenalina, noradrenalina, serotonina, glutamato, acetilcolina y otros neuropéptidos, como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de ligandos que pueden proporcionar un efecto terapéutico en un trastorno neuronal incluyen dopamina, adrenalina, noradrenalina, acetilcolina, ácido gamma-aminobutírico y serotonina. La difusión y captación de un ligando requerido después de la secreción por una célula donante infectada sería beneficiosa en un trastorno donde la célula neural del sujeto es defectuosa en la producción de tal producto génico. Una célula modificada genéticamente para secretar un factor neurotrófico, tal como el factor de crecimiento nervioso, (NGF), podría utilizarse para prevenir la degeneración de neuronas colinérgicas que, de otro modo, podrían morir sin tratamiento.

Como alternativa, las células se injertan en un sujeto con un trastorno de los ganglios basales, tales como la enfermedad de Parkinson, pueden modificarse para que contengan un gen exógeno que codifica L-DOPA, el precursor de la dopamina. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo, que tiene los ganglios basales como su principal órgano diana.

Otros trastornos neuronales que pueden tratarse de manera similar por el método de la divulgación incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, los daños neuronales producidos por un accidente cerebrovascular y los daños en la médula espinal. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. El neurotransmisor de estas neuronas es la acetilcolina, que es necesaria para su supervivencia. El injerto de células colinérgicas infectadas con un retrovirus recombinante de la divulgación que contiene un gen exógeno para un factor que estimularía supervivencia de estas neuronas puede conseguirse mediante el método de la divulgación, tal como se ha descrito. Después de un accidente cerebrovascular, hay pérdida selectiva de células en el CA1 del hipocampo, así como pérdida de células corticales que pueden subyacer a la pérdida de función cognitiva y de memoria en estos pacientes. Una vez identificadas, las moléculas responsables de la muerte celular CA1 pueden inhibirse mediante los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, las secuencias antisentido o un gen que codifica un antagonista pueden transferirse a una célula neuronal e implantarse en la región hipocámpal del cerebro.

Para enfermedades debidas a la deficiencia de un producto proteico, la transferencia génica podría introducir un gen normal en los tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Por ejemplo, puede ser deseable insertar un ácido nucleico que codifica

el factor IX en un retrovirus para la infección de una célula muscular o hepática.

La divulgación también proporciona terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares o inmunológicos. Dicha terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de un polinucleótido antisentido, de ARNsi o codificante dominante negativo en células que tienen el trastorno proliferativo, donde el polinucleótido se une y evita la traducción o la expresión de un gen asociado con un trastorno proliferativo celular. La liberación de ácidos nucleicos heterólogos útiles en el tratamiento o modulación de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, polinucleótidos antisentido o de ARNⁱ) se puede conseguir usando un vector retroviral recombinante de la divulgación. En otra realización, un trastorno proliferativo celular se trata introduciendo un polinucleótido CD de la divulgación, expresando el polinucleótido para producir un polipéptido que comprende actividad de citosina desaminasa y poniendo en contacto la célula con 5-fluorocitosina en una cantidad y durante un periodo de tiempo para producir una cantidad citotóxica de 5- FU.

Además, la divulgación proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica un vector retroviral recombinante de la divulgación. La secuencia polinucleotídica puede incorporarse en diversas partículas del virus. Por ejemplo, diversos vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus y más particularmente un gamma retrovirus de mamífero. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino, simio o humano. Ejemplos de vectores retrovirales en que puede insertarse un gen extraño (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica heteróloga) incluyen, pero no se limitan a: derivados del virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia murina Moloney (MoMuLV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia de mono de gibón (GALV), virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Mediante la inserción de una secuencia heteróloga de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando de un receptor sobre una célula diana específica, el vector es ahora específico de la diana. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana a través de la unión de, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se logra utilizando un anticuerpo o ligando para dirigirse al vector retroviral. Los expertos en la técnica sabrán, o pueden determinar fácilmente, sin experimentación indebida, secuencias polinucleotídicas específicas que pueden insertarse en el genoma retroviral o fijarse a una envoltura de virus para permitir la liberación específica del vector retroviral que contiene el polinucleótido heterólogo. Además, el vector retroviral puede dirigirse a una célula utilizando un elemento regulador específico de células o tejidos contenido en la LTR del genoma retroviral. Preferiblemente, el elemento regulador específico de células o tejidos está en la región U3 de las LTR. De esta manera, después de la integración en una célula, el genoma retroviral solo se expresará en células donde el promotor específico de células o tejidos está activo.

En otra realización más, la divulgación proporciona plásmidos que comprenden una construcción derivada de retrovirus recombinante. El plásmido puede introducirse directamente en una célula diana o en un cultivo celular, tal como NIH 3T3 u otras células de cultivo de tejidos. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

La divulgación proporciona una construcción polinucleotídica que comprende de 5' a 3': un promotor o región reguladora útil para iniciar la transcripción; una señal de empaquetamiento psi; una secuencia de ácido nucleico que codifica *gag*, una secuencia de ácido nucleico que codifica *pol*; una secuencia de ácido nucleico codificante *env*; una secuencia de ácido nucleico del sitio interno de entrada al ribosoma; un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador, polipéptido terapéutico o de diagnóstico; y una secuencia de ácido nucleico LTR. Como se ha descrito en otra parte del presente documento y como sigue, los diversos segmentos de la construcción de polinucleótido de la divulgación (por ejemplo, un polinucleótido retroviral recombinante competente para la replicación) se modifica genéticamente dependiendo, en parte, de la célula huésped deseada, del tiempo o cantidad de expresión y del polinucleótido heterólogo. Una construcción retroviral competente para la replicación de la divulgación puede dividirse en una serie de dominios que los expertos en la técnica pueden modificar individualmente.

Por ejemplo, el promotor puede comprender un promotor de CMV que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de uno o más (por ejemplo, 2-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100 o más bases de ácido nucleico) siempre que el promotor modificado sea capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En una realización, el promotor o región reguladora comprende un polinucleótido de dominio CMV-R-U5. El dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV. En una realización, el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia tal como se ha expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22, donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma. El dominio *gag* del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente derivará de un gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gamma-retrovirus de mamífero. En una realización, el dominio *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio *pol* del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente

derivará de un gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gamma-retrovirus de mamífero. En una realización, el dominio pol comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 hasta aproximadamente el nucleótido 6358 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio env del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente derivará de un gammaretrovirus o gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gammaretrovirus o gamma-retrovirus de mamífero. En algunas realizaciones, el dominio de codificación de env comprende un dominio env anfotrópico. En una realización, el dominio env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio IRES del polinucleótido puede obtenerse a partir de cualquier número de sitios internos de entrada al ribosoma. En una realización, el IRES deriva de un virus de encefalomiocarditis. En una realización, el dominio de IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 hasta aproximadamente el nucleótido 8876 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, o 99 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma, siempre que el dominio permita la entrada de un ribosoma. El dominio heterólogo puede comprender una citosina desaminasa de la divulgación. En una realización, el polinucleótido CD comprende una secuencia optimizada para codones humanos. En otra realización más, el polinucleótido CD codifica un polipéptido mutante que tiene citosina desaminasa, donde las mutaciones confieren una estabilización térmica incrementada que aumenta la temperatura de fusión (T_m) en 10 °C, permitiendo una actividad cinética sostenida en un intervalo de temperatura más amplio y mayores niveles acumulados de proteína. En una realización, la citosina desaminasa comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 8877 hasta aproximadamente 9353. El dominio heterólogo puede estar seguido de un dominio rico en polipurina. La LTR en 3' puede derivar de cualquier número de retrovirus, típicamente un gammaretrovirus y, preferiblemente, un gammaretrovirus de mamífero. En una realización, la LTR 3' comprende un dominio U3-R-U5. En otra realización más, la LTR comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 9405 hasta aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 % o 99,5 % (redondeada a la décima más próxima) idéntica a la misma.

La divulgación también proporciona un vector retroviral recombinante que comprende de 5' a 3' un R-U5 de CMV, fusión del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión del cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; una señal de empaquetamiento ψ ; un gag, ORF para el antígeno específico del grupo MLV; un pol, ORF para la poliproteína polimerasa MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; un env 4070A, ORF para la proteína de la envoltura de la cepa 4070A de MLV; un IRES, sitio interno de entrada al ribosoma del virus de encefalomiocarditis; una citosina desaminasa modificada (termoestabilizada y optimizada por codones); un PPT, tira de polipurina; y una repetición terminal larga U3-R-U5 de MLV. Esta estructura se representa adicionalmente en la Figura 3.

La divulgación también proporciona un vector retroviral que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22.

Un número de agentes quimioterapéuticos están actualmente en el mercado con diferentes grados de éxito desde la remisión completa a la remisión temporal y la vida prolongada con recurrencia esperada. Algunos de los agentes terapéuticos contra el cáncer en el mercado están dirigidos a las propiedades angiogénicas vasculares del tumor. La composición está dirigida a la angiogénesis de los tumores, buscando reducir la irrigación de sangre y suministro nutrientes al tumor o al cáncer y, de este modo, reducir el tumor y prolongar la vida del sujeto. El VEGF es un factor angiogénico conocido por desempeñar un papel en el crecimiento tumoral. De este modo, se han desarrollado antagonistas del VEGF como agentes anticancerosos.

El VEGF humano participa en la neovangiogénesis en la vasculatura normal y maligna; está sobreexpresado en la mayoría de las neoplasias malignas y los altos niveles se han correlacionado con un mayor riesgo de metástasis y un mal pronóstico en muchos. Cuando el VEGF interacciona con su receptor en los modelos *in vitro* de angiogénesis, se producen proliferación de células endoteliales y formación de nuevos vasos sanguíneos. En modelos animales, se ha demostrado que el VEGF induce la proliferación / migración de células endoteliales vasculares, sostiene la supervivencia de los vasos sanguíneos recién formados y aumenta la permeabilidad vascular.

Un agente antagonista de VEGF es uno que está dirigido o regula negativamente la vía de señalización del VEGF. Entre los ejemplos se incluyen inhibidores de VEGF (por ejemplo, agentes que inhiben directamente el VEGF (por ejemplo, VEGF-A, -B, -C, o -D), tal como mediante la unión de VEGF (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab (AVASTIN®) o ranibizumab (LUCENTIS®) u otros inhibidores tales como pegaptanib, NEOVASTAT®, AE-941, VEGF Trap, y PI-88)), moduladores de la expresión de VEGF (por ejemplo, INGN-241, tetratiomolibdato oral, 2-metoxiestradiol, metoxiestradiol en dispersión de nanocristales, bevasiranib sódico, PTC-299, Veglin), inhibidores de un receptor de VEGF (por ejemplo, KDR o receptor III de VEGF (Flt4), por ejemplo anticuerpos anti-KDR, anticuerpos frente a VEGFR2 tales como CDP-791, IMC-1121B, bloqueadores de VEGFR2 tales como CT-322), moduladores de la expresión de VEGFR (por ejemplo, modulador de expresión de VEGFR1 Sirna-027) o inhibidores de la señalización aguas abajo del receptor de VEGF. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente antagonista de VEGF es bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, sorafenib, sunitinib,

AE-941, VEGF Trap, pazopanib, vandetanib, vatalanib, cediranib, fenretinida, esqualamina, INGN-241, tetratiomolibdato oral, tetratiomolibdato, Panzem NCD, 2-metoxiestradiol, AEE-788, AG-013958, bevasiranib sódico, AMG-706, axitinib, BIBF-1120, CDP-791, CP-547632, PI-88, SU-14813, SU-6668, XL-647, XL-999, IMC-1121B, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, CT-322, CX-3542, E-7080, ENMD-1198, OSI-930, PTC-299, Sirna-027, TKI-258, Veglin, XL-184 o ZK-304709.

Bevacizumab (AVASTATIN®) (rhuMAb-VEGF) (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) es un anticuerpo monoclonal recombinante humano / murino quimérico dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)). Se prepara mediante ingeniería de residuos de unión a VEGF de un anticuerpo monoclonal murino anti-VEGF en regiones estructurales de la inmunoglobulina-1 humana (IgG1) (Ficha técnica de Avastin, 2004). Solo el 7 % de la secuencia de aminoácidos deriva del anticuerpo murino y un 93 % de IgG1. Bevacizumab se une y neutraliza todas las formas de VEGF humanas mediante el reconocimiento de los sitios de unión para los dos tipos de receptores VEGF humanos (flt-1 y flk-1). En modelos animales, se ha demostrado que el anticuerpo estabiliza tumores establecidos o suprime el crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis inducida por VEGF.

La farmacocinética del bevacizumab es lineal después de dosis de 0,3 mg / kg o mayores (Anon, 2002). Después de infusiones intravenosas de 90 minutos de 0,3, 1, 3 y 10 mg / kg en pacientes con cáncer avanzado (n = 25), las concentraciones séricas máximas de bevacizumab oscilaron entre 5 y 9 mcg / ml, 21 a 39 mcg / ml, de 52 a 92 mcg / ml, y de 186 a 294 mcg / ml, respectivamente; se observó ligera acumulación con dosis repetidas (semanalmente), pero esto no fue significativo y la farmacocinética se mantuvo lineal. Se obtuvieron niveles estacionarios de bevacizumab 100 días después de 1 a 20 mg / kg por semana, cada 2 semanas o cada 3 semanas.

La dosis recomendada de bevacizumab es de 5 miligramos / kilogramo infundidos por vía intravenosa durante 30 minutos cada 2 semanas hasta que la progresión de la enfermedad disminuye. Bevacizumab debe seguir a la quimioterapia. No se ha establecido la eficacia del bevacizumab en monoterapia. Bevacizumab (que puede administrarse con gemcitabina y docetaxel, o dentro de una semana antes o después de la quimioterapia), se administra por vía intravenosa, a aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 15 mg / kg, preferiblemente aproximadamente 5 mg / kg.

Los métodos y las composiciones de la divulgación son útiles en terapias de combinación, incluyendo terapias con bevacizumab. Como se divulga en el presente documento, un retrovirus competente para la replicación (RCR) de la divulgación que comprende un gen terapéutico (por ejemplo, un gen citotóxico) es útil en el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. Una ventaja del RCR de la divulgación incluye su capacidad para infectar células en replicación cancerosas. Cuando el transgén del vector comprende un gen citotóxico (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido que convierte un agente no citotóxico en un agente citotóxico) proporciona la capacidad para destruir células cancerosas.

La divulgación proporciona métodos para tratar trastornos proliferativos celulares, tales como cáncer y neoplasias, que comprenden administrar un vector de RCR de la divulgación producido por las células HT1080 + T5.0002 o células derivadas de HT1080 similares que producen vectores que codifican otros genes heterólogos, seguido de tratamiento con un agente quimioterapéutico o un agente anticanceroso. En una realización, el vector de RCR se administra a un sujeto durante un período de tiempo previo a la administración del agente quimioterapéutico o anticanceroso que permite que el RCR infecte y se replique. El sujeto se trata después con un agente quimioterapéutico o un agente anticanceroso durante un período de tiempo y dosis para reducir la proliferación o matar las células cancerosas. En un aspecto, si el tratamiento con el agente quimioterapéutico o anticanceroso reduce, pero no mata el cáncer / tumor (por ejemplo, remisión parcial o remisión temporal), el sujeto puede tratarse después con un agente terapéutico no tóxico (por ejemplo, 5-FC) que se convierte en un agente terapéutico tóxico en la células que expresan un gen citotóxico (por ejemplo, citosina-desaminasa) del RCR. Usando dichos métodos, los vectores RCXR de la divulgación se propagan durante un proceso de replicación de las células tumorales, dichas células pueden después ser destruidas por el tratamiento con un agente anticanceroso o quimioterapéutico y puede matarlas adicionalmente utilizando el procedimiento de tratamiento con RCR descrito en el presente documento.

En aún otra realización de la divulgación, el gen heterólogo puede comprender una secuencia codificante para un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de cáncer). En esta realización, las células que comprenden un trastorno proliferativo celular se infectan con un RCR que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica el antígeno diana para proporcionar la expresión del antígeno diana (por ejemplo, la sobreexpresión de un antígeno de cáncer). A continuación, se administra al sujeto un agente anticanceroso que comprende un resto afín dirigido que interacciona específicamente con el antígeno diana. El resto afín dirigido puede estar unido operativamente a un agente citotóxico o puede ser por sí mismo un agente anticanceroso. Por lo tanto, una célula cancerosa infectada por el RCR que comprende las secuencias codificantes del antígeno diana, aumenta la expresión de la diana en la célula cancerosa, dando como resultado un aumento de la eficiencia/ eficacia del direccionamiento citotóxico.

Se ha demostrado que el bloqueo de las interacciones entre las células del sistema inmunológico tiene efectos inmunológicos significativos, ya sea de activación o de supresión (Waldmann Annu Rev Med. 57:65 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que el bloqueo de la interacción de CTLA-4 (CD 152) y B7.1 (CD80) que modula la activación de células T causa estimulación inmunitaria, presumiblemente bloqueando esta interacción supresora

(Peggs et al. *Curr. Opin. Immunol.* 18:206, 2006). Este bloqueo se puede lograr potencialmente mediante anticuerpos contra CTLA-4 o por B7.1 soluble. La administración sistémica de estos tipos de moléculas puede tener efectos globales indeseables que pueden conducir, como mínimo, a efectos secundarios perjudiciales, o incluso a la muerte, en el caso de un agonista de C28 (Suntharalingam et al. *NEJM* 355 1018 2006). Pfizer ha estado desarrollando uno de estos anticuerpos anti-bloqueo CTLA-4 (CP-675,206) como un reactivo contra el cáncer, pero recientemente ha dejado de desarrollarlo debido a los efectos secundarios significativos. La administración local de moléculas de bloqueo que se liberan en el medio ambiente local, del tumor después de la infección con un vector competente para la replicación que codifica dichas moléculas que se liberan en el espacio extracelular, proporciona la modulación inmunológica localmente y evita estos serios efectos secundarios. Las moléculas de bloqueo son anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, versiones solubles del ligando natural u otros péptidos que se unen a tales receptores.

Así, en otra realización más, un RCR de la divulgación puede comprender una secuencia codificante que comprende un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de anticuerpo o ligando de receptor) que interacciona específicamente con un antígeno o ligando afín. El RCR que comprende la secuencia de codificación para el dominio de unión puede usarse después para infectar células en un sujeto que comprende un trastorno proliferativo celular, tal como una célula cancerosa o célula neoplásica. A continuación, la célula infectada expresará el dominio de unión o anticuerpo. Un antígeno o afín unido operativamente a un agente citotóxico o que es citotóxico en sí mismo puede administrarse a un sujeto. Por consiguiente, el afín citotóxico matará selectivamente las células infectadas que expresen el dominio de unión. Como alternativa, el propio dominio de unión puede ser un agente anticanceroso.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término anticuerpo engloba fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, F(ab')₂, fragmento Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas que se denominan regiones estructurales (FR). La extensión de la región estructural y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91-3242 y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En el presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL está compuesta típicamente por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi, en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio del dominio variable o constante de las moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina contienen típicamente dos láminas β formadas por aproximadamente siete hebras β y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams y A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405). Las estructuras canónicas de los bucles hipervariables de una variable de inmunoglobulina pueden deducirse a partir de su secuencia, como se divulga en Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14(18):4628-38.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir todo o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N o C-terminales, los aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o "sitio de unión a antígeno"), por ejemplo, una estructura que interacciona con Tie1, por ejemplo se une a o inhibe Tie1.

La cadena de VH o VL del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de este modo una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están interconectadas a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de la cadena pesada incluye tres dominios CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente participan en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunológico (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El

término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos lambda o kappa. En una forma de realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpo y / o citotoxicidad mediada por complemento.

5 El término "anticuerpo mono-específico" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad para una diana particular, por ejemplo epítipo. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" que se refiere a un anticuerpo que se produce como una única especie molecular, por ejemplo, a partir de una población de células aisladas homogéneas. Una "composición de anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos en una composición que incluye una única especie molecular de anticuerpo. En una realización, un anticuerpo monoclonal es producido por una célula de mamífero. Una o más especies de anticuerpos monoclonales pueden combinarse.

15 Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. La CDR3 de la CH puede ser humana. Una o más de las regiones estructurales pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de las CH o CL. En una realización, todas las regiones estructurales son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de líneas germinales, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. En otra realización, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 o 98 % de las regiones estructurales (por ejemplo FR1, FR2 y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3 y FR4, colectivamente) o el anticuerpo entero puede ser humano o efectivamente humano. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 pueden ser colectivamente, por lo menos, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 99 % idénticos a una secuencia humana codificada por un segmento V de la línea germinal humana de un locus que codifica una secuencia de la cadena ligera o pesada.

30 Todo o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Ejemplos de genes de inmunoglobulina humana incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 kDa o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulinas de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) están codificadas, de forma similar, por el gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionadas en lo que antecede, por ejemplo gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Una cadena ligera se refiere a cualquier polipéptido que incluya un dominio variable de la cadena ligera. Una cadena pesada se refiere a cualquier polipéptido que incluya un dominio variable de la cadena pesada.

40 La divulgación proporciona un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular. El sujeto puede ser cualquier mamífero y, preferentemente, es un ser humano. El sujeto se pone en contacto con un vector retroviral competente para la replicación recombinante de la divulgación. El contacto puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Los métodos de administración del vector retroviral de la divulgación son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, administración sistémica, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intramuscular, intracraneal, cerebrospinal, así como administración directamente en el sitio de un tumor o trastorno proliferativo celular. Otras vías de administración conocidas en la técnica.

50 Por lo tanto, la divulgación incluye diversas composiciones farmacéuticas útiles para tratar un trastorno proliferativo celular. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación se preparan llevando a un vector retroviral que contiene una secuencia polinucleotídica heteróloga útil en el tratamiento o modulación de un trastorno proliferativo celular de acuerdo con la divulgación a una forma adecuada para la administración a un sujeto usando vehículos, excipientes y aditivos o auxiliares. Los vehículos o auxiliares usados con frecuencia incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes. Entre los conservantes se incluyen antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, como se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y el The National Formulary XIV, 14^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con las habilidades de rutina en la técnica. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7^a ed.)

65 Por ejemplo, y no a modo de limitación, un vector retroviral útil en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluirá una proteína ENV anfotrópica, proteínas GAG y POL, una secuencia del promotor en el genoma retroviral de

la región U3, y toda la secuencia que actúa en cis necesaria para la replicación, empaquetamiento e integración del genoma retroviral en la célula diana.

Como se ha descrito anteriormente, la divulgación proporciona células huésped (por ejemplo, células 293 o células HT1080) que se transducen (transforman o transfectan) con un vector proporcionado en el presente documento. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido (por ejemplo, tal como se utiliza con células 293T), una partícula vírica (tal como se utiliza con células HT1080), un fago, etc. Las células huésped pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar un polinucleótido codificador. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la técnica y en las referencias citadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Sambrook, Ausubel y Berger, así como, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed. (Wiley-Liss, New York) las referencias citadas en el mismo.

En una realización de la divulgación, una célula productora produce vectores retrovirales competentes para la replicación que tienen una estabilidad incrementada con respecto a los vectores retrovirales producidos por técnicas convencionales de transfección transitoria. Dicha estabilidad incrementada durante la producción, la infección y la replicación es importante para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. La combinación de eficiencia de la transducción, estabilidad de los transgenes y selectividad de la diana se proporciona por el retrovirus competente para la replicación. Las composiciones y métodos proporcionan estabilidad del inserto y mantienen la actividad de transcripción del transgén y la viabilidad de traducción del polipéptido codificado.

Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar la invención y no pretenden limitar la divulgación más amplia anterior.

Ejemplos

Se produjo AC3-yCD2 (partícula vírica "V") a partir de una línea productora HT1080 + T5.0002 derivada de la línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 (ATCC, n.º de catálogo CCL-121) obtenida directamente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (PO Box 1549, Manassas, VA).

La línea celular HT1080 + T5.0002 se expandió para crear un pre-banco y un posterior banco de células maestras (MCB). MCB se utilizó para producir lotes clínicos. El diagrama de flujo para generar el pre-banco y el banco de células maestras se muestra en la Figura 1.

El vector viral Toca511 está codificado por un plásmido (pAC3-yCD2; también conocido como T5.0002) que consiste en 11.893 pares de bases de nucleótidos. El diagrama 1 a continuación proporciona un mapa de enzimas de restricción de la construcción total del plásmido pAC3-yCD2 junto con la localización de la secuencia de ciertos elementos genéticos.

Esquema general para preparar líneas celulares productoras de expresión estable que construyen el vector competente para la replicación AC3-yCD2 (V). La línea de células productoras de vectores "HT1080 + T5.0002", se produjo mediante transducción de células HT1080 intactas con virus AC3-yCD2 producidos de forma transitoria en células 293T mediante transfección (véase la figura 1). La transfección transitoria utilizada para producir AC3-yCD2 (partículas víricas) se llevó a cabo usando la "reserva de plásmido cualificada" secuenciada con GLP. Más específicamente, el vector AC3-yCD2 producido de forma transitoria se recogió después de 48 horas después de la transfección y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm con 0,8 ml de sobrenadante filtrado usado para transducir un cultivo confluyente al 75 % de células HT1080 que contienen 15 ml de medio. Este volumen de infección se convirtió en una dosis de transducción aproximada de aproximadamente 0,1 unidades de transducción (UT) por célula. Se dejó que la transducción se extendiera por todo el cultivo durante 9 días con células realimentadas o pasadas cada 2-4 días antes de congelar la reserva de prebanco inicial que consistía en 12 viales, de modo que cada vial contenía aproximadamente 5×10^6 células por vial. Los medios de congelación incluían DMSO al 10 %, USP (Cryoserv, Bioniche Pharma USA, LLC, Lake Forest, IL) y suero bovino fetal al 90 % irradiado con rayos gamma (Hyclone laboratorios, Inc, Logan Utah). Las células se congelaron en un congelador a -80 °C y después se transfirieron a un congelador de nitrógeno líquido en condiciones de fase de vapor al día siguiente. El medio utilizado para el crecimiento de células HT1080 + T5.0002 para producir el vector comprende un medio DMEM definido, GlutaMax (sustituto de L-glutamina), aminoácidos no esenciales (NEAA) y suero bovino fetal (FBS) definido.

La línea celular 293T se desarrolló a partir de células 293 HEK (riñón embrionario humano) y se describió originalmente en 1987 (Dubridge 1987). La línea celular se desarrolló transfectando un mutante de antígeno-T de SV40 sensible a la temperatura, tsA1609 (Dubridge 1987), en células HEK 293 (Graham 1977). Las células 293T son más susceptibles a la transfección que la línea celular HEK 293 original. Debido a su mayor transfectabilidad, las células 293T se han usado habitualmente para producir vectores de título elevado mediante transfección transitoria (Yang et al., *Hum. Gene Ther.* 10: 123 - 132 1999).

Ejemplo 2: Preparación del vector a partir de la línea productora de expresión estable HT1080 + T5.0002

- como una línea adherente con suero bovino fetal. Las células HT1080 + T5.0002 se cultivan en recipientes de cultivo de células multicapa desechables (Cell Stack, Corning). La producción del vector retroviral Toca 511 bruto se lleva a cabo recolectando el medio acondicionado de cultivos confluentes de células HT1080 + T5.0002 recolectadas cada 10-24 horas durante 2-4 ciclos de recolección usando un proceso discontinuo alimentado manualmente usando múltiples pilas de células que contienen aproximadamente 1,2 l de medios acondicionados cada uno. El vector retroviral TOCA 511 en bruto se recoge directamente en bolsas de proceso de 10 – 20 l y se almacena a 2-8 °C hasta que se recogen aproximadamente 40 l de material. La muestra de la cosecha bruta combinada utilizada para PTC micoplasma, pruebas víricas in vitro, carga biológica, titulación de PCR informativa y retenciones.
- El material de vector en bruto se clarifica pasando a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros y se trata con Benzonasa para digerir el ADN genómico de la célula huésped. El vector TOCA 511 digerido con ADN y clarificado se captura a continuación y se concentra usando cromatografía de intercambio aniónico (AEX). El producto en bruto concentrado eluido se somete a continuación a una etapa de intercambio de tampón y purificación usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El tampón de formulación comprende tampón de formulación basado en Tris que contiene cloruro de sodio, sacarosa, manitol, ascorbato, ácido ascórbico y seroalbúmina humana. El volumen formulado se filtró a través de 0,2 µm para asegurar la esterilidad, se obtuvieron muestras para ensayo y después se repartió en múltiples recipientes como material a granel almacenado congelado por debajo de (<) -65 °C.
- El vector producido a partir de células HT1080 + T5.0002 se analizó en células PC3 (adenocarcinoma de próstata humana) intactas o células U-87 (glioblastoma-astrocitoma humano), dependiendo de la prueba. Estas pruebas incluyeron; (1) transferencia de la expresión de la proteína CD (citosina desaminasa) mediante análisis Western, (2) actividad de CD funcional de la proteína CD para convertir 5-FC en 5-FU mediante análisis HPLC, así como (3) medición de la capacidad para que 5-FC mate células U-87 (ensayo MTS) transducidas con AC3-yCD2 (V).

Ejemplo 3: Construcción de vectores que codifican citosina desaminasa, proteína fluorescente verde (GFP), interferón gamma (IFN) de ratón y otras proteínas o ácidos nucleicos. Estos vectores retrovirales replicativos se construyeron como se ha descrito previamente en el documento WO 2010/036986. La Tabla 1 que describe la naturaleza de algunos de estos vectores se incluye a continuación.

Tabla 1: Construcciones de vectores y nombres

| Código de ref. | Nombre de referencia | Nombre original | Prom. en 5'LTR | Envoltura | Vector | IRES | Transgén | 3'LTR |
|----------------|----------------------|---------------------------|----------------|---------------|--------|------|------------------------|--------|
| T5.0000 | pACE-yCD | pACE-CD (Tai et al. 2005) | CMV | Anfo. (4070A) | pACE | EMCV | CD de levadura salvaje | MLV U3 |
| T5.0001 | pAC3-yCD1 | CD secuencia opt. | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | CD modificada | MLV U3 |
| T5.0002 | pAC3-yCD2 | CDopt+3pt | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | CD modificada | MLV U3 |
| T5.0006 | pAC3-eGFP | pAC3-emd, pAC3GFP | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | GFP esmeralda | MLV U3 |
| T5.0007 | pAC3-yCD | pAC3-yCD | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | CD de levadura salvaje | MLV U3 |
| | pAC3-mIFNg | pAC3-mIFNg | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | IFN gamma de ratón | MLV U3 |
| | pAC3-hIFNg | pAC3-hIFNg | CMV | Anfo. (4070A) | pAC3 | EMCV | IFN gamma humano | MLV U3 |

- Otros vectores que se pueden producir usando las líneas celulares y los métodos descritos en la presente solicitud también se describen en el documento WO 2010/036986. Estos incluyen vectores que codifican anticuerpos de cadena sencilla, IL-2, ARNim y ARNic bajo el control de un promotor pol III y secuencias diana de ARNic.

- Ejemplo 4: Ensayo de titulación de PCR cuantitativa** La concentración del vector funcional, o título, se determina usando un método basado en PCR cuantitativa (PCRc). En este método, el vector se titula infectando una línea celular huésped transducible (por ejemplo, células de carcinoma prostático humano PC-3, ATCC n.º cat. CRL-1435) con un volumen estándar del vector y midiendo la cantidad resultante de provirus presente dentro de las células huésped después de la transducción. Las células y el vector se incuban en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 5 % de CO₂) durante 24 horas para permitir una infección completa antes de la adición del AZT antirretroviral para detener la replicación del vector. A continuación, se recogen las células de la placa de cultivo y se purifica el ADN genómico (ADNg) usando un kit de purificación de ADNg de Invitrogen Purelink y se eluye de la columna de purificación con agua estéril libre de RNasa / DNasa. La relación de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀ se mide en un espectrofotómetro para determinar la concentración y la pureza relativa de la muestra. Las concentraciones de

ADNg se normalizan con agua adicional libre de RNasa / DNasa hasta la concentración más baja de cualquier conjunto dado de preparaciones de ADNg de tal manera que el ADN de entrada para la PCRc sea constante para todas las muestras analizadas. La pureza del ADN genómico se evalúa además mediante electroforesis de una alícuota de cada muestra en un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio. Si la muestra pasa por un intervalo de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1,8-2,0 y muestra una única banda de ADNg, la muestra está lista para el análisis PCRc del número de copias del provirus del vector. Utilizando cebadores que interrogan la región LTR del provirus (ADN del vector transcrito inversamente y ADN del vector que está integrado en el ADNg del huésped), la PCRc se realiza para estimar el número total de eventos de transducción que se produjeron cuando se usó el volumen conocido del vector para transducir el número de células conocido. El número de eventos de transducción mediante reacción se calcula a partir de una curva estándar que utiliza un plásmido portador de la diana de un número de copias conocido que se diluye en serie desde 10^7 a 10 copias y se mide en condiciones idénticas de PCRc como las muestras. Conociendo cuántos equivalentes genómicos se usaron para cada reacción de PCRc (a partir de la concentración previamente determinada) y cuántos acontecimientos de transducción que se produjeron por reacción, los inventores determinaron el número total de acontecimientos de transducción que se produjeron en base al número total de células que estaban presentes en el tiempo de transducción. Este valor es el título del vector después de la dilución en el medio que contiene las células durante la transducción inicial. Para calcular el valor de título corregido, la dilución se corrige multiplicando por el volumen de cultivo y el volumen del título dividido por el volumen de título. Estos experimentos se realizan en cultivos por duplicados y se analizan mediante PCRc usando mediciones por triplicado para cada condición para determinar un título promedio y con su desviación estándar y coeficiente de varianza asociados.

Ejemplo 5: Ensayo de potencia para vectores que codifican citosina desaminasa. Este ensayo evalúa muestras de células para determinar la actividad de citosina desaminasa 4 días después de la transducción y mide tanto la capacidad de replicación del vector como la correspondiente actividad de citosina desaminasa. Se cultivaron células U-87 en placas de 96 pocillos y se transdujeron con una serie de diluciones de virus (hasta 12 diluciones a intervalos de semilog). Se añadió 5-fluorocitosina a las células durante una hora, se detuvo la reacción mediante la adición de ácido tricloroacético al 10 % y la mezcla filtrada resultante se analizó mediante HPLC para determinar la actividad de la citosina desaminasa midiendo el 5-fluorouracilo producido. El ensayo de HPLC se realizó en una unidad Shimadzu LC20AT conectada en serie con un detector de fotomatrix y un autoinyector. El método de HPLC utilizó una columna Hypersil BDS C18N de forma isocrática a 1 ml / min con 95 % de tampón A: fosfato de amonio 50 mM que contiene 0,1 % de perclorato de tetra-n-butilamonio con ajuste de pH del tampón a 2,1 con ácido fosfórico y 5 % de disolvente B: 100 % de metanol. El tiempo de carrera fue de 6 minutos. El conjunto de detectores de fotodiodos explora de 190 a 350 nm con cromatogramas seleccionados para mostrar absorbancia a 264 nm para 5-fluorouracilo. La función Buscador se utiliza para transferir datos en un informe masivo con el tiempo de retención de 5-fluorouracilo y el área a 264 nm y el tiempo de retención de 5-fluorocitosina y el área a 285 nm. El área del pico se representa después frente a la dilución introducida para generar un ajuste de curva de 4 parámetros y los valores de CE_{50} de la muestra de ensayo se comparan con un vector de referencia interno (véanse las figuras 10 y 11 para ejemplos de estos gráficos).

Ejemplo 6: Purificación y concentración del vector. Los vectores de la divulgación se fabricaron mediante transfección transitoria sobre las células 293T o de un grupo de células productoras o de una línea celular productora clonada. El medio puede estar con suero o libre de suero y las células se pueden cultivar como células adherentes o en suspensión, normalmente en el modo de perfusión. El medio se recogió y cuando se hizo a partir de las líneas de células productoras estables, se almacenó durante hasta 2 semanas a 2-8 grados centígrados. El vector de las líneas celulares estables tuvo una semivida a 2-8 grados C que es mayor de 7 días, mientras que esto no es cierto para el material producido mediante transfección transitoria. Esta cosecha a granel se filtró después a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros, se trató con benzonasa (L. Shastry et al Hum Gene Ther 15:221 2004) y otras etapas de cromatografía en columna. (véase, por ejemplo, US5792643; T. Rodriguez et al. J Gene Med 9:233 2007; P.Sheridan et al Mol.Ther. 2:262-275 2000). Las preparaciones de vectores se cargaron en una columna de intercambio aniónico y el vector se eluyó en un gradiente de NaCl. La fracción que contiene el vector se identificó inicialmente utilizando el ensayo de PCR (ejemplo 4), y posteriormente mediante la A260, y las fracciones positivas se recogieron y agruparon. A continuación, la preparación se cargó en una columna de exclusión por tamaño (SEC) para eliminar la sal y otros contaminantes restantes. La SEC se eluye con tampón de formulación y la fracción de vector en la columna SEC se recogió a partir del volumen de huecos y se ensayó como material a granel para el título. A continuación, se filtró a través de filtros de 0,2 micrómetros y 0,8 a 3 ml se alicuotaron en viales. El material clínico se libera en base a pruebas estándar, tales como esterilidad, micoplasma y endotoxinas, además de la potencia específica del producto (ejemplo 5, Figuras. 10 y 11), resistencia (ejemplo 4) y ensayo de identidad. El título se determina como unidades de transducción (UT) mediante cuantificación por PCR del ADN del vector vírico integrado en las células diana (Ejemplo 4). El producto final tiene como objetivo tener un título de hasta 10^9 TU / ml formulado en solución de sacarosa isotónica tamponada con Tris, como un inyectable estéril.

En general, para determinar con exactitud y precisión la resistencia de los lotes de vectores, se ha desarrollado un ensayo del título basado en PCR cuantitativa (descrito en términos generales en el ejemplo 4). Los detalles del procedimiento de ensayo consisten en las siguientes etapas:

Transducción. Las transducciones se realizan en un formato de placa de 12 pocillos usando la línea celular PC-3

derivada del adenocarcinoma prostático humano estable. Para cada muestra de ensayo, se usan tres diluciones de la preparación del vector no titulada para transducir las células PC-3 en pocillos por triplicado. La replicación del virus se detiene 24 horas después de la transducción con azidotimidina (AZT). Las células se mantienen durante 24 - 64 horas adicionales antes de la recolección y purificación del ADN genómico.

Ejemplo 8: Clonación de un grupo no clonal de células HT1080 infectadas. *Siembra de la dilución.* Los medios precalentados y múltiples placas de cultivo celular de 96 pocillos se marcaron con el fin de identificar el clon basado en la placa y la posición del pocillo y los pocillos se llenaron con medios precalentados que contenían una suspensión de células individuales del HT1080. Un pase temprano de células HT1080 infectadas al 100 % se recogió mediante tripsinización y creación de una suspensión de células que consistía en 1 célula por 600 microlitros. Se suministraron 200 microlitros en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fin de sembrar aproximadamente 0,3 células por pocillo. Al realizar este procedimiento, una mayoría de los pocillos recibieron 0, 1 o 2 células por pocillo. Las células se dejaron unir durante aproximadamente 4 horas y cada pocillo se examinó para eliminar los pocillos que habían recibido más de 1 célula por pocillo o que estaban vacíos.

Propagación del clon. Los pocillos que contenían inicialmente 1 célula por pocillo se cultivaron reemplazando 1/2 del medio (aproximadamente 100 µl) con 100 µl fresco cada 3-4 días por cada pocillo. Se evitó la transferencia accidental de células de un pocillo a otro sustituyendo la punta utilizada para alimentar cada pocillo durante el reemplazo del medio. Se requirió un reemplazo de medio completo cuando las células comenzaron a aproximarse a la confluencia en el pocillo. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, cada candidato clonal se pasó a un pocillo de una placa de 48 pocillos para continuar la expansión. Cada clon se propagó y se pasó a un pocillo de una placa de 6 pocillos, seguido de un matraz T-25, seguido de un matraz T-75 cada vez que las células alcanzaron la confluencia. Una vez que las células clonales alcanzaron la confluencia en un matraz T-75, se prepararon al menos 2-3 viales de células crioconservadas que contenían 1-2x10⁶ células por vial.

Selección de clones basada en el rendimiento. Una vez que los candidatos a clon se congelaron, se llevaron a cabo experimentos de cultivo celular para identificar el clon de mejor rendimiento y los clones de repuesto basados en el rendimiento de la producción del título y en las características ideales del cultivo celular. El mejor clon se eligió basándose en (1) la capacidad del clon para proporcionar los títulos sostenidos más altos durante 2-4 días posteriores con sustitución diaria de medio [véase la Figura 12 y la Tabla 2, a continuación]; (2) la capacidad del virus producido para transferir la expresión del gen deseado de interés a una célula intacta (véanse las Figuras 10 y 11); (3) la capacidad del clon para dividirse razonablemente con un tiempo de duplicación entre 18 - 30 horas y la capacidad para alcanzar la confluencia al 100 % como un césped uniforme de células con un desprendimiento celular mínimo al llegar a la confluencia.

Ejemplo 1.101: Infección de líneas celulares -17 y Cf2-Th para producir un conjunto no clonal y posteriores candidatos a la línea celular productora del vector clonal. Para producir grupos de productores de vectores de las líneas celulares D-17 (osteosarcoma canino ATCC # CCL-183) y Cf2-Th (de timo canino ATCC n.º CRL-1430) que expresan el vector retroviral competente para la replicación de MLV, se usaron los exactos mismos métodos descritos anteriormente para las células HT-1080 para crear las líneas celulares D-17 y Cf2-Th. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Datos que apoyan la creación de grupos de productores y los posteriores clones de dilución de vectores retrovirales competentes para la replicación de HT-1080, D-17 y Cf2-Th

| Línea celular productora del vector de la línea celular | Vector competente para la replicación de MLV expresado | Línea celular parental | Muestra de titulación | Títulos observados (UT/ml)* |
|---|--|------------------------|--|--|
| HT1080+T5.0002 (grupo no clonal) | AC3-yCD2 | HT-1080 | HT+T5.0002, Día 2 HT+T5.0002, Día 3 HT+T5.0002, Día 4 HT+T5.0002, Día 5.5 | 1,56E+06 2,23E+06 1,90E+07 2,57E+07 |
| HT5.yCD2.128A (clon de dilución) | AC3-yCD2 | HT-1080 | Clon 12-8, Día 0 Clon 12-8, Día 1 Clon 12-8, Día 2 Clon 12-8, Día 3 | 5,26E+06 7,94E+06 1,00E+07 1,02E+07 |
| D17+T5.0002 (grupo no clonal) | AC3-yCD2 | D-17 | D17+T5.0002, Día 2 D17+T5.0002, Día 3 D17+T5.0002, Día 4 D17+T5.0002, Día 5.5 | 4,20E+06 3,83E+06 4,87E+06 1,39E+06 |
| D5.yCD2.1G7A (clon de dilución) | AC3-yCD2 | D-17 | D5.yCD2.1G7A, Día 1 D5.yCD2.1G7A, Día 2 | 1,78E+06 2,54E+06 |

| | | | | |
|---|----------|--------|--|--|
| | | | D5.yCD2.1G7A Día 3 | 4,24E+06 |
| CF2+T5.0002 (grupo no clonal) | AC3-yCD2 | Cf2-Th | CF2+T5.0002, Día 2 CF2+T5.0002, Día 3 CF2+T5.0002, Día 4 CF2+T5.0002, Día 5.5 | 4,17E+04 6,97E+03 4,97E+06 3,14E+06 |
| CF5.yCD2.3A12 A (clon de dilución) | AC3-yCD2 | Cf2-Th | CF5.yCD2.3A12A, Día 1 CF5.yCD2.3A12A, Día 2 CF5.yCD2.3A12A, Día 3 | 1,81E+07 2,68E+07 3,78E+06 |
| *UT/ml indica unidades de transducción por ml, según se determina mediante métodos de PCRc cuantitativa para determinar el número de copias de los genomas de MLV províricos integrados después de la transducción en una línea celular U-87 intacta de titulación. | | | | |

Ejemplo 10: Ensayo de infectividad y transferencia de expresión de vectores retrovirales competentes para la replicación producidos a partir de células Cf2-Th infectadas con T5.0006 (vector competente para la replicación de expresión de GFP).

Se realizó una evaluación con el vector retroviral competente para la replicación, T5.0006 (V), que codifica el gen DE la proteína fluorescente verde (GFP) para evaluar la capacidad del vector para infectar y propagarse en líneas celulares tumorales derivadas de caninos. Para este estudio, se recibieron tres líneas celulares de glioblastoma canino, J3T-bg, SDT-3G y G06-A del laboratorio del Dr. Peter Dickinson (University of California, Davis; Vet Med Surgery and Radiological Sciences). Las tres de estas líneas celulares derivaron originalmente de explantes espontáneos de glioma y estaban dentro de 8-14 pases de los aislados originales. Para probar la infectividad viral, se introdujeron 0,1 ml de sobrenadantes del virus T5.0006 (V) filtrados con 0,45 micrómetros en cultivos por triplicado de 2 ml que contenían $4,4 \times 10^5$ células de cada tipo de tumor en placas de cultivo de 6 pocillos con la excepción de SDT-3G, que estaba a $1,9 \times 10^4$ células. Se prepararon placas por triplicado, una placa para cada punto de tiempo. Para rastrear la infectividad, se recolectó una placa con infecciones por triplicado y pocillos de control no infectados los días 1, 3 y 6 para realizar el análisis FACS de determinar la presencia de fluorescencia de GFP para determinar el porcentaje de células infectadas cada día después de la infección. El sobrenadante de virus T5.0006 de inoculación derivó de cultivos infectados internos de células productoras estables Cf2-Th hechas como se ha descrito anteriormente y caracterizadas por el título del virus producido.

Línea productora Cf2-Th+T5.0006 y virus T5.0006(V): Un cultivo de células Cf2-Th, se infectó previamente con el virus T5.0006 (V) producido transitoriamente generado transfectando el plásmido pAC3-emd (también conocido como pT5.0006) en células 293T usando procedimientos estándar de transfección con fosfato cálcico. Después de varios pases y el día de la infección de las tres líneas de células tumorales de glioma canino, se recogieron los sobrenadantes víricos frescos de un cultivo Cf2-Th infectado confluyente y se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μm para eliminar cualquier célula Cf2-Th infectada viable.

Infección de las tres líneas celulares de glioblastoma canino y la línea celular HT-1080 de control positivo: Las tres líneas celulares de glioblastoma canino: J3Tbg, SDT-3G y G06-A, se recibieron como células crioconservadas el 20 de noviembre de 2008 del laboratorio de Dr. Peter Dickinson, University of California, Davis; Vet Med Surgery and Radiological Sciences. Las tres de estas líneas celulares derivaron originalmente de gliomas espontáneos y estaban dentro de 8-14 pases de los aislados originales como se indica en la documentación adjunta con la recepción de los viales congelados. La línea celular de control positivo HT1080 se obtuvo a partir de existencias congeladas internas originarias de la ATCC (CCL-121, Lote 6805248).

Se descongeló un vial de cada línea celular y se cultivó para varios pases en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y Glutamax 200 mM y se incubó a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5 %. Un día antes de infectar las células, se sembró una placa de 6 pocillos con células $5E4 / \text{cm}^2$ ($4,4E5$ células / pocillo) para cada línea celular tumoral en 2 ml de medio DMEM completo recién preparado con la excepción de las placas SDT-3G que se prepararon a $1,9E4$ células / pocillo. Los cultivos HT1080 de control positivo se sembraron 3,5 horas antes de la adición del virus el mismo día de las infecciones víricas de la línea celular tumoral. Las infecciones víricas se realizaron mediante la adición de 0,1 ml de T5.0006 (V) filtrado a tres pocillos de cada placa de 6 pocillos dejando tres pocillos no infectados para servir como controles negativos para el análisis FACS. Después de la infección, las placas se devolvieron a la incubadora a 37 °C. Después de la infección, las placas se devolvieron a la incubadora a 37 °C. Se prepararon placas por triplicado para cada línea celular.

A los 1, 3 y 6 días después de la infección, se recogieron pocillos por triplicado de cada línea celular infectada y no infectada usando reactivo de triceano (Sigma-Aldrich), se lavaron en medio completo y después se fijaron con 1 % de paraformaldehído en PBS con 2 % de FBS y 0,09 % de azida sódica y se almacenaron refrigerados en la oscuridad o sobre hielo hasta que se sometieron a análisis FACS. Obsérvese que los cultivos restantes tras el punto de recolección del día 3 se pasaron el día 3.

Análisis FACS: Todas las células fijadas con paraformaldehído se analizaron en una máquina BD LSRII FACS localizada en Sidney Kimmel Cancer Center (SN H47200068) con análisis usando BD FACS Diva Software Versión 5.0.1. HT1080 y HT1080 y 100 % de células infectadas con GFP de una infección previa se utilizaron para establecer el acotamiento. Cada muestra se leyó una vez.

5 La Tabla 3 muestra los resultados promedio de las lecturas por triplicado del porcentaje de células infectadas después de 1, 3 y 6 días desde la infección. La figura 13 muestra la representación gráfica de los datos. Los datos sugieren que cada línea tumoral canina infectada con T5.0006 (V) demostró algún nivel de expresión de GFP por encima de los controles negativos de fondo, pero se observaron diferencias en la cinética de propagación del virus entre las diferentes líneas celulares tumorales. La línea tumoral G06-A demostró 94,5 % de positividad de GFP 6 días después de la infección, seguida de J3T-bg y SDT-3G, lo que demuestra un 81,2 % y 30,9 % de positividad para GFP en el mismo punto de recolección, respectivamente. Todos los controles fueron válidos con los controles no infectados y mostraron niveles insignificantes de fondo de expresión de GFP y la línea celular de control positivo permisivo de HT1080 que demuestra un 73,6 % de positividad de GFP al día 3 desde la infección (las muestras del día 6 se perdieron). En experimentos anteriores similares, usando las mismas condiciones, la línea de glioma U87 humana se convierte en un 80-90 % positiva para GFP.

10

15

Tabla 3. Resumen del porcentaje de células positivas para la expresión de GFP en tres líneas celulares de glioma canino después de la infección con el vector T5.0006 (GFP).

| Días después de la infección | J3T-bg no infectada (% positivos para GFP) | J3T-bg +T5.0006 (% positivos para GFP) | G06-A no infectada (% positivos para GFP) | G06-A +T5.0006 (% positivos para GFP) | SDT-3G no infectada (% positivos para GFP) | SDT-3G +T5.0006 (% positivos para GFP) | HT1080 no infectada (% positivos para GFP) | HT1080 +T5.0006 (% positivos para GFP) |
|------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|--|--|--|--|
| <u>1 Día</u> | 0,8 | 0,7 | 0,0 | 13,8 | 0,3 | 1,6 | 0,3 | 2,5 |
| <u>3 Días</u> | 0,5 | 13,4 | 0,1 | 61,8 | 0,3 | 8,1 | 0,0 | 73,4 |
| <u>6 Días</u> | 0,3 | 81,2 | 6,2 | 94,5 | 2,2 | 30,9 | perdida | perdida |

perdida= muestra de ensayo perdida

Ejemplo 11: Adaptación de la línea celular productora de vectores del virus de MLV competentes para la replicación a partir de suero y dependencia de la adherencia de un cultivo en suspensión sin suero.

El proceso de adaptación libre de suero se realizó después del cribado e identificación de un clon de dilución adecuado de la línea celular productora de vectores competentes para la replicación de HT-1080. El proceso de adaptación libre de suero también se puede realizar con una línea celular HT1080 productora del vector no clonal. El proceso de adaptación se inició sembrando aproximadamente 2×10^7 células en un matraz agitador de 125 ml que contenía 10 ml de medio acondicionado que contiene 5 % de suero y 10 ml de un medio libre de suero seleccionado de elección, que dio como resultando una concentración sérica reducida del 2,5 %. En este caso, el medio sin suero fue medio de expresión FreeStyle 293 distribuido a través de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA. El cultivo se introdujo en una plataforma de agitación situada en una incubadora de cultivo de tejidos con control tanto de la temperatura como del gas de CO₂. La plataforma de agitación se fijó a una velocidad preferida de 80 RPM y la incubadora se fijó a unas condiciones preferidas de 37 °C y unas condiciones preferidas de CO₂ al 5 %. Cada 3-7 días, el cultivo se realimentó recogiendo células que estaban en suspensión y se sembraron nuevamente en un nuevo matraz agitador que contenía 10 ml del mismo medio acondicionado inicial y 10 ml de medio fresco sin suero manteniendo un nivel de suero de aproximadamente 2,5 %. El cultivo se examinó en cada acontecimiento de realimentación con recuentos de células viables realizados según lo necesario para comprobar la propagación de células. Cuando las células mostraron evidencia de crecimiento basado en la duplicación de las células o el consumo de glucosa, una concentración de suero de 1,67 % se dirigió después ajustando la cantidad de volumen del medio acondicionado y medio libre de suero fresco. El cultivo se examinó nuevamente y se realimentó cada 3 - 7 días. Cuando las células muestran evidencia de crecimiento, se dirigió una concentración sérica de 1,25 % ajustando nuevamente el volumen de medio acondicionado y medio libre de suero fresco. Este proceso se continuó apuntando condiciones suero posteriores de 1,0 %, 0,9 %, 0,83 % hasta que las células estaban en condiciones libres de suero al 100 %. Durante este proceso de adaptación, el cultivo celular se expandió hasta aproximadamente 200 ml de volumen en un matraz de agitación de 1.000 ml dirigido a un cultivo viable mínimo de aproximadamente $0,5$ a $1,0 \times 10^6$ células / ml. Una vez que las células alcanzaron condiciones libres de suero al 100 %, las células se pasaron continuamente en condiciones libres de suero aislando células suspendidas individuales permitiendo que las células aglutinantes más pesadas se asentaran durante cortos períodos de tiempo sin agitación. Una vez que el cultivo consiste en aproximadamente el 95 % de la población de la suspensión de células individuales de forma consistente, el cultivo podría congelarse en medio de crioconservación consistente en DMSO al 10 % y 90 % de medio libre de suero usando condiciones estándar de congelación de células de mamífero.

Ejemplo 12: El vector hecho a partir de las líneas celulares productoras estables es más estable que el vector hecho mediante transfección transitoria en almacenamiento a largo plazo.

Producción del vector mediante transfección transitoria. El sobrenadante bruto que contenía el virus MLV competente para la replicación que codifica el gen para la citosina desaminasa o el gen para la proteína fluorescente verde se produjeron mediante dos métodos de transfección transitoria. El primer método usó el procedimiento estándar de transfección con fosfato cálcico divulgado por Graham y van der Eb usando células 293T que se han usado habitualmente para producir vectores de título alto, tal como describieron originalmente Yang 1999. El segundo método de transfección utilizó el reactivo transfectante patentado disponible comercialmente (Fugene) distribuido por Promega (Madison, WI) Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los sobrenadantes del virus se filtraron usando un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm, con partes alícuotas congeladas y almacenadas a temperaturas ≤ -65 °C. Los sobrenadantes clarificados congelados se titularon mediante el método de PCRc cuantitativa para establecer una concentración inicial de título infeccioso. Las pruebas posteriores del título en varias fechas revelaron que las preparaciones de virus no eran estables y perdían al menos un logaritmo del título tan rápidamente como 14 días como se analizó mediante el mismo método de PCRc cuantitativa (véase la Tabla 4).

Producción de vectores a partir de líneas estables. Para comparar este perfil de estabilidad con respecto al virus MLV competente para la replicación producido a partir de células HT-1080 infectadas de forma estable, se produjeron preparaciones del virus T5.0002 como se describe en el ejemplo anterior y posteriormente se purificaron y formularon en un tampón isotónico de cloruro de sodio Tris que contenía 10 mg /ml de sacarosa y 1 mg / ml de seroalbúmina humana. Los lotes de T5.0002 específicos utilizados en este estudio de estabilidad son los lotes T003-002-40L, M100-09, M101-09 y M102-09, con los últimos tres lotes producidos conforme a las buenas prácticas de fabricación (GMP). Para evaluar la estabilidad del virus, se usaron procedimientos para abordar (1) el título infeccioso; y (2) la transferencia de la expresión en células intactas.

Almacenamiento. Se retiraron dosis no diluidas y diluidas al 1/100 de T5.0002 del lote T003-002-40L de las condiciones de almacenamiento a largo plazo ≤-65 °C con viales descongelados posteriormente a los 3, 6 y 12 meses después del vial y probados dentro de los siguientes ensayos: Resistencia, potencia y DICT₅₀.

Tabla 4. Varios virus MLV competente para la replicación producidos mediante transfección transitoria

| Descripción del virus ML de replicación | Línea celular parental (método de transfección) | ID de la muestra | Título de PCRc (UT/ml) |
|---|---|---------------------------|------------------------|
| T5.0002 | 293T (Fosfato de calcio) | 051508-RCR-2 | $3,2 \times 10^7$ |
| T5.0002 | 293T (Fosfato de calcio) | 051508-RCR-2 | $1,4 \times 10^6$ |
| T5.0002 | 293T (Fosfato de calcio) | CS003 (2-D3-IN-080108-CS) | $1,3 \times 10^6$ |
| T5.0002 | 293T (Fosfato de calcio) | CS003 (2-D3-IN-080108-CS) | $2,4 \times 10^4$ |
| T5.0006 ⁽²⁾ | HT-1080 (Fugene) | HT1080-D4-102508 | $2,3 \times 10^6$ |
| T5.0006 | HT-1080 (Fugene) | HT1080-D4-102508 | $2,8 \times 10^5$ |
| T5.0006 | 293T (Fugene) | 293T-D2-102308 | $2,6 \times 10^6$ |
| T5.0006 | 293T (Fugene) | 293T-D2-102308 | $2,3 \times 10^5$ |

Se prepararon lotes producidos conforme a las GMP, M100-09, M101-09 y M102-09 a partir de la línea celular productora estable HT1080 + T5.0002 purificada y almacenada a $\leq -65^\circ \text{C}$ desde su preparación. Se extrajeron y descongelaron los viales a los 3 y 6 meses después del vial y se analizaron los siguientes ensayos: Resistencia, potencia, DICT50, pH, osmolalidad y aspecto.

Título infeccioso mediante PCRc cuantitativa. No se observa ninguna disminución del título para el vector viral purificado producido a partir de la línea celular HT-1080 infectada de forma estable cuando se almacena a $\leq -65^\circ \text{C}$ durante un máximo de 12 meses para todos los lotes analizados. Las Tablas 5 y 6 muestran los títulos medidos para los lotes T003-002-40L (Tabla 5) y GMP (Tabla 6). La Figura 14 muestra la tendencia del título generado durante 12 meses para todos los lotes analizados.

Tabla 5. Títulos medidos de los lotes de desarrollo T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) a la liberación y 3,6 y 12 meses almacenados a $\leq -65^\circ \text{C}$.

| T003-002-40L | Liberación | 3M | 6M | 12M |
|--------------|------------|-----------|----------|----------|
| | UT/ml | | | |
| Sin diluir | 1,14E+08 | 1,73 E+08 | 1,09E+08 | 2,71E+08 |
| 1/100 | 1,08E+06 | 2,79E+06 | 1,66E+06 | 3,82E+06 |

Tabla 6. Títulos medidos de los lotes M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) en la liberación y a los 3 y 6 meses de almacenamiento a $\leq -65^\circ \text{C}$.

| | Liberación | 3M | 6M | 1X F/T* |
|---------|------------|----------|----------|----------|
| | UT/ml | | | |
| M100-09 | 1,90E+08 | 1,00E+08 | 2,49E+08 | 2,38E+08 |
| M101-09 | 2,00E+07 | 1,08E+07 | 3,52E+07 | 3,56E+07 |
| M102-09 | 2,70E+06 | 1,22E+06 | 4,15E+06 | 4,01E+06 |

*Se descongelaron los viales en el punto de tiempo 3M, se volvieron a congelar a $< -65^\circ \text{C}$ y se analizaron con las muestras de 6 M.

Ensayo de transferencia de expresión biológica usando cultivo celular y análisis HPLC para evaluar la estabilidad del vector viral almacenado a $\leq -65^\circ \text{C}$. La estabilidad del vector se evaluó midiendo la capacidad del vector para infectar un tipo de célula intacta con varias diluciones y analizar la capacidad para convertir 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU) a partir de la transferencia del gen de la citosina desaminasa del vector viral a la célula intacta infectada. La conversión de 5-FC en 5-FU se cuantifica mediante HPLC con los datos brutos procesados utilizando un método de regresión no lineal de los valores de dilución transformados. Ambas dosis (sin diluir y muestras diluidas a 1/100) del lote T003-002-40L no muestran disminución en la transferencia de la capacidad de expresión cuando se almacenan a $\leq -65^\circ \text{C}$ durante hasta 12 meses. Tanto T003-002-40L (sin diluir) como M100-09 generaron una curva de dosis comparable a la del vector de referencia actual. M101-09 generó la curva esperada a 1/10 del vector no diluido (M100-09). T003-002-40L (1/100) y M102-09 generaron la curva esperada a 1/100 de su vector no diluido, respectivamente. Las Figuras 10 y 11 muestran la respuesta de la dosis de conversión de 5-FC para los lotes T003-002-40L (Figura 10) y GMP (Figura 11) en el último punto de tiempo analizado.

Ensayo de DICT₅₀ sobre los lotes del vector. La estabilidad del vector se evaluó midiendo la capacidad del vector para infectar un tipo de célula intacta calculando la dosis infecciosa a la que el 50 % de las células se infectarían en

condiciones de cultivo de tejidos (DICT50). El método utilizado para determinar si una célula estaba infectada se determinó mediante detección por PCR. En esta evaluación, no se observó disminución en la infectividad en base a la DICT50 cuando se almacenó a ≤ -65 °C durante un máximo de 12 meses para todos los lotes analizados dentro de la variabilidad actual del ensayo (% de CV del vector de referencia en 8 ensayos fue del 45 %). Las Tablas 13 y 14 muestran el valor de DICT50/ml medido para el lote T003-002-40L (Tabla 7) y GMP (Tabla 8).

Tabla 7. DICT₅₀ del lote T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) en la liberación y a los 3 y 12 meses a ≤ -65 °C

| T003-002-40L | Liberación | 3M | 12M |
|--------------|------------------------|---------|----------|
| | DICT ₅₀ /ml | | |
| Sin diluir | 2,0E+08 | 9,0E+07 | 2,00E+08 |
| 1/100 | 1,3E+06 | 6,5E+05 | 7,95E+05 |

Tabla 8. DICT₅₀ de los lotes de GMP M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) en la liberación y a los 3 y 6 meses de almacenamiento a ≤ -65 °C.

| | Liberación | 3M | 6M | 1X F/T* |
|---------|------------------------|---------|---------|----------|
| | DICT ₅₀ /ml | | | |
| M100-09 | 5,0E+07 | 5,0E+07 | 7,9E+07 | 5,01E+07 |
| M101-09 | 7,9E+06 | 1,3E+06 | 1,3E+07 | 1,26E+07 |
| M102-09 | 5,0E+05 | 5,0E+05 | 7,9E+05 | 5,01E+05 |

*Se descongelaron los viales en el punto de tiempo 3M, se volvieron a congelar a ≤ -65 °C y se analizaron con las muestras de 6 M.

Basándose en los datos de estabilidad anteriores, el vector viral de MLV competente para la replicación purificado producido a partir de células HT - 1080 infectadas de forma estable es más estable que el vector idéntico producido por transfección transitoria cuando se almacena a temperaturas de ≤ 65 °C.

Ejemplo 13: El vector T5.0002 hecho a partir de un clon de HT1080 y producido a partir de cultivos libres de suero en suspensión es tan potente como el vector fabricado a partir de la línea HT1080 + T5.0002 adherente en medio con suero bovino fetal, en un modelo de tumor de ratón. El vector se preparó a partir de uno de los clones de suspensión libre de suero y de la línea celular HT1080 + T5.0002, y se purificó y procesó como se describe en el ejemplo 6.

En experimentos separados, estas preparaciones de vectores se usaron para tratar un modelo de tumor de glioma de ratón - Tu2449 en ratones B6C3F1 (H M. Smilowitz J Neurosurg 106: 652 - 659, 2007), en ratones se implantó intracranalmente el tumor y cuatro días más tarde se administraron dosis ascendentes del vector (10^4 , 10^5 UT/g de cerebro) a cohortes de 10 animales para ambas preparaciones de vectores. Al día 13, la dosificación de 5-FC se llevó a cabo dos veces al día mediante inyecciones i.p. (500 mg / kg dos veces al día) durante cuatro días y el tratamiento con 5-FC se llevó a cabo con un programa de 10 días sin tratamiento 4 días con tratamiento. Los gráficos de Kaplan-Meier mostraron que la supervivencia con el material de la línea clonada era al menos tan buena como la de la línea HT1080 + T5.0002. Ambos mostraron una supervivencia de 80-90 en los grupos de 10^{5UT} después del día 100, mientras que los controles tuvieron una supervivencia mediana de aproximadamente 30 días.

Ejemplo 14: Uso de vector purificado que codifica interferón gamma de ratón como terapia en un modelo de cáncer de ratón singénico. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de Toca 511 (que codifica $\gamma CD2$) y Toca 621 (que codifica interferón gamma de ratón) en el modelo S91 / BALB/c mediante la evaluación de la propagación de nuevos vectores retrovirales basados en MLV en tumores S91 subcutáneos S91 de ratón (subQ) en ratones BALB / c inmunocompetentes. El vector se preparó a partir de: 1) HT108+T5.0002 (Toca 511) y es una preparación de un vector retroviral competente para la replicación portador del gen optimizado de la citosina desaminasa; 2) HT1080 + mIFN una línea de productores estable de Toca 621, un vector retroviral competente para la replicación portador del gen de interferón gamma; y 3) HT1080 + T5.0006 (GFP Vector) m, se administraron cada uno mediante inyección intratumoral (i.t.).

Ratones. Los ratones BALB / c hembra (edad ~ 8 semanas) se adquirieron en los Jackson Laboratories. Los ratones se aclimataron durante 7 días después de su llegada.

Células tumorales. Las células S91 Cloudman (ATCC, Manassas VA) derivadas del clon M-3, una línea celular productora de melanina se adaptaron al cultivo celular por Y. Yasumura, AH Tashjian y G. Sato de un melanoma Cloudman S91 en una F1 de ratón mecho (CX DBA). Las células se cultivaron en medio Eagles modificado de Dulbecco con suero bovino fetal al 10 %, piruvato sódico y Glutamax (Hyclone, Logan UT e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para su implantación. Las S91 se inyectaron $1E5$ en 200 μ l i.v. y $1E5$ en 100 μ l s.c.

Se implantaron s.c. en cuatro grupos de ratones BALB / c hembra (65 ratones, ~ 8 semanas de edad) en el flanco derecho células tumorales S91. Después de dejar que los tumores crecieran hasta alcanzar aproximadamente 50-125mm³, se administró a 3 ratones i.t. PBS (Grupo 1), a 10 ratones se inyectó i.t. Toca 511 4,7E8 / ml (Grupo 2), a 5 ratones se inyectó i.t. Toca 621 2,8E8 / ml (Grupo 3) y a 6 ratones se inyectó i.t. GFP (Grupo 4) de los días 15-19.

5

Asignaciones de grupos

| Grupo | Tratamiento | N |
|--------------------------|--------------|----|
| 1 | Control: PBS | 2 |
| 2 | Toca 511 | 10 |
| 3 | Toca 621 | 5 |
| 4 | Vector GFP | 6 |
| Número total de animales | | 23 |

Vector. Se inyectó Toca 511 y Toca 621 (50 µl) lentamente intratumoralmente usando una jeringa de insulina.

10 Se utilizó Toca 511 (que codifica el gen γ CD2 de la citosina desaminasa) de número de lote T511019-FNL para todos los animales del Grupo 2 y Toca 621 (que codifica interferón gamma de ratón) número de lote T621006 SEC se usó para todos los animales del Grupo 3. Este material se produjo usando el mismo proceso usado para el material de ensayo clínico, pero no se hizo de acuerdo con cGMP.

15 Toca 511 número de lote T511019-FNL tenía un título de 4,7E8 UT / ml.
Toca 621 número de lote T621006 SEC tiene un título de 2,8E8 UT / ml.
MLV-GFP (T5.0006) es el número de lote TGFP004-FNL con un título de 9,0E7 UT/ml.

20 Los tumores a los que se inyectó Toca 621 mostraron una disminución ($p = 0,0016$) en el crecimiento tumoral en comparación con los tumores inyectados con Toca 511 (Figura 15). En un animal de la inyección Toca 621 desapareció el tumor. Un análisis posterior mostró que los genomas podrían detectarse en algunos de los tumores Toca 511 y Toca 621 hasta 24 días después de la inyección. Uno de los dos explantes de los tumores inyectados con Toca 621 tenían una secreción detectable de IFNy (18,8pg / ml) mediante ELISA.

25 **Ejemplo 15. Velocidad de propagación viral de GFP en un modelo de xenoinjerto subcutáneo U-87 en ratones desnudos, usando el vector GFP de una línea productora estable.** Determinar la velocidad de propagación viral basándose en una única administración del vector $3e5 / 100 \mu l$ en xenoinjertos U-87 establecidos, determinando el porcentaje de las células que expresan GFP en diversos puntos temporales, en un modelo subcutáneo de un tumor en ratones desnudos.

30

Descripción del estudio. Un total de 5 ratones (ID n.º 71 a n.º 75) se sometieron a implante en el flanco dorsal derecho e izquierdo de $2e6$ células U-87 administradas s.c. el día 0. Al día 13 se inyectó el tumor dorsal derecho de cada ratón con T50006 purificado (vector GFP) 3×10^5 UT / $100 \mu l$ hechas a partir de un grupo productor de HT1080 construido como se ha descrito anteriormente, y purificado como se describe en el ejemplo YYY. El mismo día se sacrificó al animal de ID N.º 71; se sacrificó a los animales de ID n.º 72, ID n.º 73, ID n.º 74 e ID n.º 75 los días 5, 9, 12 y 26 después de la inoculación del vector, respectivamente. Se extirparon los tumores y se procesaron para análisis FACS de GFP. Los resultados se muestran en la figura 16 y muestran un aumento constante en el % de células positivas de GFP con el tiempo, lo que indica la propagación del vector en este modelo.

35

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tocagen Inc. Jolly, Douglas Ibanez, Carlos

45

<120> Células productoras para vectores retrovirales de replicación competente

<130> 00014-008WO1

<140> Aún desconocido

<141> 17-06-2010

50

<150> US 61/218.063

<151> 17-06-2009

<160> 30

55

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 609 336 T3

<210> 1
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(477)

10 <400> 1

```

atg gtg aca ggg gga atg gca agc aag tgg gat cag aag ggt atg gac      48
Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1                               5                               10

att gcc tat gag gag gcg gcc tta ggt tac aaa gag ggt ggt gtt cct      96
Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
                20                               25                               30

att gcc gga tgt ctt atc aat aac aaa gac gga agt gtt ctc ggt cgt      144
Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
                35                               40                               45

ggg cac aac atg aga ttt caa aag gga tcc gcc aca cta cat ggt gag      192
Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
                50                               55                               60

atc tcc act ttg gaa aac tgt ggg aga tta gag ggc aaa gtg tac aaa      240
Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
        65                               70                               75                               80

gat acc act ttg tat acg acg ctg tct cca tgc gac atg tgt aca ggt      288
Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
                85                               90                               95

gcc atc atc atg tat ggt att cca cgc tgt gtt gtc ggt gag aac gtt      336
Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val
                100                               105                               110

aat ttc aaa agt aag ggc gag aaa tat tta caa act aga ggt cac gag      384
Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
                115                               120                               125

gtt gtt gtt gtt gac gat gag agg tgt aaa aag atc atg aaa caa ttt      432
Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe

                130                               135                               140

atc gat gaa aga cct cag gat tgg ttt gaa gat att ggt gag tag      477
Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu
        145                               150                               155

```

15 <210> 2
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

20 <400> 2

ES 2 609 336 T3

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1 5 10 15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
 20 25 30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
 35 40 45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
 50 55 60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
 85 90 95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val
 100 105 110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
 115 120 125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe
 130 135 140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu
 145 150 155

- <210> 3
- <211> 477
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Citosina desaminasa modificada
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(477)
- 15 <400> 3

ES 2 609 336 T3

```

atg gtg aca ggg gga atg gca agc aag tgg gat cag aag ggt atg gac      48
Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1                               5                               10                               15

att gcc tat gag gag gcg tta tta ggt tac aaa gag ggt ggt gtt cct      96
Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
                               20                               25                               30

att ggc gga tgt ctt atc aat aac aaa gac gga agt gtt ctc ggt cgt      144
Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
                               35                               40                               45

ggt cac aac atg aga ttt caa aag gga tcc gcc aca cta cat ggt gag      192
Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
                               50                               55                               60

atc tcc act ttg gaa aac tgt ggg aga tta gag ggc aaa gtg tac aaa      240
Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
65                               70                               75                               80

gat acc act ttg tat acg acg ctg tct cca tgc gac atg tgt aca ggt      288
Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
                               85                               90                               95

gcc atc atc atg tat ggt att cca cgc tgt gtc atc ggt gag aac gtt      336
Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
                               100                              105                              110

aat ttc aaa agt aag ggc gag aaa tat tta caa act aga ggt cac gag      384
Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
                               115                              120                              125

gtt gtt gtt gtt gac gat gag agg tgt aaa aag tta atg aaa caa ttt      432
Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe
                               130                              135                              140

atc gat gaa aga cct cag gat tgg ttt gaa gat att ggt gag tag      477
Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu
145                              150                              155

```

<210> 4
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Construcción Sintética

10

<400> 4

```

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1                               5                               10                               15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
                               20                               25                               30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
                               35                               40                               45

```

ES 2 609 336 T3

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
 50 55 60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
 85 90 95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
 100 105 110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
 115 120 125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe
 130 135 140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu
 145 150 155

- <210> 5
- <211> 480
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Citosina desaminasa con codones optimizados para ser humano
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(480)
- 15 <400> 5

ES 2 609 336 T3

| | |
|---|-----|
| atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat | 48 |
| Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp | |
| 1 5 10 15 | |
| atc gct tac gag gag gcc gca ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct | 96 |
| Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro | |
| 20 25 30 | |
| atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg | 144 |
| Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg | |
| 35 40 45 | |
| ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag | 192 |
| Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu | |
| 50 55 60 | |
| atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag | 240 |
| Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc | 288 |
| Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly | |
| 85 90 95 | |
| gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg gtc ggc gag aac gtg | 336 |
| Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val | |
| 100 105 110 | |
| aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag | 384 |
| Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu | |
| 115 120 125 | |
| gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag atc atg aag cag ttc | 432 |
| Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe | |
| 130 135 140 | |
| atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag tga taa | 480 |
| Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu | |
| 145 150 155 | |

<210> 6
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Construcción Sintética

 <400> 6

5

10

ES 2 609 336 T3

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1 5 10 15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
 20 25 30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
 35 40 45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
 50 55 60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
 85 90 95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val
 100 105 110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
 115 120 125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe
 130 135 140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu
 145 150 155

<210> 7
 <211> 756
 5 <212> ADN
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(756)

<400> 7

ES 2 609 336 T3

| | |
|---|-----|
| atg aac cag tta ttc ttt ttg gct tct cca ttc ttg tac ctt aca tat | 48 |
| Met Asn Pro Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr Tyr | |
| 1 5 10 15 | |
| ctt ata tat tat cca aac aaa ggg tct ttc gtt agc aaa cct aga aat | 96 |
| Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg Asn | |
| 20 25 30 | |
| ctg caa aaa atg tct tcg gaa cca ttt aag aac gtc tac ttg cta cct | 144 |
| Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro | |
| 35 40 45 | |
| caa aca aac caa ttg ctg ggt ttg tac acc atc atc aga aat aag aat | 192 |
| Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn | |
| 50 55 60 | |
| aca act aga cct gat ttc att ttc tac tcc gat aga atc atc aga ttg | 240 |
| Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu | |
| 65 70 75 80 | |
| ttg gtt gaa gaa ggt ttg aac cat cta cct gtg caa aag caa att gtg | 288 |
| Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val | |
| 85 90 95 | |
| gaa act gac acc aac gaa aac ttc gaa ggt gtc tca ttc atg ggt aaa | 336 |
| Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys | |
| 100 105 110 | |
| atc tgt ggt gtt tcc att gtc aga gct ggt gaa tcg atg gag caa gga | 384 |
| Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly | |
| 115 120 125 | |
| tta aga gac tgt tgt agg tct gtg cgt atc ggt aaa att tta att caa | 432 |
| Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln | |
| 130 135 140 | |
| agg gac gag gag act gct tta cca aag tta ttc tac gaa aaa tta cca | 480 |
| Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro | |
| 145 150 155 160 | |
| gag gat ata tct gaa agg tat gtc ttc cta tta gac cca atg ctg gcc | 528 |
| Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala | |
| 165 170 175 | |
| acc ggt ggt agt gct atc atg gct aca gaa gtc ttg att aag aga ggt | 576 |
| Thr Gly Gly Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly | |
| 180 185 190 | |
| ggt aag cca gag aga att tac ttc tta aac cta atc tgt agt aag gaa | 624 |
| Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu | |
| 195 200 205 | |
| ggg att gaa aaa tac cat gcc gcc ttc cca gag gtc aga att gtt act | 672 |
| Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr | |
| 210 215 220 | |
| ggt gcc ctc gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca ggg | 720 |
| Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly | |
| 225 230 235 240 | |
| ttg ggt gac ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa | 756 |
| Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val | |
| 245 250 | |

<210> 8
<211> 251
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 8

ES 2 609 336 T3

Met Asn Pro Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr Tyr
1 5 10 15

Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg Asn
20 25 30

Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro
35 40 45

Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn
50 55 60

Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu
65 70 75 80

Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val
85 90 95

Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys
100 105 110

Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly
115 120 125

Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln
130 135 140

Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala
165 170 175

Thr Gly Gly Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly
180 185 190

Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu
195 200 205

Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr
210 215 220

Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly
225 230 235 240

Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val
245 250

<210>9
<211> 1443

ES 2 609 336 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1443)

<400> 9

| | |
|---|-----|
| atg gct gtt gct cgt gct gct ctt ggt cct ctt gtt act ggt ctt tat | 48 |
| Met Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr | |
| 1 5 10 15 | |
| gat gtt caa gct ttt aaa ttt ggt gat ttt gtt ctt aaa tct ggt ctt | 96 |
| Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu | |
| 20 25 30 | |
| tct tct cct att tat att gat ctt cgt ggt att gtt tct cgt cct cgt | 144 |
| Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg | |
| 35 40 45 | |
| ctt ctt tct caa gtt gct gat att ctt ttt caa act gct caa aat gct | 192 |
| Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn Ala | |
| 50 55 60 | |
| ggt att tct ttt gat act gtt tgt ggt gtt cct tat act gct ctt cct | 240 |
| Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu Pro | |
| 65 70 75 80 | |
| ctt gct act gtt att tgt tct act aat caa att cct atg ctt att cgt | 288 |
| Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg | |
| 85 90 95 | |
| cgt aaa gaa act aaa gat tat ggt act aaa cgt ctt gtt gaa ggt act | 336 |
| Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr | |
| 100 105 110 | |
| att aat cct ggt gaa act tgt ctt att att gaa gat gtt gtt act tct | 384 |
| Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser | |
| 115 120 125 | |
| ggt tct tct gtt ctt gaa act gtt gaa gtt ctt caa aaa gaa ggt ctt | 432 |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|------|
| Gly | Ser | Ser | Val | Leu | Glu | Thr | Val | Glu | Val | Leu | Gln | Lys | Glu | Gly | Leu | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | |
| aaa | gtt | act | gat | gct | att | gtt | ctt | ctt | gat | cgt | gaa | caa | ggg | ggg | aaa | | | | 480 |
| Lys | Val | Thr | Asp | Ala | Ile | Val | Leu | Leu | Asp | Arg | Glu | Gln | Gly | Gly | Lys | | | | 145 |
| | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| gat | aaa | ctt | caa | gct | cat | ggg | att | cgt | ctt | cat | tct | ggt | tgt | act | ctt | | | | 528 |
| Asp | Lys | Leu | Gln | Ala | His | Gly | Ile | Arg | Leu | His | Ser | Val | Cys | Thr | Leu | | | | 165 |
| | | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | | | |
| tct | aaa | atg | ctt | gaa | att | ctt | gaa | caa | caa | aaa | aaa | ggt | gat | gct | gaa | | | | 576 |
| Ser | Lys | Met | Leu | Glu | Ile | Leu | Glu | Gln | Gln | Lys | Lys | Val | Asp | Ala | Glu | | | | 180 |
| | | | | | 180 | | | | 185 | | | | | | 190 | | | | |
| act | ggt | ggg | cgt | ggt | aaa | cgt | ttt | att | caa | gaa | aat | ggt | ttt | ggt | gct | | | | 624 |
| Thr | Val | Gly | Arg | Val | Lys | Arg | Phe | Ile | Gln | Glu | Asn | Val | Phe | Val | Ala | | | | 195 |
| | | | | | 200 | | | | | | | | | | 205 | | | | |
| gct | aat | cat | aat | ggg | tct | cct | ctt | tct | att | aaa | gaa | gct | cct | aaa | gaa | | | | 672 |
| Ala | Asn | His | Asn | Gly | Ser | Pro | Leu | Ser | Ile | Lys | Glu | Ala | Pro | Lys | Glu | | | | 210 |
| | | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | | | | |
| ctt | tct | ttt | ggg | gct | cgt | gct | gaa | ctt | cct | cgt | att | cat | cct | ggt | gct | | | | 720 |
| Leu | Ser | Phe | Gly | Ala | Arg | Ala | Glu | Leu | Pro | Arg | Ile | His | Pro | Val | Ala | | | | 225 |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | |
| tct | aaa | ctt | ctt | cgt | ctt | atg | caa | aaa | aaa | gaa | act | aat | ctt | tgt | ctt | | | | 768 |
| Ser | Lys | Leu | Leu | Arg | Leu | Met | Gln | Lys | Lys | Glu | Thr | Asn | Leu | Cys | Leu | | | | 245 |
| | | | | | | 245 | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| tct | gct | gat | ggt | tct | ctt | gct | cgt | gaa | ctt | ctt | caa | ctt | gct | gat | gct | | | | 816 |
| Ser | Ala | Asp | Val | Ser | Leu | Ala | Arg | Glu | Leu | Leu | Gln | Leu | Ala | Asp | Ala | | | | 260 |
| | | | | | | | | 265 | | | | | | | 270 | | | | |
| ctt | ggg | cct | tct | att | tgt | atg | ctt | aaa | act | cat | ggt | gat | att | ctt | aat | | | | 864 |
| Leu | Gly | Pro | Ser | Ile | Cys | Met | Leu | Lys | Thr | His | Val | Asp | Ile | Leu | Asn | | | | 275 |
| | | | | | | | | 280 | | | | | | | 285 | | | | |
| gat | ttt | act | ctt | gat | ggt | atg | aaa | gaa | ctt | att | act | ctt | gct | aaa | tgt | | | | 912 |
| Asp | Phe | Thr | Leu | Asp | Val | Met | Lys | Glu | Leu | Ile | Thr | Leu | Ala | Lys | Cys | | | | 290 |
| | | | | | | 295 | | | | | | | | | 300 | | | | |
| cat | gaa | ttt | ctt | att | ttt | gaa | gat | cgt | aaa | ttt | gct | gat | att | ggg | aat | | | | 960 |
| His | Glu | Phe | Leu | Ile | Phe | Glu | Asp | Arg | Lys | Phe | Ala | Asp | Ile | Gly | Asn | | | | 305 |
| | | | | | | 310 | | | | | | | | | 320 | | | | |
| act | ggt | aaa | aaa | caa | tat | gaa | ggg | ggg | att | ttt | aaa | att | gct | tct | tgg | | | | 1008 |
| Thr | Val | Lys | Lys | Gln | Tyr | Glu | Gly | Gly | Ile | Phe | Lys | Ile | Ala | Ser | Trp | | | | 325 |
| | | | | | | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | |
| gct | gat | ctt | ggt | aat | gct | cat | ggt | ggt | att | ttt | aaa | att | gct | tct | tgg | | | | 1056 |
| Ala | Asp | Leu | Val | Asn | Ala | His | Val | Val | Pro | Gly | Ser | Gly | Val | Val | Lys | | | | 340 |
| | | | | | | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| ggg | ctt | caa | gaa | ggt | ggg | ctt | cct | ctt | cat | cgt | ggg | tgt | ctt | ctt | att | | | | 1104 |
| Gly | Leu | Gln | Glu | Val | Gly | Leu | Pro | Leu | His | Arg | Gly | Cys | Leu | Leu | Ile | | | | 355 |
| | | | | | | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| gct | gaa | atg | tct | tct | act | ggg | tct | ctt | gct | act | ggg | gat | tat | act | cgt | | | | 1152 |
| Ala | Glu | Met | Ser | Ser | Thr | Gly | Ser | Leu | Ala | Thr | Gly | Asp | Tyr | Thr | Arg | | | | 370 |
| | | | | | | 375 | | | | | | | | | 380 | | | | |
| gct | gct | ggt | cgt | atg | gct | gaa | gaa | cat | tct | gaa | ttt | ggt | ggt | ggg | ttt | | | | 1200 |
| Ala | Ala | Val | Arg | Met | Ala | Glu | Glu | His | Ser | Glu | Phe | Val | Val | Gly | Phe | | | | |

ES 2 609 336 T3

```

385              390              395              400
att tct ggt tct cgt gtt tct atg aaa cct gaa ttt ctt cat ctt act      1248
Ile Ser Gly Ser Arg Val Ser Met Lys Pro Glu Phe Leu His Leu Thr
              405              410              415

cct ggt gtt caa ctt gaa gct ggt ggt gat aat ctt ggt caa caa tat      1296
Pro Gly Val Gln Leu Glu Ala Gly Gly Asp Asn Leu Gly Gln Gln Tyr
              420              425              430

aat tct cct caa gaa gtt att ggt aaa cgt ggt tct gat att att att      1344
Asn Ser Pro Gln Glu Val Ile Gly Lys Arg Gly Ser Asp Ile Ile Ile
              435              440              445

ggt ggt cgt ggt att att tct gct gct gat cgt ctt gaa gct gct gaa      1392
Val Gly Arg Gly Ile Ile Ser Ala Ala Asp Arg Leu Glu Ala Ala Glu
              450              455              460

atg tat cgt aaa gct gct tgg gaa gct tat ctt tct cgt ctt ggt gtt      1440
Met Tyr Arg Lys Ala Ala Trp Glu Ala Tyr Leu Ser Arg Leu Gly Val
465              470              475              480

taa                                                                    1443

```

<210> 10
 <211> 480
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 10

```

Met Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr
1              5              10              15

Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu
              20              25              30

Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg
              35              40              45

Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn Ala
50              55              60

Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu Pro
65              70              75              80

Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg
85              90              95

Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr
100             105             110

Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser
115             120             125

Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly Leu

```


ES 2 609 336 T3

| 130 | 135 | 140 | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| Lys 145 | Val | Thr | Asp | Ala | Ile | Val | Leu | Leu | Asp | Arg | Glu | Gln | Gly | Gly | Lys 160 |
| Asp | Lys | Leu | Gln | Ala | His | Gly | Ile | Arg | Leu | His | Ser | Val | Cys | Thr | Leu 175 |
| Ser | Lys | Met | Leu | Glu | Ile | Leu | Glu | Gln | Gln | Lys | Lys | Val | Asp | Ala | Glu 190 |
| Thr | Val | Gly | Arg | Val | Lys | Arg | Phe | Ile | Gln | Glu | Asn | Val | Phe | Val | Ala 205 |
| Ala | Asn | His | Asn | Gly | Ser | Pro | Leu | Ser | Ile | Lys | Glu | Ala | Pro | Lys | Glu 220 |
| Leu | Ser | Phe | Gly | Ala | Arg | Ala | Glu | Leu | Pro | Arg | Ile | His | Pro | Val | Ala 240 |
| Ser | Lys | Leu | Leu | Arg | Leu | Met | Gln | Lys | Lys | Glu | Thr | Asn | Leu | Cys | Leu 255 |
| Ser | Ala | Asp | Val | Ser | Leu | Ala | Arg | Glu | Leu | Leu | Gln | Leu | Ala | Asp | Ala 270 |
| Leu | Gly | Pro | Ser | Ile | Cys | Met | Leu | Lys | Thr | His | Val | Asp | Ile | Leu | Asn 285 |
| Asp | Phe | Thr | Leu | Asp | Val | Met | Lys | Glu | Leu | Ile | Thr | Leu | Ala | Lys | Cys 300 |
| His | Glu | Phe | Leu | Ile | Phe | Glu | Asp | Arg | Lys | Phe | Ala | Asp | Ile | Gly | Asn 320 |
| Thr | Val | Lys | Lys | Gln | Tyr | Glu | Gly | Gly | Ile | Phe | Lys | Ile | Ala | Ser | Trp 335 |
| Ala | Asp | Leu | Val | Asn | Ala | His | Val | Val | Pro | Gly | Ser | Gly | Val | Val | Lys 350 |
| Gly | Leu | Gln | Glu | Val | Gly | Leu | Pro | Leu | His | Arg | Gly | Cys | Leu | Leu | Ile 365 |
| Ala | Glu | Met | Ser | Ser | Thr | Gly | Ser | Leu | Ala | Thr | Gly | Asp | Tyr | Thr | Arg 380 |
| Ala | Ala | Val | Arg | Met | Ala | Glu | Glu | His | Ser | Glu | Phe | Val | Val | Gly | Phe 400 |

ES 2 609 336 T3

Ile Ser Gly Ser Arg Val Ser Met Lys Pro Glu Phe Leu His Leu Thr
 405 410 415

Pro Gly Val Gln Leu Glu Ala Gly Gly Asp Asn Leu Gly Gln Gln Tyr
 420 425 430

Asn Ser Pro Gln Glu Val Ile Gly Lys Arg Gly Ser Asp Ile Ile Ile
 435 440 445

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

Met Tyr Arg Lys Ala Ala Trp Glu Ala Tyr Leu Ser Arg Leu Gly Val
 465 470 475 480

<210> 11

<211> 1227

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de fusión CDopt-UPRT

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1227)

<400> 11

atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat 48
 Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1 5 10 15

atc gct tac gag gag gcc ctg ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct 96
 Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
 20 25 30

atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg 144
 Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
 35 40 45

ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag 192
 Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
 50 55 60

atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag 240
 Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
 65 70 75 80

gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc 288
 Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
 85 90 95

gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg 336
 Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
 100 105 110

aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag 384

5

10

15

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Asn | Phe | Lys | Ser | Lys | Gly | Glu | Lys | Tyr | Leu | Gln | Thr | Arg | Gly | His | Glu | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| gtg | gtg | ggt | ggt | gac | gat | gag | agg | tgt | aag | aag | ctg | atg | aag | cag | ttc | | 432 |
| Val | Val | Val | Val | Asp | Asp | Glu | Arg | Cys | Lys | Lys | Leu | Met | Lys | Gln | Phe | | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | |
| atc | gac | gag | agg | cct | cag | gac | tgg | ttc | gag | gat | atc | ggc | gag | aac | ccg | | 480 |
| Ile | Asp | Glu | Arg | Pro | Gln | Asp | Trp | Phe | Glu | Asp | Ile | Gly | Glu | Asn | Pro | | |
| | | 145 | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| tta | ttc | ttt | ttg | gct | tct | cca | ttc | ttg | tac | ctt | aca | tat | ctt | ata | tat | | 528 |
| Leu | Phe | Phe | Leu | Ala | Ser | Pro | Phe | Leu | Tyr | Leu | Thr | Tyr | Leu | Ile | Tyr | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| tat | cca | aac | aaa | ggg | tct | ttc | ggt | agc | aaa | cct | aga | aat | ctg | caa | aaa | | 576 |
| Tyr | Pro | Asn | Lys | Gly | Ser | Phe | Val | Ser | Lys | Pro | Arg | Asn | Leu | Gln | Lys | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| atg | tct | tcg | gaa | cca | ttt | aag | aac | gtc | tac | ttg | cta | cct | caa | aca | aac | | 624 |
| Met | Ser | Ser | Glu | Pro | Phe | Lys | Asn | Val | Tyr | Leu | Leu | Pro | Gln | Thr | Asn | | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | |
| caa | ttg | ctg | ggt | ttg | tac | acc | atc | atc | aga | aat | aag | aat | aca | act | aga | | 672 |
| Gln | Leu | Leu | Gly | Leu | Tyr | Thr | Ile | Ile | Arg | Asn | Lys | Asn | Thr | Thr | Arg | | |
| | | | 210 | | | 215 | | | | | | 220 | | | | | |
| cct | gat | ttc | att | ttc | tac | tcc | gat | aga | atc | atc | aga | ttg | ttg | ggt | gaa | | 720 |
| Pro | Asp | Phe | Ile | Phe | Tyr | Ser | Asp | Arg | Ile | Ile | Arg | Leu | Leu | Val | Glu | | |
| | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | 240 | | |
| gaa | ggt | ttg | aac | cat | cta | cct | gtg | caa | aag | caa | att | gtg | gaa | act | gac | | 768 |
| Glu | Gly | Leu | Asn | His | Leu | Pro | Val | Gln | Lys | Gln | Ile | Val | Glu | Thr | Asp | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| acc | aac | gaa | aac | ttc | gaa | ggt | gtc | tca | ttc | atg | ggt | aaa | atc | tgt | ggt | | 816 |
| Thr | Asn | Glu | Asn | Phe | Glu | Gly | Val | Ser | Phe | Met | Gly | Lys | Ile | Cys | Gly | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | | | |
| ggt | tcc | att | gtc | aga | gct | ggt | gaa | tcg | atg | gag | caa | gga | tta | aga | gac | | 864 |
| Val | Ser | Ile | Val | Arg | Ala | Gly | Glu | Ser | Met | Glu | Gln | Gly | Leu | Arg | Asp | | |
| | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| tgt | tgt | agg | tct | gtg | cgt | atc | ggt | aaa | att | tta | att | caa | agg | gac | gag | | 912 |
| Cys | Cys | Arg | Ser | Val | Arg | Ile | Gly | Lys | Ile | Leu | Ile | Gln | Arg | Asp | Glu | | |
| | | 290 | | | | 295 | | | | | | 300 | | | | | |
| gag | act | gct | tta | cca | aag | tta | ttc | tac | gaa | aaa | tta | cca | gag | gat | ata | | 960 |
| Glu | Thr | Ala | Leu | Pro | Lys | Leu | Phe | Tyr | Glu | Lys | Leu | Pro | Glu | Asp | Ile | | |
| | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| tct | gaa | agg | tat | gtc | ttc | cta | tta | gac | cca | atg | ctg | gcc | acc | ggt | ggt | | 1008 |
| Ser | Glu | Arg | Tyr | Val | Phe | Leu | Leu | Asp | Pro | Met | Leu | Ala | Thr | Gly | Gly | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| agt | gct | atc | atg | gct | aca | gaa | gtc | ttg | att | aag | aga | ggt | ggt | aag | cca | | 1056 |
| Ser | Ala | Ile | Met | Ala | Thr | Glu | Val | Leu | Ile | Lys | Arg | Gly | Val | Lys | Pro | | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| gag | aga | att | tac | ttc | tta | aac | cta | atc | tgt | agt | aag | gaa | ggg | att | gaa | | 1104 |
| Glu | Arg | Ile | Tyr | Phe | Leu | Asn | Leu | Ile | Cys | Ser | Lys | Glu | Gly | Ile | Glu | | |
| | | | 355 | | | | 360 | | | | | | 365 | | | | |
| aaa | tac | cat | gcc | gcc | ttc | cca | gag | gtc | aga | att | ggt | act | ggt | gcc | ctc | | 1152 |
| Lys | Tyr | His | Ala | Ala | Phe | Pro | Glu | Val | Arg | Ile | Val | Thr | Gly | Ala | Leu | | |

ES 2 609 336 T3

```

370          375          380
gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca ggg ttg ggt gac      1200
Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly Leu Gly Asp
385          390          395          400

ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa      1227
Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val
          405

```

<210> 12
 <211> 408
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Construcción Sintética

 <400> 12

```

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1          5          10          15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
20          25          30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
35          40          45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
50          55          60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
65          70          75          80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
85          90          95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
100         105         110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
115        120        125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe
130        135        140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Asn Pro
145        150        155        160

Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr Tyr Leu Ile Tyr
165        170        175

```

ES 2 609 336 T3

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

<210> 13
 <211> 1287
 <212> ADN

ES 2 609 336 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción de fusión - CDopt - enlazador - UPRT

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1287)

10

<400> 13

| | |
|---|-----|
| atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat | 48 |
| Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp | |
| 1 5 10 15 | |
| atc gct tac gag gag gcc ctg ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct | 96 |
| Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro | |
| 20 25 30 | |
| atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg | 144 |
| Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg | |
| 35 40 45 | |
| ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag | 192 |
| Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu | |
| 50 55 60 | |
| atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag | 240 |
| Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc | 288 |
| Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly | |
| 85 90 95 | |
| gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg | 336 |
| Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val | |
| 100 105 110 | |
| aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag | 384 |
| Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu | |
| 115 120 125 | |
| gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag ctg atg aag cag ttc | 432 |
| Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe | |
| 130 135 140 | |
| atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag tcc ggc | 480 |
| Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ser Gly | |
| 145 150 155 160 | |
| ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc | 528 |
| Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly | |
| 165 170 175 | |
| ggc gcc aac ccg tta ttc ttt ttg gct tct cca ttc ttg tac ctt aca | 576 |
| Gly Ala Asn Pro Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr | |
| 180 185 190 | |
| tat ctt ata tat tat cca aac aaa ggg tct ttc gtt agc aaa cct aga | 624 |
| Tyr Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg | |
| 195 200 205 | |
| aat ctg caa aaa atg tct tcg gaa cca ttt aag aac gtc tac ttg cta | 672 |
| Asn Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu | |
| 210 215 220 | |

ES 2 609 336 T3

cct caa aca aac caa ttg ctg ggt ttg tac acc atc atc aga aat aag 720
 Pro Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys
 225 230 235 240

aat aca act aga cct gat ttc att ttc tac tcc gat aga atc atc aga 768
 Asn Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg
 245 250 255

ttg ttg gtt gaa gaa ggt ttg aac cat cta cct gtg caa aag caa att 816
 Leu Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile
 260 265 270

gtg gaa act gac acc aac gaa aac ttc gaa ggt gtc tca ttc atg ggt 864
 Val Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly
 275 280 285

aaa atc tgt ggt gtt tcc att gtc aga gct ggt gaa tcg atg gag caa 912
 Lys Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln
 290 295 300

gga tta aga gac tgt tgt agg tct gtg cgt atc ggt aaa att tta att 960
 Gly Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile
 305 310 315 320

caa agg gac gag gag act gct tta cca aag tta ttc tac gaa aaa tta 1008
 Gln Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu
 325 330 335

cca gag gat ata tct gaa agg tat gtc ttc cta tta gac cca atg ctg 1056
 Pro Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu
 340 345 350

gcc acc ggt ggt agt gct atc atg gct aca gaa gtc ttg att aag aga 1104
 Ala Thr Gly Gly Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg
 355 360 365

ggt gtt aag cca gag aga att tac ttc tta aac cta atc tgt agt aag 1152
 Gly Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys
 370 375 380

gaa ggg att gaa aaa tac cat gcc gcc ttc cca gag gtc aga att gtt 1200
 Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val
 385 390 395 400

act ggt gcc ctc gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca 1248
 Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro
 405 410 415

ggg ttg ggt gac ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa 1287
 Gly Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val
 420 425

<210> 14
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 14

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1 5 10 15

ES 2 609 336 T3

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
20 25 30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
35 40 45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
50 55 60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
85 90 95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
100 105 110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
115 120 125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe
130 135 140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly
165 170 175

Gly Ala Asn Pro Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr
180 185 190

Tyr Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg
195 200 205

Asn Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu
210 215 220

Pro Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys
225 230 235 240

Asn Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg
245 250 255

Leu Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile
260 265 270

ES 2 609 336 T3

Val Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly
 275 280 285

Lys Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln
 290 295 300

Gly Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile
 305 310 315 320

Gln Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu
 325 330 335

Pro Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu
 340 345 350

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

Gly Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys
 370 375 380

Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val
 385 390 395 400

Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro
 405 410 415

Gly Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val
 420 425

- <210> 15
- <211> 1200
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Construcción de fusión - CDopt3 - OPRT
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1200)
- 15 <400> 15

atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat 48
 Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1 5 10 15

atc gct tac gag gag gcc ctg ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct 96
 Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
 20 25 30

atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg 144
 Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg

ES 2 609 336 T3

| 35 | 40 | 45 | |
|---|----|----|-----|
| ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu 50 55 60 | | | 192 |
| atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys 65 70 75 80 | | | 240 |
| gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly 85 90 95 | | | 288 |
| gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val 100 105 110 | | | 336 |
| aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu 115 120 125 | | | 384 |
| gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag ctg atg aag cag ttc Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe 130 135 140 | | | 432 |
| atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag gcg gtc Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ala Val 145 150 155 160 | | | 480 |
| gct cgt gca gct ttg ggg cca ttg gtg acg ggt ctg tac gac gtg cag Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr Asp Val Gln 165 170 175 | | | 528 |
| gct ttc aag ttt ggg gac ttc gtg ctg aag agc ggg ctt tcc tcc ccc Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu Ser Ser Pro 180 185 190 | | | 576 |
| atc tac atc gat ctg cgg ggc atc gtg tct cga ccg cgt ctt ctg agt Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg Leu Leu Ser 195 200 205 | | | 624 |
| cag gtt gca gat att tta ttc caa act gcc caa aat gca ggc atc agt Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn Ala Gly Ile Ser 210 215 220 | | | 672 |
| ttt gac acc gtg tgt gga gtg cct tat aca gct ttg cca ttg gct aca Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Ala Thr 225 230 235 240 | | | 720 |
| gtt atc tgt tca acc aat caa att cca atg ctt att aga agg aaa gaa Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg Arg Lys Glu 245 250 255 | | | 768 |
| aca aag gat tat gga act aag cgt ctt gta gaa gga act att aat cca Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr Ile Asn Pro 260 265 270 | | | 816 |
| gga gaa acc tgt tta atc att gaa gat gtt gtc acc agt gga tct agt Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser Gly Ser Ser 275 280 285 | | | 864 |
| gtt ttg gaa act gtt gag gtt ctt cag aag gag ggc ttg aag gtc act Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly Leu Lys Val Thr 290 295 300 | | | 912 |

ES 2 609 336 T3

```

gat gcc ata gtg ctg ttg gac aga gag cag gga ggc aag gac aag ttg      960
Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly Lys Asp Lys Leu
305                      310                      315                      320

cag gcg cac ggg atc cgc ctc cac tca gtg tgt aca ttg tcc aaa atg      1008
Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Met
                      325                      330                      335

ctg gag att ctc gag cag cag aaa aaa gtt gat gct gag aca gtt ggg      1056
Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala Glu Thr Val Gly
                      340                      345                      350

aga gtg aag agg ttt att cag gag aat gtc ttt gtg gca gcg aat cat      1104
Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val Ala Ala Asn His
                      355                      360                      365

aat ggt tct ccc ctt tct ata aag gaa gca ccc aaa gaa ctc agc ttc      1152
Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile Lys Glu Ala Pro Lys Glu Leu Ser Phe
370                      375                      380

ggg gca cgt gca gag ctg ccc agg atc cac cca gtt gca tcg aag taa      1200
Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro Val Ala Ser Lys
385                      390                      395

```

<210> 16
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

<400> 16

```

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
1                      5                      10                      15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
                20                      25                      30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
    35                      40                      45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
    50                      55                      60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
65                      70                      75                      80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
                85                      90                      95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
                100                      105                      110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu

```

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | 115 | | 120 | | 125 | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Val | Val | Val | Asp | Asp | Glu | Arg | Cys | Lys | Lys | Leu | Met | Lys | Gln | Phe | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | |
| Ile | Asp | Glu | Arg | Pro | Gln | Asp | Trp | Phe | Glu | Asp | Ile | Gly | Glu | Ala | Val | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | |
| Ala | Arg | Ala | Ala | Leu | Gly | Pro | Leu | Val | Thr | Gly | Leu | Tyr | Asp | Val | Gln | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| Ala | Phe | Lys | Phe | Gly | Asp | Phe | Val | Leu | Lys | Ser | Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| Ile | Tyr | Ile | Asp | Leu | Arg | Gly | Ile | Val | Ser | Arg | Pro | Arg | Leu | Leu | Ser | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | |
| Gln | Val | Ala | Asp | Ile | Leu | Phe | Gln | Thr | Ala | Gln | Asn | Ala | Gly | Ile | Ser | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | |
| Phe | Asp | Thr | Val | Cys | Gly | Val | Pro | Tyr | Thr | Ala | Leu | Pro | Leu | Ala | Thr | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | |
| Val | Ile | Cys | Ser | Thr | Asn | Gln | Ile | Pro | Met | Leu | Ile | Arg | Arg | Lys | Glu | | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| Thr | Lys | Asp | Tyr | Gly | Thr | Lys | Arg | Leu | Val | Glu | Gly | Thr | Ile | Asn | Pro | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | | |
| Gly | Glu | Thr | Cys | Leu | Ile | Ile | Glu | Asp | Val | Val | Thr | Ser | Gly | Ser | Ser | | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | | |
| Val | Leu | Glu | Thr | Val | Glu | Val | Leu | Gln | Lys | Glu | Gly | Leu | Lys | Val | Thr | | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | | |
| Asp | Ala | Ile | Val | Leu | Leu | Asp | Arg | Glu | Gln | Gly | Gly | Lys | Asp | Lys | Leu | | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | | |
| Gln | Ala | His | Gly | Ile | Arg | Leu | His | Ser | Val | Cys | Thr | Leu | Ser | Lys | Met | | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | | |
| Leu | Glu | Ile | Leu | Glu | Gln | Gln | Lys | Lys | Val | Asp | Ala | Glu | Thr | Val | Gly | | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | |
| Arg | Val | Lys | Arg | Phe | Ile | Gln | Glu | Asn | Val | Phe | Val | Ala | Ala | Asn | His | | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | | |
| Asn | Gly | Ser | Pro | Leu | Ser | Ile | Lys | Glu | Ala | Pro | Lys | Glu | Leu | Ser | Phe | | | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | | |

ES 2 609 336 T3

Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro Val Ala Ser Lys
 385 390 395

5 <210> 17
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Construcción de fusión - CDopt3 - enlazador - OPRT

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1260)

15 <400> 17

| | |
|---|-----|
| atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat | 48 |
| Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp | |
| 1 5 10 15 | |
| atc gct tac gag gag gcc ctg ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct | 96 |
| Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro | |
| 20 25 30 | |
| atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg | 144 |
| Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg | |
| 35 40 45 | |
| ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag | 192 |
| Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu | |
| 50 55 60 | |
| atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag | 240 |
| Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys | |
| 65 70 75 80 | |
| gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc | 288 |
| Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly | |
| 85 90 95 | |
| gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg | 336 |
| Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val | |
| 100 105 110 | |
| aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag | 384 |
| Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu | |
| 115 120 125 | |
| gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag ctg atg aag cag ttc | 432 |
| Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe | |
| 130 135 140 | |
| atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag tcc ggc | 480 |
| Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ser Gly | |
| 145 150 155 160 | |
| ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc | 528 |
| Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly | |
| 165 170 175 | |
| ggc gcc gcg gtc gct cgt gca gct ttg ggg cca ttg gtg acg ggt ctg | 576 |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Gly | Ala | Ala | Val | Ala | Arg | Ala | Ala | Leu | Gly | Pro | Leu | Val | Thr | Gly | Leu | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| tac | gac | gtg | cag | gct | ttc | aag | ttt | ggg | gac | ttc | gtg | ctg | aag | agc | ggg | | 624 |
| Tyr | Asp | Val | Gln | Ala | Phe | Lys | Phe | Gly | Asp | Phe | Val | Leu | Lys | Ser | Gly | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| ctt | tcc | tcc | ccc | atc | tac | atc | gat | ctg | cgg | ggc | atc | gtg | tct | cga | ccg | | 672 |
| Leu | Ser | Ser | Pro | Ile | Tyr | Ile | Asp | Leu | Arg | Gly | Ile | Val | Ser | Arg | Pro | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| cgt | ctt | ctg | agt | cag | ggt | gca | gat | att | tta | ttc | caa | act | gcc | caa | aat | | 720 |
| Arg | Leu | Leu | Ser | Gln | Val | Ala | Asp | Ile | Leu | Phe | Gln | Thr | Ala | Gln | Asn | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| gca | ggc | atc | agt | ttt | gac | acc | gtg | tgt | gga | gtg | cct | tat | aca | gct | ttg | | 768 |
| Ala | Gly | Ile | Ser | Phe | Asp | Thr | Val | Cys | Gly | Val | Pro | Tyr | Thr | Ala | Leu | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| cca | ttg | gct | aca | ggt | atc | tgt | tca | acc | aat | caa | att | cca | atg | ctt | att | | 816 |
| Pro | Leu | Ala | Thr | Val | Ile | Cys | Ser | Thr | Asn | Gln | Ile | Pro | Met | Leu | Ile | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| aga | agg | aaa | gaa | aca | aag | gat | tat | gga | act | aag | cgt | ctt | gta | gaa | gga | | 864 |
| Arg | Arg | Lys | Glu | Thr | Lys | Asp | Tyr | Gly | Thr | Lys | Arg | Leu | Val | Glu | Gly | | |
| | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | | | | | |
| act | att | aat | cca | gga | gaa | acc | tgt | tta | atc | att | gaa | gat | ggt | gtc | acc | | 912 |
| Thr | Ile | Asn | Pro | Gly | Glu | Thr | Cys | Leu | Ile | Ile | Glu | Asp | Val | Val | Thr | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| agt | gga | tct | agt | ggt | ttg | gaa | act | ggt | gag | ggt | ctt | cag | aag | gag | ggc | | 960 |
| Ser | Gly | Ser | Ser | Val | Leu | Glu | Thr | Val | Glu | Val | Leu | Gln | Lys | Glu | Gly | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| ttg | aag | gtc | act | gat | gcc | ata | gtg | ctg | ttg | gac | aga | gag | cag | gga | ggc | | 1008 |
| Leu | Lys | Val | Thr | Asp | Ala | Ile | Val | Leu | Leu | Asp | Arg | Glu | Gln | Gly | Gly | | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| aag | gac | aag | ttg | cag | gcg | cac | ggg | atc | cgc | ctc | cac | tca | gtg | tgt | aca | | 1056 |
| Lys | Asp | Lys | Leu | Gln | Ala | His | Gly | Ile | Arg | Leu | His | Ser | Val | Cys | Thr | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| ttg | tcc | aaa | atg | ctg | gag | att | ctc | gag | cag | cag | aaa | aaa | ggt | gat | gct | | 1104 |
| Leu | Ser | Lys | Met | Leu | Glu | Ile | Leu | Glu | Gln | Gln | Lys | Lys | Val | Asp | Ala | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| gag | aca | ggt | ggg | aga | gtg | aag | agg | ttt | att | cag | gag | aat | gtc | ttt | gtg | | 1152 |
| Glu | Thr | Val | Gly | Arg | Val | Lys | Arg | Phe | Ile | Gln | Glu | Asn | Val | Phe | Val | | |
| | | 370 | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| gca | gcg | aat | cat | aat | ggt | tct | ccc | ctt | tct | ata | aag | gaa | gca | ccc | aaa | | 1200 |
| Ala | Ala | Asn | His | Asn | Gly | Ser | Pro | Leu | Ser | Ile | Lys | Glu | Ala | Pro | Lys | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | |
| gaa | ctc | agc | ttc | ggt | gca | cgt | gca | gag | ctg | ccc | agg | atc | cac | cca | gtt | | 1248 |
| Glu | Leu | Ser | Phe | Gly | Ala | Arg | Ala | Glu | Leu | Pro | Arg | Ile | His | Pro | Val | | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| gca | tcg | aag | taa | | | | | | | | | | | | | | 1260 |
| Ala | Ser | Lys | | | | | | | | | | | | | | | |

<210> 18
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

ES 2 609 336 T3

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 18

5

```

Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp
 1          5          10          15

Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro
          20          25          30

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg
          35          40          45

Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu
 50          55          60

Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys
 65          70          75          80

Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly
          85          90          95

Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val
          100          105          110

Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu
          115          120          125

Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe
          130          135          140

Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ser Gly
          145          150          155          160

Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly
          165          170          175

Gly Ala Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu
          180          185          190

Tyr Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly
          195          200          205

Leu Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro
          210          215          220
    
```

ES 2 609 336 T3

Arg Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu
 245 250 255

Pro Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile
 260 265 270

Arg Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly
 275 280 285

Thr Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr
 290 295 300

Ser Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly
 305 310 315 320

Leu Lys Val Thr Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly
 325 330 335

Lys Asp Lys Leu Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr
 340 345 350

Leu Ser Lys Met Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala
 355 360 365

Glu Thr Val Gly Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val
 370 375 380

Ala Ala Asn His Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile Lys Glu Ala Pro Lys
 385 390 395 400

Glu Leu Ser Phe Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro Val
 405 410 415

Ala Ser Lys

<210> 19
 <211> 11892
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector RCR - pAC3-yCD2

<400> 19

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120

ES 2 609 336 T3

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
actgagtccg ccgggtaccc gtgtatccaa taaacctct tgcagttgca tccgacttgt 660
ggctctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccctc agcgggggctc 720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgcctcgtc ggtactagt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgg 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgg cgcgaacct gggagacgtc ccagggactt 960
cgggggcccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgttt ggactctttg 1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacagct 1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgctcttg 1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtetgaga 1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct 1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct ccctccctgg gtcaagccct 1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc ccgctctctc cccttgaac 1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg 1620
ccaaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg 1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg accctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
gggagcggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcga ggcattcccc ctccgcgag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt totcctcttc tgaccttac aactggaaaa 1920
ataataaccc ttcttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgatc gagtctgttc 1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgccccgc gatgatgggc 2100

ES 2 609 336 T3

gcccactca actgccaat gaagtogatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
 attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctectagcgg 2220
 gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
 ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca 2340
 ctcttatga ccctgaggac ccagggcaag aactaatgt gtctatgtct ttcatttggc 2400
 agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
 ttggagatth ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
 gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
 agcagaaaaga gaaagaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
 ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
 atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760
 aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctcct cctgacccta gatgactagg 2820
 gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
 ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacctcctg gctgacccaa aatcctggac 2940
 ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggtactgg aggaaagcgg tatcgtgga 3000
 ccacggatcg caaagtacat ctagtaccg gtaaggtcac cactctttc ctccatgtac 3060
 cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttctgac taaactaaa gcccaaatcc 3120
 actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
 ccctaaatat agaagatgag catcggttac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
 tagggtccac atggctgtct gattttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac 3300
 tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
 taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
 tgttggacca ggaataactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctacccg 3480
 ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
 ggggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaca cctcttgagc gggctcccac 3600
 cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctgct ctgagactcc 3660
 accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc 3900
 gggccctggt acaaacctc gggaaacctg ggtatgggc ctggccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggctcag agatggctga 4020

ES 2 609 336 T3

ctgagggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
 gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctggggtt gcagaaatgg 4140
 cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctggt taattggggc ccagaccaac 4200
 aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc ccagaccctg gggttgccag 4260
 atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
 taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggtaggcta cctgtccaaa aagctagacc 4380
 cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
 aggatgcagc caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag 4500
 aggcactagt caaacaaccc ccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc 4560
 aggccttget tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccgg 4620
 ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg 4680
 aagcccacgg aaccgaccc gacctaacgg accagccgct ccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tgggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtagaag ctaaatgttt 4920
 atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
 gtgggttgcct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agaccagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatoca ttgtccagga catcaaaagg 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccca aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaa ttcateaccc tacacctcag 5220
 aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg 5280
 ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
 ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
 tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaacagg 5520
 gaactaggt ccgcccggcat cggcccggca ctcattggga gatcgatttc accgagataa 5580
 agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 tctccaaggt gagtcagaca gtggccgatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg 6000

ES 2 609 336 T3

gggcaccccc gcccttgta aacttccctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 cctctctcca agctcactta caggtctctc acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcacctc taccgagtgc 6180
 gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc cgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aaccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420
 agtcatggga gtccctgtag gagtaggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct cctcctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga 6600
 gtgggacctc tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggt actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcgtaaca cccctggga 6840
 cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaatc 6900
 cttccagggt gctactcgag ggggcagatg caaccteta gtccctagaat tcaactgatc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggccc aaatcgtggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggct ccacagccac ctagcccct caataccagt taccctcctt ccaactaccg 7200
 tacacctca acctccccta caagtccaag tgtccacag ccacccccag gaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcctt aacctacca atcccgaaa 7320
 gacccaagaa tggtggctgt gcttagtgtc gggacctct tattacgaag gagtagcgt 7380
 cgtgggact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca ctcccaaca 7440
 taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggag tacctaaaac 7500
 tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcggctca ggatcctact acctgacgc 7560
 accgcggga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgc ccaccaggt 7620
 gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca 7680
 ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt 7740
 atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat 7800
 agggacgggg accactgcct taattaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat 7860
 ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920

ES 2 609 336 T3

gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgetattcc taaaggaggg 7980
 aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
 gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
 aggccaagga tggttcgaag ggetgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc 8160
 caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
 caatcgattg gtccaatttg ttaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac 8280
 tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa 8340
 gccgcttga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt 8400
 cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg 8460
 gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc 8520
 ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcgggaacc 8580
 ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa 8640
 aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc 8700
 tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgccca gaaggtaacc cattgtatgg 8760
 gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac 8820
 gtctaggccc ccogaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg 8880
 tgaccggcgg catggcctcc aagtgggac aaaaggcat ggatatcgt tacgaggagg 8940
 ccctgctggg ctacaaggag ggcggcgtgc ctatcgccgg ctgtctgac aacaacaagg 9000
 acggcagtg gctgggcagg gccacaaca tgaggtcca gaaggctcc gccaccctgc 9060
 acggcgagat ctccaccctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaaggtg tacaaggaca 9120
 ccaccctgta caccaccctg tccccttgtg acatgtgtac cggcgctatc atcatgtacg 9180
 gcatccctag gtgtgtgac gccgagaacg tgaactcaa gtccaagggc gagaagtacc 9240
 tgcaaaccag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga 9300
 agcagttcat cgacgagagg cctcaggact ggttcgagga ttcggcgag taagcggccg 9360
 cagataaaat aaaagathtt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccacc 9420
 tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa aatacataa 9480
 ctgagaatag agaagttcag atcaaggta ggaacagatg gaacagctga atatgggcca 9540
 aacaggatat ctgtggtgag cagttcctgc cccggtcag ggccaagaac agatggaaca 9600
 gctgaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca 9660
 agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg 9720
 tttccagggt gccccaagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag 9780
 ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacia 9840
 cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca 9900

ES 2 609 336 T3

ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgct gttccttggg agggctctct 9960
 ctgagtgatt gactaccocgt cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
 aaaggccagc aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgctt ttccatagge tccgcccccc 10080
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaccocga caggactata 10140
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 10200
 gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 10260
 acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 10320
 accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc 10380
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 10440
 gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtggtggcct aactacggct aactagaag 10500
 gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 10560
 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgtt gcaagcagca 10620
 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 10680
 cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
 gtaaacctgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
 tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga 10920
 gggcttacca tctggcccc gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc 10980
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 11040
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtccgc 11100
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgcct tgcctgcagc atcgtggtgt cacgctcgtc 11160
 gtttggtag gcttcattca gctccggctt ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220
 catggttctc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcc atcgttctca gaagtaagtt 11280
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcaactgat aattctctta ctgcatgcc 11340
 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
 tatgcccgca ccgagttgct cttgcccggc gtaaacacgg gataataccg cggccatag 11460
 cagaacttta aaagtctca tcattggaaa acgttctctg gggcgaaaa tctcaaggat 11520
 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 11580
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
 aaaggaata agggcgacac gaaatggtg aatactcata ctcttccttt tccaatatta 11700
 ttgaagcatt tatcaggggt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
 aaataaaca ataggggtc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagc ccttctctct 11880
 tcaagaattc at 11892

ES 2 609 336 T3

<211> 11892
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Vector RCR - pAC3-yCD

<400> 20

```

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg      60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt      120
gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca      180
atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc      240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacg taaatggccc gcctggcatt atgccagta      300
catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac      360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg      420
atccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg      480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt      540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg ttagtgaac cggcgccagt cctccgattg      600
actgagtcgc ccgggtaccg gtgtatcaa taaacctct tcgagttgca tccgacttgt      660
ggtctcgtg ttccttggga ggtctctc tgagtattg actaccgctc agcgggggctc      720
ttcatttgg gggctcgtec gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca      780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtec gattgtctag tgtctatgac      840
tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagtt agctaaactag ctctgtatct ggcggaccag      900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgcg ccgcaacct gggagacgct ccagggactt      960
cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt caaaaaatcc cgatcgttt ggactctttg      1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatagtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacagtt      1080
tcccgcctcc gctcgaattt ttgcttccg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg      1140
tctgctgcag catcgttctg tggtgtctct gtctgactgt gttctgtat ttgtctgaga      1200
atatgggcca gactgttacc actccctaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg      1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct      1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc      1380
tcatcaacca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg      1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacce ccctccctgg gtcaagcct      1500
ttgtacacce taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac      1560
    
```

ES 2 609 336 T3

ctcctcggtc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctagggc 1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccaccttc cgacagggac ggaaatggtg 1740
gagaagcgac ccctgcgga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcttacgtg 1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctgca ggcattcccc ctccgcgag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
ataataacct ttctttttct gaagatccag gtaaaactgac agctctgatc gagtctgttc 1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc 2100
gccccactca actgcccaat gaagtctgat ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccatagcgg 2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca 2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatattggc 2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
ttggagattt ggttagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcaoctt cctggtagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac 2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgtctgga 3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac cactcttctc ctccatgtac 3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc 3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag catcggtac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
taggggccac atggctgtct gattttctctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattggac 3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
tgttggacca ggaatactg gtaccctgce agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg 3480

ES 2 609 336 T3

ttaagaaacc agggactaat gattatagge ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
 ggggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttaciaa cctcttgagc gggctcccac 3600
 cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc 3660
 accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcactgca cagagaccta gcgacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc 3900
 gggccctggt acaaacctca gggaacctcg ggtatcgggc ctccggccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtcaag tatctggggg atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
 ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
 gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg 4140
 cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctggt taattggggc ccagaccaac 4200
 aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg ggggtgccag 4260
 atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
 taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc 4380
 cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
 aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag 4500
 aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccggatg actcactatc 4560
 aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg 4620
 ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacia ctgccttgat atcctggccg 4680
 aagcccacgg aaccggacc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tggagcagc ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcgggta 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt 4920
 atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
 gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccga aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacacccc tacacctcag 5220
 aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg 5280
 ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
 ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgetgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460

ES 2 609 336 T3

tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg 5520
 gaactagggt ccgcgggcat cggccccgca ctcatggga gatcgatttc accgagataa 5580
 agccccgatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 tctccaaggt gagtcagaca gtggccgatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca ggcaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg 6000
 gggcaccccc gcccttgta aacttcctg acctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tgggacctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcacctt taccgagtcg 6180
 gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc accccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aacccccctca agataagatt aaccctgga agccctaat 6420
 agtcatggga gtctgttag gagtaggat ggcagagagc cccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgateta tgtgatctgg tgggagagga 6600
 gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca ccccctggga 6840
 cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaatc 6900
 ctccaagggt gctactcgag ggggcagatg caacccteta gtcctagaat tcactgatgc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggcccaa atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gacccccgag 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggtc ccacagccac ctagccccct caataccagt taccocctt ccactaccag 7200
 tacacctca acctcccta caagtccaag tgtcccacag ccacccccag gaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgtt aacctacca atcccgacaa 7320
 gacccaagaa tgttggtgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgtt 7380

ES 2 609 336 T3

cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca ctteccaaca 7440
 taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac 7500
 tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cggccgctca ggatcctact accttgacgc 7560
 acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt 7620
 gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca 7680
 ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt 7740
 atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat 7800
 agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat 7860
 ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920
 gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg 7980
 aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
 gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
 aggccaaagga tggttcgaag ggtgttttaa tagatcccc tggtttaacca ccttaatctc 8160
 caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
 caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac 8280
 tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa 8340
 gccgcttga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt 8400
 cttttgcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg 8460
 gtctttcccc tctgcctaaa ggaatgcaag gtctgtgaa tgtcgtgaag gaagcagttc 8520
 ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgc cctttgcagg cagcggaaacc 8580
 cccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa 8640
 aggcggcaca accccagtc cacgttgtga gttggatagt tgtgaaaga gtcaaatggc 8700
 tctcctcaag cgtattcaac aagggctga aggatgccca gaaggtacc cattgtatgg 8760
 gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac 8820
 gtctaggccc ccgaaccac ggggacgtgg ttttctttg aaaaacacga ttataaatgg 8880
 tgacaggggg aatggcaagc aagtgggatc agaagggtat ggacattgcc tatgaggagg 8940
 cggccttagg ttacaaagag ggtggtgttc ctattggcgg atgtcttatc aataacaaag 9000
 acggaagtgt tctcggctgt ggtcacaaca tgagatttca aaagggatcc gccacactac 9060
 atggtgagat ctccactttg gaaaactgtg ggagattaga gggcaaagtg tacaaagata 9120
 ccactttgta tacgacgctg tctccatgcg acatgtgtac aggtgccatc atcatgtatg 9180
 gtattccacg ctgtgttgc ggtgagaacg ttaatttcaa aagtaagggc gagaaatatt 9240
 tacaaactag aggtcacgag gttgttgtg ttgacgatga gaggtgtaa aagatcatga 9300
 aacaatttat cgatgaaaga cctcaggatt ggtttgaaga tattggtgag taggcggccg 9360

ES 2 609 336 T3

cagataaaat aaaagatfff atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc 9420
 tgtaggfuffg gcaagctagc ttaagtaacg ccattffgca aggcacggaa aaatacataa 9480
 ctgagaatag agaagffcag atcaaggfca ggaacagatg gaacagctga ataggggcca 9540
 aacaggatat ctgtggtaag cagffcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaaca 9600
 gctgaatatg ggccaaacag gatatactgtg gtaagcagff cctgccccgg ctcaggggcca 9660
 agaacagatg gfccccagat gcggfcccgc cctcagcagf ffctagagaa ccatcagatg 9720
 fffccagggt gccccaaagg cctgaaatga cctgtgfcct fuffffgaaact aaaccaatcag 9780
 ffccgffctc gctffctgffc gcgfcgffct gctccccgag cfcaataaaa gagcccacaa 9840
 cccctcactc ggggfcgccc gfctccgatt gactgagfcg cccgggfacc cgtgtatcca 9900
 ataaaccctc ffgcagffgc atccgactff gggfctcfcg gffccctggg agggfctcct 9960
 ctgagffgatt gactaccggt cagcgggggt cfffcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggcfcgfcg gctggcggff ffccataggc fccgcccccc 10080
 fgacgagcat cacaaaaatc gacfcctcaag fcagagggfg cgaacccga caggactata 10140
 aagataaccg gcgfffcfcc ctggaagffc cctcfcgfcg ffctcfcgffc cgaacctgfc 10200
 gctfaccgga facctgfcg cffffctccc ffccgggaagc gfggfcgff ffcaatgfc 10260
 acgctgtagg fatctcagff cggfgtaggt cfffcgfcfc aagctgggct gfgfgcacga 10320
 accccfcgff cagcccgacc gctgfcgfc atccggfaac fatcfcffg agfccaaccc 10380
 ggtaagacac gactfctgc cactggcagc agccactggf aacaggatta gcagagcgag 10440
 gfatgtaggc gfgfctacag agffcttgaa gfgfggfcct aactacggct aactagaag 10500
 gacagfuffg gffatctfcg cfcfcgfcgaa gccagffacc ffccgaaaaa gaggffgtag 10560
 cfctfgatcc ggcaaaaa ccaccgfcg tagcggfgg fffffgff gcaagcagca 10620
 gattacfcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctff atcffffcfa cggggfctga 10680
 cfcfcagffg aacgaaaaact cagfffaagg gaffffgfc atgagattat caaaaaggat 10740
 cffcacctag atcfffffaa atfaaaatg aagfffaaaa fcaatcfaa gfatafatga 10800
 gfaaactfg fctgacagff accaatgfc atcagfgag gcacctatc cagcagctg 10860
 fctatfffcg fcatccatag ffgcctgact cccfcgfcg tagataacta cगतacggga 10920
 gggctfacc fctggcccca gfgfcgfaat gataccfcga gaccacfcg caccggfcfc 10980
 agattfatca gcaataaac agccagccg aagggfcgag cfcgagaagf gfcctgcaac 11040
 fffatccgfc fccatccagf cfattaatfg ffccgggaa gctagagfa gtagffcgfc 11100
 agffaatagt ffgcgcaacg ffgtgfcct fgctgcaggc atcfcggfg cagfcfcgfc 11160
 gfffggfatg gctfcattca gfcfcggffc ccaacgatca aggcgagffa catgatcccc 11220
 catgfffgc aaaaaagcgg ffagfcctc cggfcctcc atcfcffgca gaagfaagff 11280

ES 2 609 336 T3

ggccgcagtg ttatcaactca tggttatggc agcaactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttctg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccaactgt gcaccaact gatcttcagc 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tcccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc at 11892

<210>21
<211> 12007
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Vector RCR - pACE-CD

10

<400> 21

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tattttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttcaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc cccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt 540
acgggtggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatcaa taaacctct tgcagttgca tccgacttgt 660
ggctctcgctg ttcottggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc 720
tttcatttgg gggtcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggacccg 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgg ccgcaacct gggagacgtc ccagggactt 960
cgggggccgt tttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020

ES 2 609 336 T3

gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt 1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg ttggggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg 1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaga 1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct 1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
tcacaccca ggttaagatc aaggtccttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacce cctccoctgg gtcaagccct 1500
ttgtacacc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac 1560
ctcctcgttc gaccccgctt cgatectccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg 1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg 1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
ataataacc ttcttttctt gaagatccag gtaaactgac agctctgatc gagtctgttc 1980
tcacaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaagge ggtgcggggc gatgatgggc 2100
gccccactca actgccaat gaagtcgatg ccgttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccctagcgg 2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggcaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
ggccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca 2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc 2400
agtctgcccc agacattggg agaaagtag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
ttggagattt ggttagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
agcagaaaaga gaaagaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga 2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc ccccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgacccaa aatcctggac 2940

ES 2 609 336 T3

ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tctcgtctgga 3000
 ccacggatcg caaagtacat ctagtaccg gtaaggtcac ccactctttc ctccatgtac 3060
 cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttctgtac taaactaaaa gcccaaatcc 3120
 accttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
 ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
 tagggctccac atggctgtct gattttcctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcctgggac 3300
 tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc ccctgtctca 3360
 taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
 tgttgaccga ggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg 3480
 ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
 ggggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaciaa cctcttgagc gggctcccac 3600
 cgtcccacca gtggtagact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctctg ctgagactcc 3660
 accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgtctac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc 3900
 gggccctggt acaaacccca ggaacctcg ggtatgggc ctggcccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtaag tatctgggtt atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
 ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
 gggagttcct agggacggca ggcttctctc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg 4140
 cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctggt taattggggc ccagaccaac 4200
 aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag 4260
 atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaagggtgcc 4320
 taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc 4380
 cagttagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
 aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag 4500
 aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cggccggatg actcactatc 4560
 aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg 4620
 ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg 4680
 aagcccacgg aaccgcaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tgggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt 4920

ES 2 609 336 T3

atactgatag ccgttatgct ttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
 gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggtgacca agcggcccga aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacacccc tacacctcag 5220
 aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatttatg 5280
 ataaaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
 ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcttagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
 tcaactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg 5520
 gaactagggc ccgcccggcat cggcccggca ctcatgggga gatcgatttc accgagataa 5580
 agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggctgt aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 tctccaaggt gagtcagaca gtggccgatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatagag atcttatatg 6000
 gggcaccccc gcccttgta aacttcctg acctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 cctctctcca agctcaetta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tgggagctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcaccct taccgagtcg 6180
 gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc acccccaccg cctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aaccccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420
 agtcatggga gtcctgttag gactagggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga 6600
 gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca ccccctggga 6840

ES 2 609 336 T3

cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc 6900
 cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtccctagaat tcaactgatgc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attaccatgt tctccctgac cgggcaggtc cttaatgtgg gaccccagat 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccega ccaaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggct ccacagccac cttagcccct caataccagt tccccctt ccaactaccag 7200
 tacacctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa 7320
 gaccaagaa tgttggtgt gcttagtgc gggacctcct tattacgaag gtagtagcgt 7380
 cgtgggcaact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtaccgcca ctcccaca 7440
 taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggag tacctaaaac 7500
 tcaccaggcc ttatgtaaca ccaccaaag cgccggctca ggatcctact acctgcagc 7560
 acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt 7620
 gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggccagag taatttacca 7680
 ctccccgat tatatgtatg gtcagctga acagcgtacc aatataaaa gagagccagt 7740
 atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggatig cagctggaat 7800
 agggacgggg accactgct taattaaaac ccagcagttt gacagcttc atgcccctat 7860
 ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920
 gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg 7980
 aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
 gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
 aggccaaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc 8160
 caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
 caatcgatta gtccaatttg ttaaagacag gatatcagtg gtccaggctc tagttttgac 8280
 tcaacaatat caccagctga agcctataga gtacgagcca tgacgtacgt tactggccga 8340
 agccgcttg aataaggccg gtgtgcgctt gtctatatgt tattttccac catattgccc 8400
 tcttttgca atgtgagggc ccggaaacct ggcctgtct tcttgacgag cattcctagg 8460
 ggtctttccc ctctcgcaa aggaatgcaa ggtctgtga atgtcgtgaa ggaagcagtt 8520
 cctctggaag cttcttgaag acaacaacg tctgtagcga ccctttgag gcagcggaac 8580
 cccccactg gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccac gtgtataaga tacacctgca 8640
 aaggcggcac aaccccagtg ccacgctgtg agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg 8700
 ctctcctcaa gcgtattcaa caagggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattgtatg 8760
 ggatctgatc tggggcctcg gtgcacatgc tttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaaa 8820

ES 2 609 336 T3

cgtctagggc ccccgaacca cggggacgtg gttttccttt gaaaaacacg ataataccat 8880
 ggtgacaggg ggaatggcaa gcaagtggga tcagaagggg atggacattg cctatgagga 8940
 ggcggcctta ggttacaaag aggggtggtg tcctattggc ggatgtctta tcaataacaa 9000
 agacggaagt gttctcggtc gtggtcacia catgagattt caaaagggat ccgccacact 9060
 acatggtgag atctccactt tggaaaactg tgggagatta gagggcaaag tgtacaaaga 9120
 taccactttg tatacgacgc tgtctccatg cgacatgtgt acaggtgccca tcatcatgta 9180
 tggattcca cgctgtgttg tcggtgagaa cgtaatttc aaaagtaagg gcgagaaata 9240
 tttacaaact agaggtcacg aggttgtgtg tgttgacgat gagaggtgta aaaagatcat 9300
 gaaacaattt atcgatgaaa gacctcagga ttggtttgaa gatattggtg agtaggcggc 9360
 cgcgccatag ataaaataaa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga 9420
 ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgccca ttttgcaagg catggaaaaa 9480
 tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa cagctgaata 9540
 tgggccaaac aggatatctg tggtaagcag ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga 9600
 tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggtg agcagttcct gccccggctc 9660
 agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtccagccct cagcagtttc tagagaacca 9720
 tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttgt ttaaaactaac 9780
 caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg cgcttctgct ccccagctc aataaaagag 9840
 cccacaacc ctcactcggg gcgccagtcc tccgattgac tgagtcgccc gggtaccctg 9900
 gtatccaata aacctcttg cagttgcatc cgacttgtgg tctcgctgtt ccttgggag 9960
 gtctcctctg agtgattgac taccogtcag cgggggtctt tcatttgggg gctcgtccgg 10020
 gatcgggaga cccctgccc aaggaccacc acccaccacc gggaggtgaa ctggctgcct 10080
 cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg 10140
 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttcca taggctccgc cccctgacg 10200
 agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaaa ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat 10260
 accaggegtt tccccctgga agtccccctg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccctta 10320
 ccggatacct gtcgccttt ctcctctcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgetcacgct 10380
 gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggetgtgtg cacgaacccc 10440
 ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa 10500
 gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg 10560
 tagggcgtgc tacagagttc ttgaagtgtg ggcetaacta cggetacact agaaggacag 10620
 tatttgggat ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt 10680
 gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta 10740

ES 2 609 336 T3

cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg totgacgctc 10800
 agtggaacga aaactcacgt taagggatth ttgcatgag attatcaaaa aggatcttca 10860
 cctagatcct tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa 10920
 cttggtctga cagttaccaa tgcttaata gtagggcacc tatctcagcg atctgtctat 10980
 ttcgcttcac catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct 11040
 taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt 11100
 tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgag aagtggctct gcaactttat 11160
 ccgcctccat ccagctctatt aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta 11220
 atagtttgcg caacggtggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg 11280
 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 11340
 tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 11400
 cagtgttacc actcatggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 11460
 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 11520
 ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa 11580
 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 11640
 cgtggttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtcacc caactgatct tcagcatctt 11700
 ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 11760
 gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa 11820
 gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 11880
 aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgct taagaaacca 11940
 ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtcttcaag 12000
 aattcat 12007

<210> 22
 <211> 11893
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Vector RCR - pAC3-yCD2

<400> 22

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc ttgctgaccg cccaacgacc cccgccatt 120
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
 atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
 aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300
 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360

ES 2 609 336 T3

catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
 ggactttcca aaatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540
 acggtgggag gtctatataa gcagagctgg ttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
 actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt 660
 ggtctcgtcg ttccctggga gggctcctc ttagtgattg actaccctgc agcgggggtc 720
 tttcatttg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
 ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
 tgattttatg cgcctcgtc ggtactagtt agctaaactag ctctgtatct ggcggaccocg 900
 tggtggaact gacgagttcg gaacaccccg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt 960
 cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
 gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacaggt 1080
 tcccgctcc gtctgaattt ttgcttcgg tttggaccg aagccgcgc gcgcgtcttg 1140
 tctgctgcag catcgttctg tgttctctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa 1200
 atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
 agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct 1320
 ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
 tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
 tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct cctccctgg gtcaagccct 1500
 ttgtacacct taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc ccogtctctc cccctgaaac 1560
 ctctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccage cctcactcct tctctaggcg 1620
 ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
 aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccoccttc cgacagggac ggaaatggtg 1740
 gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
 ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctgca ggcattcccc ctccgcgacg 1860
 gaggaaacgg acagcttcaa tactggcctg tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
 ataataacce ttcttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgatc gagtctgtcc 1980
 tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtacgcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
 gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc 2100
 gccccactca actgcccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
 attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgocagttg ctcttagcgg 2220
 gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag 2280

ES 2 609 336 T3

ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaaca 2340
 ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc 2400
 agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
 ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
 gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
 agcagaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
 ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
 atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga 2760
 aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
 gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
 cegtacactt cctggtagat actggggccc aactctcctg gctgacccaa aatcctggac 2940
 ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgtctgga 3000
 ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggteac ccactcttct ctcctgtac 3060
 cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc 3120
 actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
 ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
 tagggteccac atggctgtct gatcttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcctgggac 3300
 tggcagttcg ccaagctect ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
 taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
 tgttgacca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctacccg 3480
 ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
 ggggtggaaga catccacccc accgtgcccc accettacaa cctcttgagc gggctcccc 3600
 cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctgct ctgagactcc 3660
 accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcaactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca ccagacttg atcctgtac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca ctctgagct agactgcca caaggtactc 3900
 gggccctgtt acaaacccta ggaacctcg ggtatcgggc ctcggccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtcaag tatctgggtt atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
 ctgaggccag aaaagagact gtgatgggc agcctactcc gaagaccct cgacaactaa 4080
 gggagtctct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg 4140
 cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac 4200
 aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc ccagccctg gggttgccag 4260

ES 2 609 336 T3

atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
 taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggtaggcta cctgtccaaa aagctagacc 4380
 cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
 aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag 4500
 aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccgatg actcactatc 4560
 aggccttgcct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg 4620
 ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccc 4680
 aagcccacgg aaccggaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tggaaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcgggtga 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt 4920
 atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggg 4980
 gtgggttgcct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct cttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccga aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa tcatcacc caccctcag 5220
 aacatthtca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatthtat 5280
 ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
 ttgaattatt agactthtct catcagctga ctccctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
 tcaactgagac ctgcaaaagt tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg 5520
 gaactagggg cgcggggcat cggcccggca ctcatthgga gatcgatttc accgagataa 5580
 agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagthtttat agatacctth tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggctct aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tatthggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 totccaagg gtatcagaca gtggccgatc tgtthgggat tgattgaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaacctc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc ccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatagag atcttatatg 6000
 gggcaccccc gcccttgta aacttccctg acctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctaccctt taccgagtcg 6180

ES 2 609 336 T3

ggcacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aacccccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420
 agtcatggga gtctctgttag gtagtaggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga 6600
 gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca cccctggga 6840
 cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc 6900
 cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcctagaat tcaactgatgc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggcccaa atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attacatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccgga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggtc ccacagccac ctagccccct caataccagt taccocccct ccaactaccag 7200
 tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccacccccag gaaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggecctt aacctacca atcccgacaa 7320
 gacccaagaa tgttggtgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gtagtagcgt 7380
 cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca ctteccaaca 7440
 taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggag tacctaaaac 7500
 tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcgggctca ggatcctact acctgcagc 7560
 acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact cctgcttgt ccaccacggt 7620
 gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca 7680
 ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt 7740
 atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaacatg ggagggattg cagctggaat 7800
 agggacgggg accactgct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat 7860
 ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920
 gttgtctgaa gtagtctac agaaccgag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg 7980
 aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
 gagagacagc atggccaaat taagagaaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
 aggccaaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc 8160

ES 2 609 336 T3

caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
 caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac 8280
 tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa 8340
 gccgcttga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt atttccacc atattgccgt 8400
 cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg 8460
 gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgtttaa tgtcgtgaag gaagcagttc 8520
 ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc 8580
 ccccaacctg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa 8640
 aggcggcaca accccagtgc cacgttga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc 8700
 tctcctcaag cgtattcaac aaggggtga aggatgcca gaaggtaacc cattgtatgg 8760
 gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac 8820
 gtctaggccc ccgaaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg 8880
 tgaccggcgg catggcctcc aagtgggatc aaaagggcat ggatatcgct tacgaggagg 8940
 ccctgctggg ctacaaggag gggggcgtgc ctatcggcgg ctgtctgatc aacaacaagg 9000
 acggcagtg tctgggcagg ggcacaaca tgaggttcca gaagggtcc gccaccctgc 9060
 acggcgagat ctccaccctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaagggtg tacaaggaca 9120
 ccaccctgta caccaccctg tcccctgtg acatgtgtac cggcgtatc atcatgtacg 9180
 gcatccctag gtgtgtgatc ggcgagaacg tgaacttcaa gtccaagggc gagaagtacc 9240
 tgcaaacag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga 9300
 agcagttcat cgacgagagg cctcaggact ggttcgagga tatcggcgag taagcggccg 9360
 cagataaaat aaaagathtt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc 9420
 tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa aaatacataa 9480
 ctgagaatag agaagttag atcaaggta ggaacagatg gaacagctga atatgggcca 9540
 aacaggatat ctgtgtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca 9600
 gctgaatatg ggccaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca 9660
 agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg 9720
 tttccagggt gcccgaagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag 9780
 ttcgttctc gttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa 9840
 cccctcactc ggggcgccag tccctcgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca 9900
 ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgt gttccttggg agggctctct 9960
 ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
 aaagccagc aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 10080

ES 2 609 336 T3

tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata 10140
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 10200
 gcttaccgga tacctgtcog cctttctccc ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 10260
 acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtctc aagctgggct gtgtgcacga 10320
 accccccgtt cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc 10380
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 10440
 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag 10500
 gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttgtag 10560
 ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgtt tttttgttt gcaagcagca 10620
 gattacgcgc agaaaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga 10680
 cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
 gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
 tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgtg tagataacta cgatacggga 10920
 gggcttacca tctggccccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggetcc 10980
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac 11040
 tttatccgcc tocatccagt ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcggc 11100
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 11160
 gtttggtatg gcttcattca gctccggctc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220
 catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 11280
 ggccgcagtg ttatcaactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
 atccgtaaga tgcttttctg tgactgggta gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
 tatcgggcga ccgagttgct cttgcccgcc gtcaacacgg gataataacc cgccacatag 11460
 cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgctctctg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
 cttaccgctg ttgagatcca gttcogatga acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 11580
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaa 11640
 aaaggaata agggcgacac ggaatggtg aatactcata ctcttctttt ttcaatatta 11700
 ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
 aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaatagcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
 tcaagaattc cat 11893

<210> 23
 <211> 4473
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (175)..(3942)

10

ES 2 609 336 T3

<400> 23

| | |
|---|-----------------|
| aaggggaggt aaccctggcc cctttggtcg gggccccggg cagccgcgcg ccccttccca | 60 |
| cggggccctt tactgcgcgc cgcgcccggc ccccaccct cgcagcaccc cgcgccccgc | 120 |
| gccctcccag ccgggtccag ccggagccat ggggccggag ccgcagtgag cacc atg | 177 |
| | Met 1 |
| gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg ccc | 225 |
| Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro | |
| | 5 10 15 |
| ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag ctg | 273 |
| Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu | |
| | 20 25 30 |
| cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac ctc | 321 |
| Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu | |
| | 35 40 45 |
| tac cag gcc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac ctg | 369 |
| Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu | |
| | 50 55 60 65 |
| ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg cag | 417 |
| Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln | |
| | 70 75 80 |
| ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg cag | 465 |
| Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln | |
| | 85 90 95 |
| agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat gcc | 513 |
| Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala | |
| | 100 105 110 |
| ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat acc acc cct gtc | 561 |
| Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val | |
| | 115 120 125 |
| aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc ctc | 609 |
| Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu | |
| | 130 135 140 145 |
| aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag ctc | 657 |
| Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu | |
| | 150 155 160 |
| tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac aac | 705 |
| Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn | |
| | 165 170 175 |
| cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc cac | 753 |
| Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His | |
| | 180 185 190 |

ES 2 609 336 T3

| | |
|---|------|
| ccc tgt tct ccg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg gga gag agt tct | 801 |
| Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser | |
| 195 200 205 | |
| gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc ggt ggc tgt gcc | 849 |
| Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala | |
| 210 215 220 225 | |
| cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt gct | 897 |
| Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala | |
| 230 235 240 | |
| gcc gcc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc cac | 945 |
| Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His | |
| 245 250 255 | |
| ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc acc | 993 |
| Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr | |
| 260 265 270 | |
| tac aac aca gac acg ttt gag tcc atg ccc aat ccc gag ggc cgg tat | 1041 |
| Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr | |
| 275 280 285 | |
| aca ttc ggc gcc agc tgt gtg act gcc tgt ccc tac aac tac ctt tct | 1089 |
| Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser | |
| 290 295 300 305 | |
| acg gac gtg gga tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa gag | 1137 |
| Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu | |
| 310 315 320 | |
| gtg aca gca gag gat gga aca cag cgg tgt gag aag tgc agc aag ccc | 1185 |
| Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro | |
| 325 330 335 | |
| tgt gcc cga gtg tgc tat ggt ctg ggc atg gag cac ttg cga gag gtg | 1233 |
| Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val | |
| 340 345 350 | |
| agg gca gtt acc agt gcc aat atc cag gag ttt gct ggc tgc aag aag | 1281 |
| Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys | |
| 355 360 365 | |
| atc ttt ggg agc ctg gca ttt ctg ccg gag agc ttt gat ggg gac cca | 1329 |
| Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro | |
| 370 375 380 385 | |
| gcc tcc aac act gcc ccg ctc cag cca gag cag ctc caa gtg ttt gag | 1377 |
| Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu | |
| 390 395 400 | |
| act ctg gaa gag atc aca ggt tac cta tac atc tca gca tgg ccg gac | 1425 |
| Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp | |
| 405 410 415 | |
| agc ctg cct gac ctc agc gtc ttc cag aac ctg caa gta atc cgg gga | 1473 |
| Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly | |
| 420 425 430 | |
| cga att ctg cac aat ggc gcc tac tgg ctg acc ctg caa ggg ctg gcc | 1521 |
| Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly | |
| 435 440 445 | |
| atc agc tgg ctg ggg ctg cgc tca ctg agg gaa ctg ggc agt gga ctg | 1569 |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Ile | Ser | Trp | Leu | Gly | Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Glu | Leu | Gly | Ser | Gly | Leu | | |
| 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | 465 | | |
| gcc | ctc | atc | cac | cat | aac | acc | cac | ctc | tgc | ttc | gtg | cac | acg | gtg | ccc | | 1617 |
| Ala | Leu | Ile | His | His | Asn | Thr | His | Leu | Cys | Phe | Val | His | Thr | Val | Pro | | |
| | | | 470 | | | | | | 475 | | | | | 480 | | | |
| tgg | gac | cag | ctc | ttt | cgg | aac | ccg | cac | caa | gct | ctg | ctc | cac | act | gcc | | 1665 |
| Trp | Asp | Gln | Leu | Phe | Arg | Asn | Pro | His | Gln | Ala | Leu | Leu | His | Thr | Ala | | |
| | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | | |
| aac | cgg | cca | gag | gac | gag | tgt | gtg | ggc | gag | ggc | ctg | gcc | tgc | cac | cag | | 1713 |
| Asn | Arg | Pro | Glu | Asp | Glu | Cys | Val | Gly | Glu | Gly | Leu | Ala | Cys | His | Gln | | |
| | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | |
| ctg | tgc | gcc | cga | ggg | cac | tgc | tgg | ggt | cca | ggg | ccc | acc | cag | tgt | gtc | | 1761 |
| Leu | Cys | Ala | Arg | Gly | His | Cys | Trp | Gly | Pro | Gly | Pro | Thr | Gln | Cys | Val | | |
| | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | | |
| aac | tgc | agc | cag | ttc | ctt | cgg | ggc | cag | gag | tgc | gtg | gag | gaa | tgc | cga | | 1809 |
| Asn | Cys | Ser | Gln | Phe | Leu | Arg | Gly | Gln | Glu | Cys | Val | Glu | Glu | Cys | Arg | | |
| 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | 545 | | |
| gta | ctg | cag | ggg | ctc | ccc | agg | gag | tat | gtg | aat | gcc | agg | cac | tgt | ttg | | 1857 |
| Val | Leu | Gln | Gly | Leu | Pro | Arg | Glu | Tyr | Val | Asn | Ala | Arg | His | Cys | Leu | | |
| | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | | 560 | | |
| ccg | tgc | cac | cct | gag | tgt | cag | ccc | cag | aat | ggc | tca | gtg | acc | tgt | ttt | | 1905 |
| Pro | Cys | His | Pro | Glu | Cys | Gln | Pro | Gln | Asn | Gly | Ser | Val | Thr | Cys | Phe | | |
| | | | 565 | | | | | 570 | | | | | | 575 | | | |
| gga | ccg | gag | gct | gac | cag | tgt | gtg | gcc | tgt | gcc | cac | tat | aag | gac | cct | | 1953 |
| Gly | Pro | Glu | Ala | Asp | Gln | Cys | Val | Ala | Cys | Ala | His | Tyr | Lys | Asp | Pro | | |
| | | 580 | | | | | 585 | | | | | | 590 | | | | |
| ccc | ttc | tgc | gtg | gcc | cgc | tgc | ccc | agc | ggt | gtg | aaa | cct | gac | ctc | tcc | | 2001 |
| Pro | Phe | Cys | Val | Ala | Arg | Cys | Pro | Ser | Gly | Val | Lys | Pro | Asp | Leu | Ser | | |
| | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | | |
| tac | atg | ccc | atc | tgg | aag | ttt | cca | gat | gag | gag | ggc | gca | tgc | cag | cct | | 2049 |
| Tyr | Met | Pro | Ile | Trp | Lys | Phe | Pro | Asp | Glu | Glu | Gly | Ala | Cys | Gln | Pro | | |
| 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | 625 | | |
| tgc | ccc | atc | aac | tgc | acc | cac | tcc | tgt | gtg | gac | ctg | gat | gac | aag | ggc | | 2097 |
| Cys | Pro | Ile | Asn | Cys | Thr | His | Ser | Cys | Val | Asp | Leu | Asp | Asp | Lys | Gly | | |
| | | | 630 | | | | | | 635 | | | | | 640 | | | |
| tgc | ccc | gcc | gag | cag | aga | gcc | agc | cct | ctg | acg | tcc | atc | atc | tct | gcg | | 2145 |
| Cys | Pro | Ala | Glu | Gln | Arg | Ala | Ser | Pro | Leu | Thr | Ser | Ile | Ile | Ser | Ala | | |
| | | | 645 | | | | | 650 | | | | | | 655 | | | |
| gtg | gtt | ggc | att | ctg | ctg | gtc | gtg | gtc | ttg | ggg | gtg | gtc | ttt | ggg | atc | | 2193 |
| Val | Val | Gly | Ile | Leu | Leu | Val | Val | Val | Leu | Gly | Val | Val | Phe | Gly | Ile | | |
| | | 660 | | | | | 665 | | | | | | 670 | | | | |
| ctc | atc | aag | cga | cgg | cag | cag | aag | atc | cgg | aag | tac | acg | atg | cgg | aga | | 2241 |
| Leu | Ile | Lys | Arg | Arg | Gln | Gln | Lys | Ile | Arg | Lys | Tyr | Thr | Met | Arg | Arg | | |
| | 675 | | | | | 680 | | | | | | 685 | | | | | |
| ctg | ctg | cag | gaa | acg | gag | ctg | gtg | gag | ccg | ctg | aca | cct | agc | gga | gcg | | 2289 |
| Leu | Leu | Gln | Glu | Thr | Glu | Leu | Val | Glu | Pro | Leu | Thr | Pro | Ser | Gly | Ala | | |
| | | | 690 | | | 695 | | | 700 | | | | | | 705 | | |
| atg | ccc | aac | cag | gcg | cag | atg | cgg | atc | ctg | aaa | gag | acg | gag | ctg | agg | | 2337 |
| Met | Pro | Asn | Gln | Ala | Gln | Met | Arg | Ile | Leu | Lys | Glu | Thr | Glu | Leu | Arg | | |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | 710 | | 715 | | 720 | | | | | | | | | | | |
| aag | gtg | aag | gtg | ctt | gga | tct | ggc | gct | ttt | ggc | aca | gtc | tac | aag | ggc | 2385 |
| Lys | Val | Lys | Val | Leu | Gly | Ser | Gly | Ala | Phe | Gly | Thr | Val | Tyr | Lys | Gly | |
| | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | |
| atc | tgg | atc | cct | gat | ggg | gag | aat | gtg | aaa | att | cca | gtg | gcc | atc | aaa | 2433 |
| Ile | Trp | Ile | Pro | Asp | Gly | Glu | Asn | Val | Lys | Ile | Pro | Val | Ala | Ile | Lys | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | |
| gtg | ttg | agg | gaa | aac | aca | tcc | ccc | aaa | gcc | aac | aaa | gaa | atc | tta | gac | 2481 |
| Val | Leu | Arg | Glu | Asn | Thr | Ser | Pro | Lys | Ala | Asn | Lys | Glu | Ile | Leu | Asp | |
| | | | 755 | | | | 760 | | | | | | 765 | | | |
| gaa | gca | tac | gtg | atg | gct | ggg | gtg | ggc | tcc | cca | tat | gtc | tcc | cgc | ctt | 2529 |
| Glu | Ala | Tyr | Val | Met | Ala | Gly | Val | Gly | Ser | Pro | Tyr | Val | Ser | Arg | Leu | |
| | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | | 785 | |
| ctg | ggc | atc | tgc | ctg | aca | tcc | acg | gtg | cag | ctg | gtg | aca | cag | ctt | atg | 2577 |
| Leu | Gly | Ile | Cys | Leu | Thr | Ser | Thr | Val | Gln | Leu | Val | Thr | Gln | Leu | Met | |
| | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | 800 | | |
| ccc | tat | ggc | tgc | ctc | tta | gac | cat | gtc | cgg | gaa | aac | cgc | gga | cgc | ctg | 2625 |
| Pro | Tyr | Gly | Cys | Leu | Leu | Asp | His | Val | Arg | Glu | Asn | Arg | Gly | Arg | Leu | |
| | | | 805 | | | | | | 810 | | | | | 815 | | |
| ggc | tcc | cag | gac | ctg | ctg | aac | tgg | tgt | atg | cag | att | gcc | aag | ggg | atg | 2673 |
| Gly | Ser | Gln | Asp | Leu | Leu | Asn | Trp | Cys | Met | Gln | Ile | Ala | Lys | Gly | Met | |
| | | | 820 | | | | 825 | | | | | | | 830 | | |
| agc | tac | ctg | gag | gat | gtg | cgg | ctc | gta | cac | agg | gac | ttg | gcc | gct | cgg | 2721 |
| Ser | Tyr | Leu | Glu | Asp | Val | Arg | Leu | Val | His | Arg | Asp | Leu | Ala | Ala | Arg | |
| | | | 835 | | | 840 | | | | | 845 | | | | | |
| aac | gtg | ctg | gtc | aag | agt | ccc | aac | cat | gtc | aaa | att | aca | gac | ttc | ggg | 2769 |
| Asn | Val | Leu | Val | Lys | Ser | Pro | Asn | His | Val | Lys | Ile | Thr | Asp | Phe | Gly | |
| | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | | 865 | |
| ctg | gct | egg | ctg | ctg | gac | att | gac | gag | aca | gag | tac | cat | gca | gat | ggg | 2817 |
| Leu | Ala | Arg | Leu | Leu | Asp | Ile | Asp | Glu | Thr | Glu | Tyr | His | Ala | Asp | Gly | |
| | | | | | 870 | | | | 875 | | | | | 880 | | |
| ggc | aag | gtg | ccc | atc | aag | tgg | atg | ggc | ctg | gag | tcc | att | ctc | cgc | cgg | 2865 |
| Gly | Lys | Val | Pro | Ile | Lys | Trp | Met | Ala | Leu | Glu | Ser | Ile | Leu | Arg | Arg | |
| | | | 885 | | | | | 890 | | | | | | 895 | | |
| egg | ttc | acc | cac | cag | agt | gat | gtg | tgg | agt | tat | ggt | gtg | act | gtg | tgg | 2913 |
| Arg | Phe | Thr | His | Gln | Ser | Asp | Val | Trp | Ser | Tyr | Gly | Val | Thr | Val | Trp | |
| | | | 900 | | | | 905 | | | | | | 910 | | | |
| gag | ctg | atg | act | ttt | ggg | gcc | aaa | cct | tac | gat | ggg | atc | cca | gcc | egg | 2961 |
| Glu | Leu | Met | Thr | Phe | Gly | Ala | Lys | Pro | Tyr | Asp | Gly | Ile | Pro | Ala | Arg | |
| | | | 915 | | | 920 | | | | | 925 | | | | | |
| gag | atc | cct | gac | ctg | ctg | gaa | aag | ggg | gag | egg | ctg | ccc | cag | ccc | ccc | 3009 |
| Glu | Ile | Pro | Asp | Leu | Leu | Glu | Lys | Gly | Glu | Arg | Leu | Pro | Gln | Pro | Pro | |
| | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | | 945 | |
| atc | tgc | acc | att | gat | gtc | tac | atg | atc | atg | gtc | aaa | tgt | tgg | atg | att | 3057 |
| Ile | Cys | Thr | Ile | Asp | Val | Tyr | Met | Ile | Met | Val | Lys | Cys | Trp | Met | Ile | |
| | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 | | |
| gac | tct | gaa | tgt | egg | cca | aga | ttc | egg | gag | ttg | gtg | tct | gaa | ttc | tcc | 3105 |
| Asp | Ser | Glu | Cys | Arg | Pro | Arg | Phe | Arg | Glu | Leu | Val | Ser | Glu | Phe | Ser | |
| | | | 965 | | | | | 970 | | | | | | 975 | | |

ES 2 609 336 T3

| | |
|---|------|
| cgc atg gcc agg gac ccc cag cgc ttt gtg gtc atc cag aat gag gac Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp 980 985 990 | 3153 |
| ttg ggc cca gcc agt ccc ttg gac agc acc ttc tac cgc tca ctg ctg Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu 995 1000 1005 | 3201 |
| gag gac gat gac atg ggg gac ctg gtg gat gct gag gag tat ctg Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu 1010 1015 1020 | 3246 |
| gta ccc cag cag ggc ttc ttc tgt cca gac cct gcc ccg ggc gct Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala 1025 1030 1035 | 3291 |
| ggg ggc atg gtc cac cac agg cac cgc agc tca tct acc agg agt Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser 1040 1045 1050 | 3336 |
| ggc ggt ggg gac ctg aca cta ggg ctg gag ccc tct gaa gag gag Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu 1055 1060 1065 | 3381 |
| gcc ccc agg tct cca ctg gca ccc tcc gaa ggg gct ggc tcc gat Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp 1070 1075 1080 | 3426 |
| gta ttt gat ggt gac ctg gga atg ggg gca gcc aag ggg ctg caa Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln 1085 1090 1095 | 3471 |
| agc ctc ccc aca cat gac ccc agc cct cta cag cgg tac agt gag Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu 1100 1105 1110 | 3516 |
| gac ccc aca gta ccc ctg ccc tct gag act gat ggc tac gtt gcc Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala 1115 1120 1125 | 3561 |
| ccc ctg acc tgc agc ccc cag cct gaa tat gtg aac cag cca gat Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp 1130 1135 1140 | 3606 |
| gtt cgg ccc cag ccc cct tcg ccc cga gag ggc cct ctg cct gct Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala 1145 1150 1155 | 3651 |
| gcc cga cct gct ggt gcc act ctg gaa agg ccc aag act ctc tcc Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu Ser 1160 1165 1170 | 3696 |
| cca ggg aag aat ggg gtc gtc aaa gac gtt ttt gcc ttt ggg ggt Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly 1175 1180 1185 | 3741 |
| gcc gtg gag aac ccc gag tac ttg aca ccc cag gga gga gct gcc Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala 1190 1195 1200 | 3786 |
| cct cag ccc cac cct cct cct gcc ttc agc cca gcc ttc gac aac Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn 1205 1210 1215 | 3831 |

ES 2 609 336 T3

ctc tat tac tgg gac cag gac cca cca gag cgg ggg gct cca ccc 3876
 Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro
 1220 1225 1230

agc acc ttc aaa ggg aca cct acg gca gag aac cca gag tac ctg 3921
 Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu
 1235 1240 1245

ggt ctg gac gtg cca gtg tga accagaaggc caagtccgca gaagccctga 3972
 Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

tgtgtcctca gggagcaggg aaggcctgac ttctgctggc atcaagaggt gggagggccc 4032

tccgaccact tccaggggaa cctgccatgc caggaacctg tcctaaggaa ccttccttcc 4092

tgcttgagtt cccagatggc tggaaaggggt ccagcctcgt tggaaagagga acagcactgg 4152

ggagtctttg tggattctga ggcctgccc aatgagactc tagggctccag tggatgccac 4212

agcccagctt ggccttttcc ttccagatcc tgggtactga aagccttagg gaagctggcc 4272

tgagagggga agcggcccta agggagtgtc taagaacaaa agcgacccat tcagagactg 4332

tcctgaaac ctagtactgc ccccatgag gaaggaacag caatggtgtc agtatccagg 4392

ctttgtacag agtgcttttc tgtttagttt ttactttttt tgttttgttt ttttaaagat 4452

gaaataaaga cccaggggga g 4473

<210> 24
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

ES 2 609 336 T3

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
325 330 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
340 345 350

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
355 360 365

ES 2 609 336 T3

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| Gly | Cys | Pro | Ala | Glu | Gln | Arg | Ala | Ser | Pro | Leu | Thr | Ser | Ile | Ile | Ser |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| Ala | Val | Val | Gly | Ile | Leu | Leu | Val | Val | Val | Leu | Gly | Val | Val | Phe | Gly |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| Ile | Leu | Ile | Lys | Arg | Arg | Gln | Gln | Lys | Ile | Arg | Lys | Tyr | Thr | Met | Arg |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| Arg | Leu | Leu | Gln | Glu | Thr | Glu | Leu | Val | Glu | Pro | Leu | Thr | Pro | Ser | Gly |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | |
| Ala | Met | Pro | Asn | Gln | Ala | Gln | Met | Arg | Ile | Leu | Lys | Glu | Thr | Glu | Leu |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 |
| Arg | Lys | Val | Lys | Val | Leu | Gly | Ser | Gly | Ala | Phe | Gly | Thr | Val | Tyr | Lys |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | |
| Gly | Ile | Trp | Ile | Pro | Asp | Gly | Glu | Asn | Val | Lys | Ile | Pro | Val | Ala | Ile |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | |
| Lys | Val | Leu | Arg | Glu | Asn | Thr | Ser | Pro | Lys | Ala | Asn | Lys | Glu | Ile | Leu |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | |
| Asp | Glu | Ala | Tyr | Val | Met | Ala | Gly | Val | Gly | Ser | Pro | Tyr | Val | Ser | Arg |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | |
| Leu | Leu | Gly | Ile | Cys | Leu | Thr | Ser | Thr | Val | Gln | Leu | Val | Thr | Gln | Leu |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| Met | Pro | Tyr | Gly | Cys | Leu | Leu | Asp | His | Val | Arg | Glu | Asn | Arg | Gly | Arg |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | |
| Leu | Gly | Ser | Gln | Asp | Leu | Leu | Asn | Trp | Cys | Met | Gln | Ile | Ala | Lys | Gly |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | |
| Met | Ser | Tyr | Leu | Glu | Asp | Val | Arg | Leu | Val | His | Arg | Asp | Leu | Ala | Ala |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | |
| Arg | Asn | Val | Leu | Val | Lys | Ser | Pro | Asn | His | Val | Lys | Ile | Thr | Asp | Phe |
| | 850 | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | |
| Gly | Leu | Ala | Arg | Leu | Leu | Asp | Ile | Asp | Glu | Thr | Glu | Tyr | His | Ala | Asp |
| 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 |
| Gly | Gly | Lys | Val | Pro | Ile | Lys | Trp | Met | Ala | Leu | Glu | Ser | Ile | Leu | Arg |
| | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | |

ES 2 609 336 T3

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960 965

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140

ES 2 609 336 T3

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 1145 1150 1155

 Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
 1160 1165 1170

 Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

 Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 1190 1195 1200

 Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
 1205 1210 1215

 Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
 1220 1225 1230

 Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

 Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

5 <210> 25
 <211> 1212
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1212)

<400> 25

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | aca | gcc | atc | atc | aaa | gag | atc | gtt | agc | aga | aac | aaa | agg | aga | tat | 48 |
| Met | Thr | Ala | Ile | Ile | Lys | Glu | Ile | Val | Ser | Arg | Asn | Lys | Arg | Arg | Tyr | |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| caa | gag | gat | gga | ttc | gac | tta | gac | ttg | acc | tat | att | tat | cca | aac | att | 96 |
| Gln | Glu | Asp | Gly | Phe | Asp | Leu | Asp | Leu | Thr | Tyr | Ile | Tyr | Pro | Asn | Ile | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| att | gct | atg | gga | ttt | cct | gca | gaa | aga | ctt | gaa | ggc | gta | tac | agg | aac | 144 |
| Ile | Ala | Met | Gly | Phe | Pro | Ala | Glu | Arg | Leu | Glu | Gly | Val | Tyr | Arg | Asn | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aat | att | gat | gat | gta | gta | agg | ttt | ttg | gat | tca | aag | cat | aaa | aac | cat | 192 |
| Asn | Ile | Asp | Asp | Val | Val | Arg | Phe | Leu | Asp | Ser | Lys | His | Lys | Asn | His | |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| tac | aag | ata | tac | aat | ctt | tgt | gct | gaa | aga | cat | tat | gac | acc | gcc | aaa | 240 |
| Tyr | Lys | Ile | Tyr | Asn | Leu | Cys | Ala | Glu | Arg | His | Tyr | Asp | Thr | Ala | Lys | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttt | aat | tgc | aga | gtt | gca | caa | tat | cct | ttt | gaa | gac | cat | aac | cca | cca | 288 |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Phe | Asn | Cys | Arg | Val | Ala | Gln | Tyr | Pro | Phe | Glu | Asp | His | Asn | Pro | Pro | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| cag | cta | gaa | ctt | atc | aaa | ccc | ttt | tgt | gaa | gat | ctt | gac | caa | tgg | cta | | 336 |
| Gln | Leu | Glu | Leu | Ile | Lys | Pro | Phe | Cys | Glu | Asp | Leu | Asp | Gln | Trp | Leu | | |
| | | | 100 | | | | 105 | | | | | | 110 | | | | |
| agt | gaa | gat | gac | aat | cat | gtt | gca | gca | att | cac | tgt | aaa | gct | gga | aag | | 384 |
| Ser | Glu | Asp | Asp | Asn | His | Val | Ala | Ala | Ile | His | Cys | Lys | Ala | Gly | Lys | | |
| | | 115 | | | | 120 | | | | | | 125 | | | | | |
| gga | cga | act | ggt | gta | atg | ata | tgt | gca | tat | tta | tta | cat | cgg | ggc | aaa | | 432 |
| Gly | Arg | Thr | Gly | Val | Met | Ile | Cys | Ala | Tyr | Leu | Leu | His | Arg | Gly | Lys | | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | | |
| ttt | tta | aag | gca | caa | gag | gcc | cta | gat | ttc | tat | ggg | gaa | gta | agg | acc | | 480 |
| Phe | Leu | Lys | Ala | Gln | Glu | Ala | Leu | Asp | Phe | Tyr | Gly | Glu | Val | Arg | Thr | | |
| | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| aga | gac | aaa | aag | gga | gta | act | att | ccc | agt | cag | agg | cgc | tat | gtg | tat | | 528 |
| Arg | Asp | Lys | Lys | Gly | Val | Thr | Ile | Pro | Ser | Gln | Arg | Arg | Tyr | Val | Tyr | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| tat | tat | agc | tac | ctg | tta | aag | aat | cat | ctg | gat | tat | aga | cca | gtg | gca | | 576 |
| Tyr | Tyr | Ser | Tyr | Leu | Leu | Lys | Asn | His | Leu | Asp | Tyr | Arg | Pro | Val | Ala | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| ctg | ttg | ttt | cac | aag | atg | atg | ttt | gaa | act | att | cca | atg | ttc | agt | ggc | | 624 |
| Leu | Leu | Phe | His | Lys | Met | Met | Phe | Glu | Thr | Ile | Pro | Met | Phe | Ser | Gly | | |
| | | | 195 | | | 200 | | | | | | | 205 | | | | |
| gga | act | tgc | aat | cct | cag | ttt | gtg | gtc | tgc | cag | cta | aag | gtg | aag | ata | | 672 |
| Gly | Thr | Cys | Asn | Pro | Gln | Phe | Val | Val | Cys | Gln | Leu | Lys | Val | Lys | Ile | | |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | | |
| tat | tcc | tcc | aat | tca | gga | ccc | aca | cga | cgg | gaa | gac | aag | ttc | atg | tac | | 720 |
| Tyr | Ser | Ser | Asn | Ser | Gly | Pro | Thr | Arg | Arg | Glu | Asp | Lys | Phe | Met | Tyr | | |
| | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| ttt | gag | ttc | cct | cag | ccg | tta | cct | gtg | tgt | ggt | gat | atc | aaa | gta | gag | | 768 |
| Phe | Glu | Phe | Pro | Gln | Pro | Leu | Pro | Val | Cys | Gly | Asp | Ile | Lys | Val | Glu | | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| ttc | ttc | cac | aaa | cag | aac | aag | atg | cta | aaa | aag | gac | aaa | atg | ttt | cac | | 816 |
| Phe | Phe | His | Lys | Gln | Asn | Lys | Met | Leu | Lys | Lys | Asp | Lys | Met | Phe | His | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| ttt | tgg | gta | aat | aca | ttc | ttc | ata | cca | gga | cca | gag | gaa | acc | tca | gaa | | 864 |
| Phe | Trp | Val | Asn | Thr | Phe | Phe | Ile | Pro | Gly | Pro | Glu | Glu | Thr | Ser | Glu | | |
| | | | 275 | | | | 280 | | | | | | 285 | | | | |
| aaa | gta | gaa | aat | gga | agt | cta | tgt | gat | caa | gaa | atc | gat | agc | att | tgc | | 912 |
| Lys | Val | Glu | Asn | Gly | Ser | Leu | Cys | Asp | Gln | Glu | Ile | Asp | Ser | Ile | Cys | | |
| | | | 290 | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| agt | ata | gag | cgt | gca | gat | aat | gac | aag | gaa | tat | cta | gta | ctt | act | tta | | 960 |
| Ser | Ile | Glu | Arg | Ala | Asp | Asn | Asp | Lys | Glu | Tyr | Leu | Val | Leu | Thr | Leu | | |
| | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| aca | aaa | aat | gat | ctt | gac | aaa | gca | aat | aaa | gac | aaa | gcc | aac | cga | tac | | 1008 |
| Thr | Lys | Asn | Asp | Leu | Asp | Lys | Ala | Asn | Lys | Asp | Lys | Ala | Asn | Arg | Tyr | | |
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | 335 | | | |
| ttt | tct | cca | aat | ttt | aag | gtg | aag | ctg | tac | ttc | aca | aaa | aca | gta | gag | | 1056 |
| Phe | Ser | Pro | Asn | Phe | Lys | Val | Lys | Leu | Tyr | Phe | Thr | Lys | Thr | Val | Glu | | |

ES 2 609 336 T3

| 340 | 345 | 350 | |
|---|-----|-----|------|
| gag ccg tca aat cca gag gct agc agt tca act tct gta aca cca gat | | | 1104 |
| Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| ggt agt gac aat gaa cct gat cat tat aga tat tct gac acc act gac | | | 1152 |
| Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat gaa gat cag cat aca caa att | | | 1200 |
| Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| aca aaa gtc tga | | | 1212 |
| Thr Lys Val | | | |

5
 <210> 26
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

ES 2 609 336 T3

Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
 1 5 10 15

Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
 20 25 30

Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
 35 40 45

Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His
 50 55 60

Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys
 65 70 75 80

Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro
 85 90 95

Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
 100 105 110

Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
 115 120 125

Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
 130 135 140

Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
 145 150 155 160

ES 2 609 336 T3

Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
165 170 175

Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
180 185 190

Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
195 200 205

Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
210 215 220

Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
225 230 235 240

Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
245 250 255

Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
260 265 270

Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
275 280 285

Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
290 295 300

Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
305 310 315 320

Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr
325 330 335

Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu
340 345 350

Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp
355 360 365

Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp
370 375 380

Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile
385 390 395 400

Thr Lys Val

<210> 27
<211> 597
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 609 336 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(597)

5 <400> 27

| | |
|---|-----|
| atg tca aac gtg cga gtg tct aac ggg agc cct agc ctg gag cgg atg | 48 |
| Met Ser Asn Val Arg Val Ser Asn Gly Ser Pro Ser Leu Glu Arg Met | |
| 1 5 10 15 | |
| gac gcc agg cag gcg gag cac ccc aag ccc tcg gcc tgc agg aac ctc | 96 |
| Asp Ala Arg Gln Ala Glu His Pro Lys Pro Ser Ala Cys Arg Asn Leu | |
| 20 25 30 | |
| ttc ggc ccg gtg gac cac gaa gag tta acc cgg gac ttg gag aag cac | 144 |
| Phe Gly Pro Val Asp His Glu Glu Leu Thr Arg Asp Leu Glu Lys His | |
| 35 40 45 | |
| tgc aga gac atg gaa gag gcg agc cag cgc aag tgg aat ttc gat ttt | 192 |
| Cys Arg Asp Met Glu Glu Ala Ser Gln Arg Lys Trp Asn Phe Asp Phe | |
| 50 55 60 | |
| cag aat cac aaa ccc cta gag ggc aag tac gag tgg caa gag gtg gag | 240 |
| Gln Asn His Lys Pro Leu Glu Gly Lys Tyr Glu Trp Gln Glu Val Glu | |
| 65 70 75 80 | |
| aag ggc agc ttg ccc gag ttc tac tac aga ccc ccg cgg ccc ccc aaa | 288 |
| Lys Gly Ser Leu Pro Glu Phe Tyr Tyr Arg Pro Pro Arg Pro Pro Lys | |
| 85 90 95 | |
| ggt gcc tgc aag gtg ccg gcg cag gag agc cag gat gtc agc ggg agc | 336 |
| Gly Ala Cys Lys Val Pro Ala Gln Glu Ser Gln Asp Val Ser Gly Ser | |
| 100 105 110 | |
| cgc ccg gcg gcg cct tta att ggg gct ccg gct aac tot gag gac acg | 384 |
| Arg Pro Ala Ala Pro Leu Ile Gly Ala Pro Ala Asn Ser Glu Asp Thr | |
| 115 120 125 | |
| cat ttg gtg gac cca aag act gat ccg tcg gac agc cag acg ggg tta | 432 |
| His Leu Val Asp Pro Lys Thr Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr Gly Leu | |
| 130 135 140 | |
| gcg gag caa tgc gca gga ata agg aag cga cct gca acc gac gat tct | 480 |
| Ala Glu Gln Cys Ala Gly Ile Arg Lys Arg Pro Ala Thr Asp Asp Ser | |
| 145 150 155 160 | |
| tct act caa aac aaa aga gcc aac aga aca gaa gaa aat gtt tca gac | 528 |
| Ser Thr Gln Asn Lys Arg Ala Asn Arg Thr Glu Glu Asn Val Ser Asp | |
| 165 170 175 | |
| ggt tcc cca aat gcc ggt tct gtg gag cag acg ccc aag aag cct ggc | 576 |
| Gly Ser Pro Asn Ala Gly Ser Val Glu Gln Thr Pro Lys Lys Pro Gly | |
| 180 185 190 | |
| ctc aga aga cgt caa acg taa | 597 |
| Leu Arg Arg Arg Gln Thr | |
| 195 | |

10 <210> 28
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 28

ES 2 609 336 T3

Met Ser Asn Val Arg Val Ser Asn Gly Ser Pro Ser Leu Glu Arg Met
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Gln Ala Glu His Pro Lys Pro Ser Ala Cys Arg Asn Leu
 20 25 30

Phe Gly Pro Val Asp His Glu Glu Leu Thr Arg Asp Leu Glu Lys His
 35 40 45

Cys Arg Asp Met Glu Glu Ala Ser Gln Arg Lys Trp Asn Phe Asp Phe
 50 55 60

Gln Asn His Lys Pro Leu Glu Gly Lys Tyr Glu Trp Gln Glu Val Glu
 65 70 75 80

Lys Gly Ser Leu Pro Glu Phe Tyr Tyr Arg Pro Pro Arg Pro Pro Lys
 85 90 95

Gly Ala Cys Lys Val Pro Ala Gln Glu Ser Gln Asp Val Ser Gly Ser
 100 105 110

Arg Pro Ala Ala Pro Leu Ile Gly Ala Pro Ala Asn Ser Glu Asp Thr
 115 120 125

His Leu Val Asp Pro Lys Thr Asp Pro Ser Asp Ser Gln Thr Gly Leu
 130 135 140

Ala Glu Gln Cys Ala Gly Ile Arg Lys Arg Pro Ala Thr Asp Asp Ser
 145 150 155 160

Ser Thr Gln Asn Lys Arg Ala Asn Arg Thr Glu Glu Asn Val Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Pro Asn Ala Gly Ser Val Glu Gln Thr Pro Lys Lys Pro Gly
 180 185 190

Leu Arg Arg Arg Gln Thr
 195

<210> 29
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(894)

10

<400> 29

ES 2 609 336 T3

| | |
|---|-----|
| atg aca aca ccc aga aat tca gta aat ggg act ttc ccg gca gag cca | 48 |
| Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro | |
| 1 5 10 15 | |
| atg aaa ggc cct att gct atg caa tct ggt cca aaa cca ctc ttc agg | 96 |
| Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg | |
| 20 25 30 | |
| agg atg tct tca ctg gtg ggc ccc acg caa agc ttc ttc atg agg gaa | 144 |
| Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu | |
| 35 40 45 | |
| tct aag act ttg ggg gct gtc cag att atg aat ggg ctc ttc cac att | 192 |
| Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile | |
| 50 55 60 | |
| gcc ctg ggg ggt ctt ctg atg atc cca gca ggg atc tat gca ccc atc | 240 |
| Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile | |
| 65 70 75 80 | |
| tgt gtg act gtg tgg tac cct ctc tgg gga ggc att atg tat att att | 288 |
| Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile | |
| 85 90 95 | |
| tcc gga tca ctc ttg gca gca acg gag aaa aac tct agg aag tgt ttg | 336 |
| Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu | |
| 100 105 110 | |
| gtc aaa gga aaa atg ata atg aat tca ttg agc ctc ttt gct gcc att | 384 |
| Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile | |
| 115 120 125 | |
| tct gga atg att ctt tca atc atg gac ata ctt aat att aaa att tcc | 432 |
| Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser | |
| 130 135 140 | |
| cat ttt tta aaa atg gag agt ctg aat ttt att aga gct cac aca cca | 480 |
| His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro | |
| 145 150 155 160 | |
| tat att aac ata tac aac tgt gaa cca gct aat ccc tct gag aaa aac | 528 |
| Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn | |
| 165 170 175 | |
| tcc cca tct acc caa tac tgt tac agc ata caa tct ctg ttc ttg ggc | 576 |
| Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly | |
| 180 185 190 | |
| att ttg tca gtg atg ctg atc ttt gcc ttc ttc cag gaa ctt gta ata | 624 |
| Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile | |
| 195 200 205 | |
| gct ggc atc gtt gag aat gaa tgg aaa aga acg tgc tcc aga ccc aaa | 672 |
| Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys | |
| 210 215 220 | |
| tct aac ata gtt ctc ctg tca gca gaa gaa aaa aaa gaa cag act att | 720 |
| Ser Asn Ile Val Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile | |
| 225 230 235 240 | |
| gaa ata aaa gaa gaa gtg gtt ggg cta act gaa aca tct tcc caa cca | 768 |

ES 2 609 336 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ile | Lys | Glu | Glu | Val | Val | Gly | Leu | Thr | Glu | Thr | Ser | Ser | Gln | Pro | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| aag | aat | gaa | gaa | gac | att | gaa | att | att | cca | atc | caa | gaa | gag | gaa | gaa | 816 |
| Lys | Asn | Glu | Glu | Asp | Ile | Glu | Ile | Ile | Pro | Ile | Gln | Glu | Glu | Glu | Glu | |
| | | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| gaa | gaa | aca | gag | acg | aac | ttt | cca | gaa | cct | ccc | caa | gat | cag | gaa | tcc | 864 |
| Glu | Glu | Thr | Glu | Thr | Asn | Phe | Pro | Glu | Pro | Pro | Gln | Asp | Gln | Glu | Ser | |
| | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| tca | cca | ata | gaa | aat | gac | agc | tct | cct | taa | | | | | | | 894 |
| Ser | Pro | Ile | Glu | Asn | Asp | Ser | Ser | Pro | | | | | | | | |
| | 290 | | | | 295 | | | | | | | | | | | |

<210> 30
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

ES 2 609 336 T3

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
 20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
 35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
 50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
 65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
 85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
 100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
 115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
 130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175

ES 2 609 336 T3

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
 180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
 210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
 225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu
 260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
 275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce una partícula de retrovirus competente para la replicación, expresando de forma estable dicha línea celular HT1080 un genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, polinucleótido heterólogo y el factor *psi* retroviral (Ψ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante, donde la partícula de retrovirus competente para la replicación comprende el genoma retroviral recombinante y donde la línea celular HT1080 se ha adaptada para crecer en medio libre de suero y en suspensión.
2. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 1, donde el retrovirus es un gammaretrovirus.
3. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 1, donde el retrovirus competente para la replicación comprende:
- una proteína GAG retroviral;
 - una proteína POL retroviral;
 - una envoltura retroviral;
 - un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico *gag*, un dominio de ácido nucleico *pol* y un dominio de ácido nucleico *env*;
 - un casete que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o un dominio de ácido nucleico regulador unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, donde el casete se sitúa en 5' de la LTR en 3' y en 3' del dominio de ácido nucleico *env* que codifica la envoltura retroviral; y
 - secuencias de acción en *cis* necesarias para la transcripción inversa, el empaquetado y la integración en una célula diana,
- donde el RCR mantiene una mayor competencia de replicación después de 6 pases, en comparación con un vector PACE.
4. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 3, donde la secuencia polinucleotídica retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous, el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV) o el virus felino RD114, preferentemente el MLV es un MLV antrófico.
5. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 3, donde la secuencia promotora está asociada con un gen regulador del crecimiento.
6. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 3, donde la secuencia promotora comprende: una secuencia promotora específica de tejido, preferiblemente donde la secuencia promotora específica de tejido comprende al menos un elemento de respuesta a andrógenos (ARE), más preferiblemente donde el elemento de respuesta a andrógenos deriva del promotor de probasina.
7. La línea celular productora de retrovirus de acuerdo con la reivindicación 3, donde el promotor comprende un promotor del CMV que tiene una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más bases de ácido nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción.
8. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 3, donde el promotor comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582.
9. La línea celular productora de retrovirus de acuerdo con la reivindicación 3, donde el promotor comprende un polinucleótido de dominio CMV-R-U5, preferiblemente donde el dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano unido a una región R-U5 de MLV, más preferiblemente donde el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22, donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma.
10. La línea celular productora de retrovirus de la reivindicación 3, donde la *gag* del polinucleótido deriva de un gammaretrovirus, preferiblemente donde el dominio de ácido nucleico *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 de SEQ ID NO 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 %, con la misma,
- o donde el dominio *pol* del polinucleótido deriva de un gammaretrovirus, preferiblemente donde el dominio *pol* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 hasta aproximadamente el

nucleótido 6358 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de identidad con la misma,

o donde el dominio env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % con la misma,

o donde el IRES deriva de un virus de encefalomiocarditis, preferiblemente donde el IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 hasta aproximadamente el nucleótido 8876 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma,

o donde la LTR en 3' deriva de un gammaretrovirus, preferiblemente donde la LTR en 3' comprende un dominio U3 - R - U5, preferiblemente donde la LTR en 3' comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente nucleótido 9405 a aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 % o 99,5 % idéntica de la misma.

11. La línea celular productora de retrovirus de acuerdo con la reivindicación 3, donde el ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15 o 17, o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido que comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 4 o donde el ácido nucleico heterólogo está optimizado por codones humanos y codifica un polipéptido como se establece en la SEQ ID NO: 4;

o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 8877 hasta aproximadamente 9353, o donde el polinucleótido retroviral comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22.

12. La línea celular productora de retrovirus de acuerdo con la reivindicación 3, donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un modificador de respuesta biológica, preferiblemente donde el modificador de respuesta biológica comprende una citocina inmunopotenciadora, preferiblemente donde la citocina inmunopotenciadora se selecciona de interleucinas 1 a 15, interferón, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), preferiblemente donde la citocina inmunopotenciadora es interferón, preferiblemente donde el interferón es interferón gamma,

o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido que convierte un profármaco no tóxico en un fármaco tóxico, preferiblemente donde el polipéptido que convierte un profármaco no tóxico en un fármaco tóxico es timidina quinasa, purina nucleósido fosforilasa (PNP) o citosina desaminasa,

o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica el resto diana, preferiblemente donde el resto diana comprende un antígeno de cáncer,

o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un dominio de unión, preferiblemente donde el dominio de unión comprende un dominio receptor, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo,

o donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido inhibidor, preferiblemente donde el polinucleótido inhibidor comprende una secuencia de ARNi o ARNic y donde el dominio de ácido nucleico regulador es un promotor.

13. Un método para producir una línea celular productora de retrovirus de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 12, que comprende:

transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende, de 5 'a 3':

una fusión CMV-R-U5 del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV;

un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa;

un sitio de corte y empalme en 5';

señal de empaquetamiento ψ ;

una secuencia codificante de gag para el antígeno específico del grupo MLV;

una secuencia codificante de pol para la poliproteína de polimerasa del MLV;

un sitio de corte y empalme en 3';

una secuencia codificante de env de 4070A para la proteína de la envoltura de la cepa 4070A de MLV;

un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador del ácido nucleico;

una secuencia codificante de la citosina desaminasa modificada;

una tira de polipurina; y

una repetición terminal larga de U3-R-U5 de MLV;

cultivar la célula 293 para producir partículas víricas;

aislar las partículas víricas;

infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, proporcionando de este modo una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación; y

adaptar la línea celular HT180 productora de retrovirus para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

14. La línea celular producida mediante el método de la reivindicación 13.

15. Un método para producir una composición para terapia génica que comprende cultivar la línea celular de la reivindicación 14, para producir partículas víricas y purificar sustancialmente las partículas víricas.

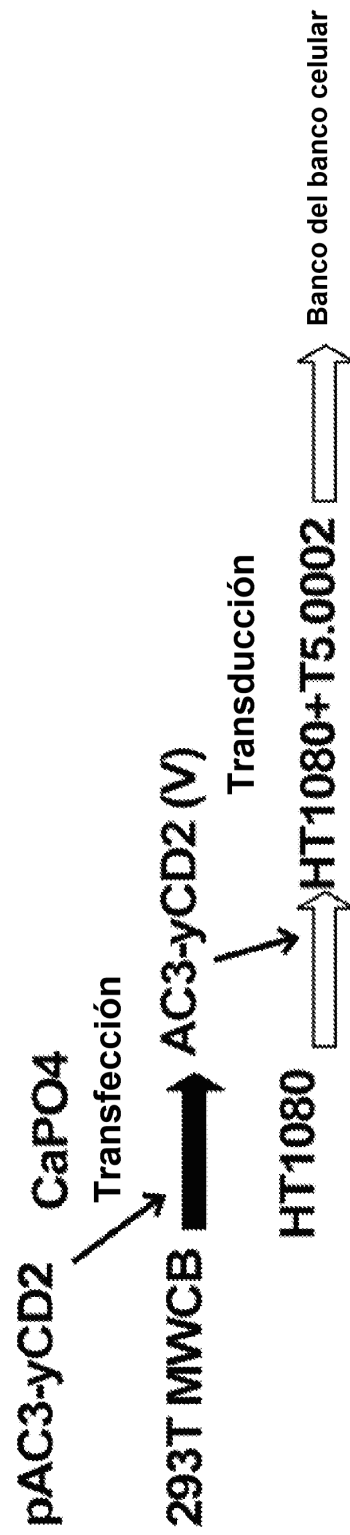


FIGURA 1

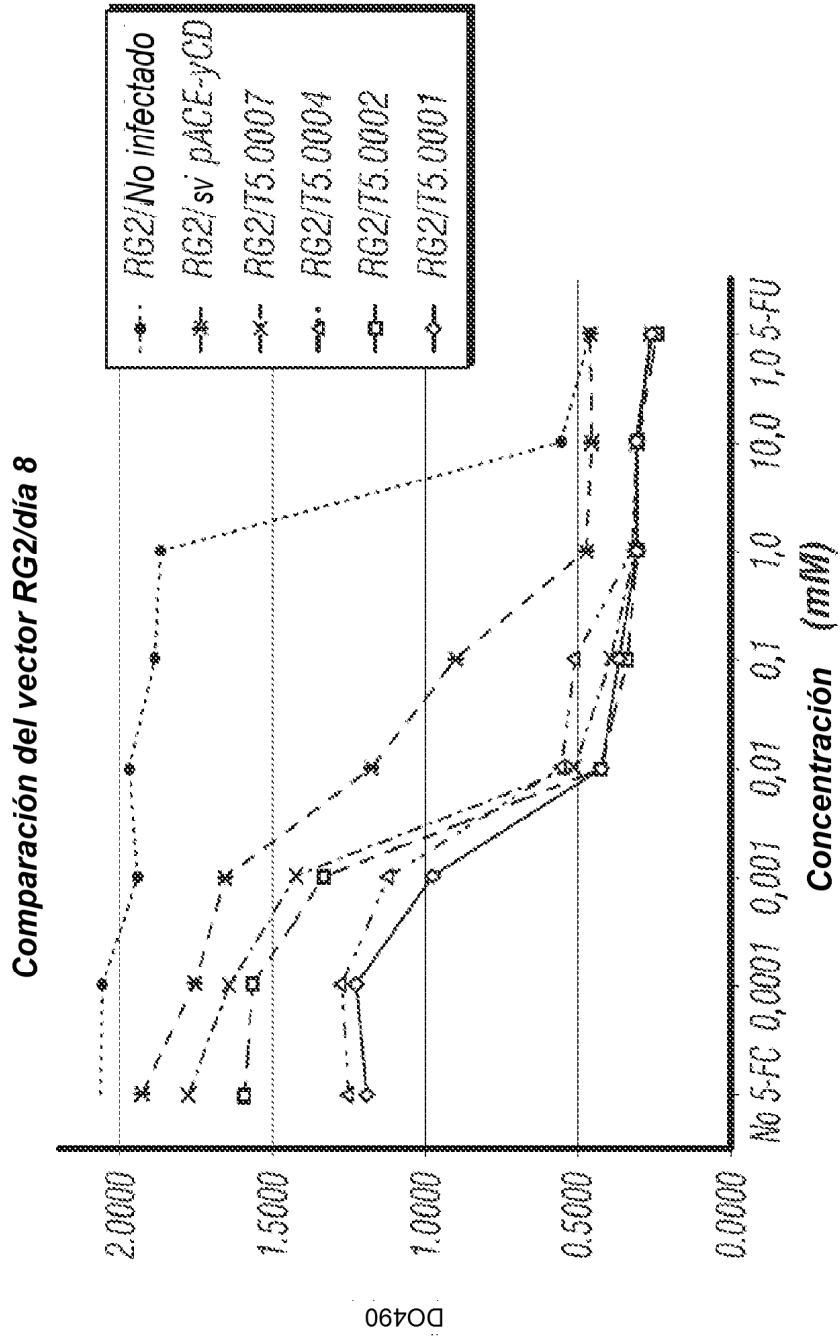


FIGURA 2

| Ref. leyenda | Nombre de la referencia | Nombre original | Otros nombres | Promotor LTR5' | Envoltura | Vector | RES | Transgén | 3'LTR | Notas |
|--------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------------|--------------|----------|------|-------------------|--------|-------------------------------------|
| 75.0001 | pAC3-FCO1 | CDqul secuencia | | CMV | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura | | hu codón |
| 75.0002 | pAC3-FCO2 | CDqul+3ot | | CMV | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura | | hu codón + 3ot mutaciones |
| 75.0003 | pAC3-FCO-U | CD-OPRT | | CMV | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura | | hu codón + 3ot mut OPRT fusión |
| 75.0004 | pAC3-FCO2-0 | CDqul+3ot-OPRT | | CMV | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura | | hu codón + 3ot mut OPRT fusión |
| 75.0005 | pAC3-FCO2-10 | CDqul+3ot-LINK-OPRT | | CMV | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura | | hu codón + 3ot mut-LINK-OPRT fusión |
| 75.0006 | pAC3-EGFP | pACE-erm | pACE-GFP | CMV | Anfo (40704) | | EMCV | GFP esmeralda | MLV U3 | GFP esmeralda |
| 75.0007 | pAC3-FCO | pAC3-FCO | | CMV | Anfo (40704) | | EMCV | CD de levadura sv | MLV U3 | |

FIG. 2 (Cont)

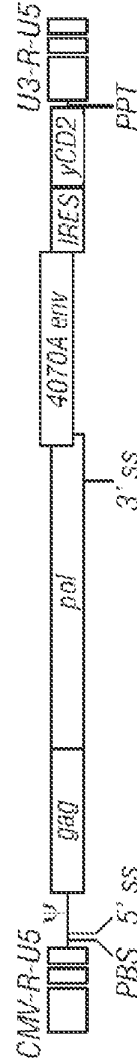


FIG. 3A

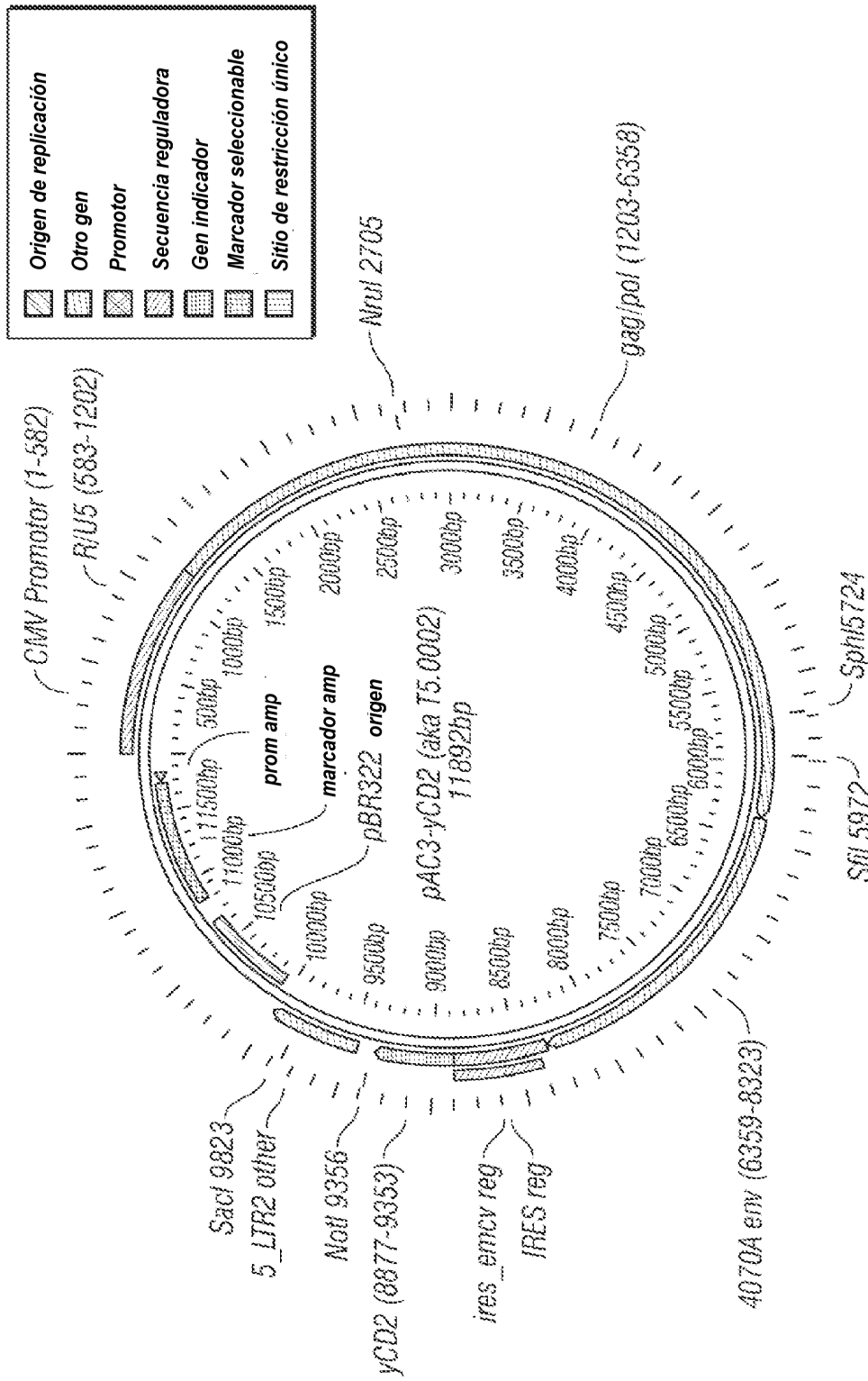


FIG. 3B

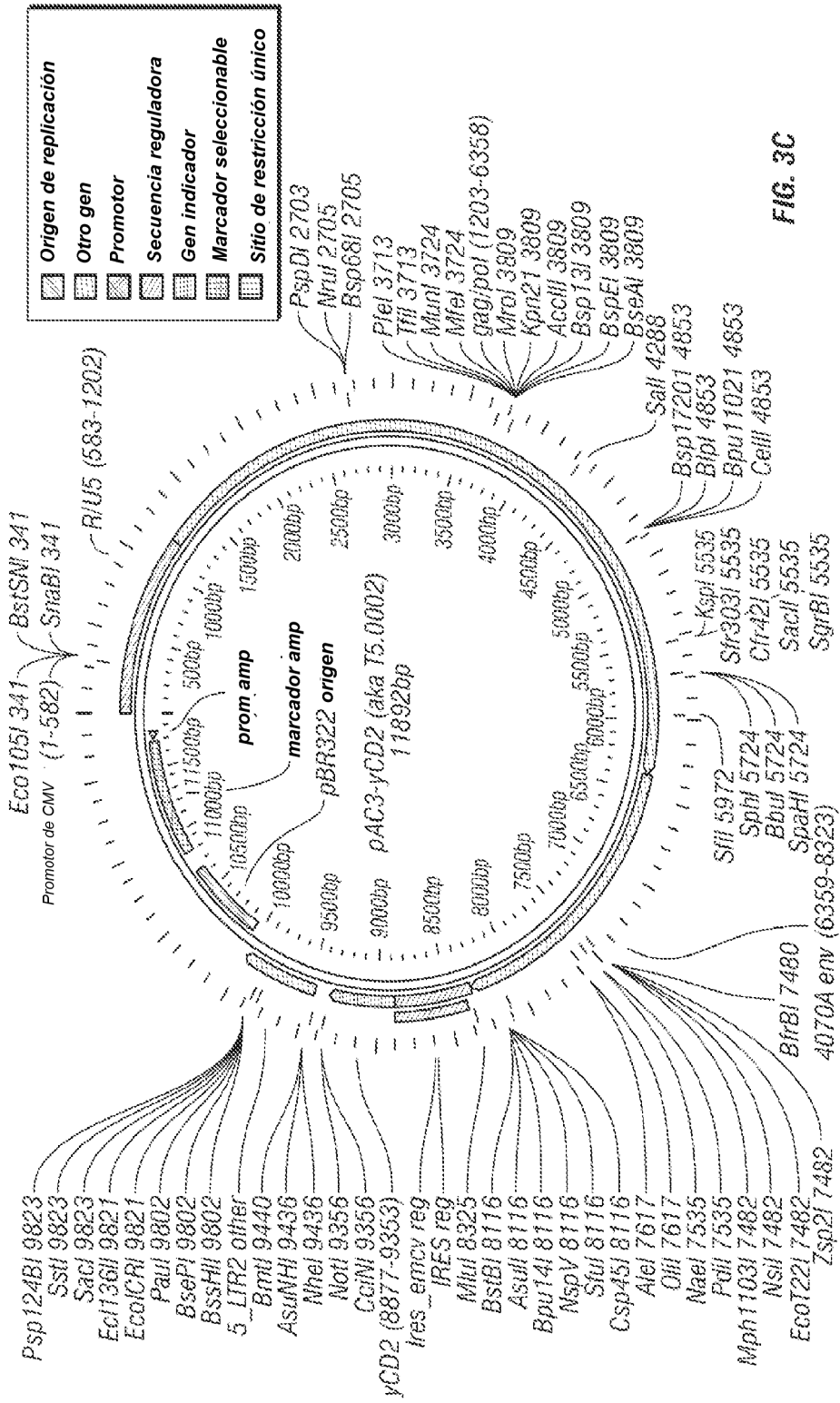


FIG. 3C

TAGTTATTAATAGTAATCAATBRGGGGTCATTAGTTCATRCCCATATATGGAGTTCGGGTTACTTAACCTTAGCGTAAAT
GGCCCGCCCTGGCTGACCCGCCAAGGACCCCGCCCTTGGACGTCATAATAGAGGTATGTCCCATAGTAAAGCCAAATAGGGA
CTTTCCATGACCTCAATGGGTGGASTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCATATGAGCTCAATGAGCETAATAAGGCCGGCTTGGCATTATTGCCCCAGTACATGACCTTATGGSACTTTCTACTTGG
CAGTACATCTAGCTATTAGTCTATCGCTATTACCATGGTGATCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGGCTGGATAAGGTTTTG
ACTCAGGGGATTTCCAGCTCTCCACCCATGGACCTCAATGGGATTTGTTTTGGCCACAAAATCAAAGGGAUTTTTCAAAA
ATGTCTAAACAATCAGCCCATTTGACGCAATGGCGGTAGCCGTSTACGGTGGGAGGTCATATAAGCAGAGGTGGTTTTA
GTGAACCGGCGCCAGTCTCCGATTTGACTGASTGCCCGGTTACCCGTGTATCCATAAACCTTCTTGCAATTGCAATCCGAC
TTGTGGTCTGGCTGTCCCTGGGAGGGTCTCTCTGAGTGTGACTACCCGTCAAGCGGGGCTCTTTTCAATTGGGGGCTGT
CCGGATCGGGAGACCCCTGCCACGGGACCAACGACCCACCACCGGAGTTTAACTGGCCAGCACTTATCTGTGTCTGTCTC
GATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGGCCCTGCTCGGTACTAGTTAGCTAAGTACTAGCTCTGTATCTGGGGACCGGTG
GTGGAACCTGAGAGTTCGGAACACCGGCGCAACCTGGGAGAGCTCCAGGACTTCGGGGCGGTTTTTGTGGCCCGAC
CTGAGTCCAAAATCCCGATCTTTTGGACTCTTTGGTGCACCCCCTTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGA
GAACCTAAACAGTTCGCCCTCCGCTGTGAATTTTGTCTTGGTTGGGACCAGAGGCGCCCGCGGCTTTGTCTCTGTC
AGCATCTTTCTGTGTGTCTCTGTCTGACTGTGTCTTCTGTATTTGTCTGAGAAATATGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAA
GTTTGGACCTTAGCTCACTGGAAGAATGTCGACGGGATCGCTCCCAACAGTCTGGTAGATGTCAGAGAAGAGAGCTTGGGTAC
CTTCTGCTCTGAGAAATGGCCAGCCTTTAACGTGGATGGCCGGGAGCGGCACTTTAACCGGAGACCTCATCACCCAGCTT
AAGATCAAGGCTTTTTCACTGGCCGATGACACCCAGACCGGTCCCACATCTGTGACTGGGAGCCCTTGGCTTTTG
ACCCCTCCCTGGCTCAAGCCCTTTGTACACCTTAGCCCTCCGCTCTCTCTCCATCCGCGCCGCTCTCTCCCCCTTGA
ACCTCTCTCTGGACCCCGCTGGATCTCTCCCTTATCCAGCCCTCACTCCCTCTAGGCGCCAAAACCTAAACCTCAAGTT
CTTTCTGACAGTGGGGGGCCCTTATCACTACTTACAGAGAGACCCCGCTTATAGGGAACCCAGAGCCACCCCTTCCG
ACAGGACCGAAATGCTGGAGAAAGCCCTGCGGGAGAGCCACCGGACCCCTCCCAATGGCATCTCGGCTACGTTGGAG
ACGGGAGCCCTGTGGGCGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCGCCCTCCGCGCAGGAGAAACGGACAGTTCCATACTGG
CCGTTCTCTCTCTGACCTTTACAACTGGAAAATAATAACCTTCTTTTCTGAAGATCCAGGTAACCTGACAGCTCTGA
TGGAGTCTGTCTCATCAACCTCAACCCACTGGGACGACTGTCAGCAGTGTGGGACTCTGCTGACCGGAGAAAGAAA
ACAACGGGTGCTCTTAGAGGCTAGAAAAGCGGTGCGGGGGAATGATGGCGGCCACTCAACTGGCCAAATGAATTCGATGCC
GCTTTTCCCTCGAGGCCCGACTGGGATTAACACCACCCAGGTTAGGAACCACTTAGTCCACTATCGCCAGTTGCTCC
TAGCCGGTCTCCAAAACCTGGGTAGAGCCCCACCAATTTGGCCAGGTAAAAGAAATAACACAAGSGGCCAATGACTCTCC
CTCGGCTTCTTAGAGGACTTAAGGAAGCCATTCGCGGTACACTCCTTATGACCTGAGGACCCCGGGCAAGAACTAAT
GTGTCTATGCTTTCATTTGGCACTCGCCCAAGACATTTGGAGAAAGTTAGAGAGGTTAGAAAGATTTAAAAACAAGAGGC
TTGGAGATTTGGTTAGAGAGCGGAGAAAAGATTTTATTAARCGAGAAACCCCGGAGAAAGAGAGCGGACCTATCAGGAGAG
AACAGAGGAAAAGAGAAACCCCTAGGACAGAGGTTGAGCAGAAAGCAAAAGAAAGATCGTAGGAGACATAGAGAGATC
AGCAAGCTATTGGCCACTGTCTTACTGGACAGAAACAGGATGACAGGGGAGGAGAGAGAGGTTCCAACTCGATCGG
ACCACTGTGCTACTGCAAGAAAAGGGCACTGGCTAAAGATTTGTCCAAAGAAACCGAGGACCTCGGGGACCAAGACC

promotor de CMV

R
U5
GT = 5'ss

gag

FIGURA 3D

CCAGAGCTCCCTCCTGACCCCTAGATGACTAGGGAGGTCAGGGTCAGGAGCCCCCCCTGAAOCCAGGATAACCCCTCAAAGTC
GGGGGCAACCCGTCACCTTCCCTGGTAGATACTGGGGCCCAACACTCCGTGCTGACCCAAATTCCTGGACCCCTAAGTGTATA
AGTCTGCCCTGGGTCCAAAGGGCTACTGGAGGAAAGCGGTATCGCTGGACCACGGATCGCAAAGTACATCTAGCTACCGGTAA
GGTCAACCCACTCTTTCTCCATGTACACAGACTGTCCCTATCCTCTGTTAGGAAGAGATTTGCTGACTAAACTAAAAGGCCAA
ATCCACTTTGAGGGATCGAGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGACCCCTAAATATACRAGATG
AGCATCGGTACATGAGACCTCAAAGAGCCAGATGTTCTCTAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTCTCAGGCTGGGC
GGAAACCGGGGATGGGACTGGCAGTTGGCCAGGCTCCTCTGATCATACTCTGAAAGCAACCTCTACCCCGTGTCCATA
AAACATAACCCCATGTCAACAGAACCCAGACTGGGGTCRAGCCCCACATACAGAGACTGTGGACCCAGGGATACTGGTAC
CCTGCCAGTCCCCCTGCAACACCCCTGCTACCCGTTAAGAAAACAGGGACTAATGATTAAGCCCTGTCCAGSATCTGAG
AGAAGTCAACAAGCGGTGGAAGACATCCACCCACCCGTGCCAACCTTACACCTCTTGAGCGGGTCCACCGTCCAC
CAGTGGTACACTGTGCTTGATTAAAGGATGCCCTTTTCTGCTHAGAATCCACCCACAGTCCAGCCTCTCTCGCTTTG
AGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAAATGACCTGGACCCAGACTCCACAGGGTTTCAAAGACAGTCCACCC
GTTTGATGAGGCACTGCACAGACCTAGCAGACTTCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTAGTGGATGAC
TTACTGCTGGCCGCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTCGGGCCCTGTEACAAACCTTAGGAAACCTCGGATC
GGCCCTCGGCCAAGAAAGCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAGAGGGTCAAGATGGCT
GACTGAGGCGAGAAACAGACTGTGATGGGGCGCTACTCCGAGACCCCTCGACAACTAAGGATTCCTAGGAGGGCA
GGCTTCTGTGGCTCTGGATCCCTGGGTTTCAGAAATGGGACCCCTTGTACCCCTCTACCAAACGGGGACTCTGTTA
ATTTGGGGCCAGACCAACAAAGGCTATCAAGAAATCAAGCAGGCTCTCTAACCTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATT
GACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTUGACAGAAAGCGGCTACGGCAAGGTGTCTAACGCCAAAACCTGGGACTTTGGGT
CGGCCGCTGGCTAOCCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTACAGCTGGGTGGCCCTTGCCTAGGGATGGTAGCAGCCATTG
CCCTACTGACAAAGGATGCAAGCCAGGTAACCATGGGACAGCACATGCTCATTCTGGCCCCCATGCASTASAGGCACTAGT
CAAACAAACCCCGACCGCTGGCTTTCCAAAGCCCGGATGACTCACTATCGGGCTTGGCTTTGGACACGGACCGGTCCAG
TTGGGACCGGTGCTAGCCCTGAACCCGGCTACCTGCTCCCACTGCTHAGGAAGGGCTGCACACAACTGCTTERTATCC
TGGCCGAAACCCACGGAAACCGACCCGACCTAACGGACACGCCCTCCAGACGCCAACACACTGTTACACGATGGAAAG
CAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGCCGGACCTCGGTCACACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAAAGCCCTGCCA
GCCGGGACATCCGCTCAGCGGGTGAAGTATAGCACTCACCCAGGCCCTAAAGATGGCAGAGGTAAGAACTAAATGTTT
ATACTGATAGCCGTATGCTTTTCTACTGCCCCATATCCATCGAGAAATATACAGAGGCCCTGGGTTGCTCACAACAGAGG
CAAACAGATCAAATAAAGACAGATCTTTGGCCCTACTAAAGGCCCTCTTTCTGCCAAAGACTTAGCATAAATCCATTGT
CCAGGACATCAAAGGGACACAGCGCGAGGCTAAGGGCAACCGGATGGCTGACCAAGGGCCCGAAAGGCAGCATCACAG
AGACTCCAGACACCTCTACCCCTCTCATAGAAAATCATCACCCCTACACCTCAGAACATTTTCATTAACCACTGACTGATAT

[po]

FIGURA 3D (Cont.)

AAAGGACCTAACCAAGTTGGGGGOCATTTATGATAAACAAGAAAGTATTGGGTCACCAAGGAAAACCTGCTGATGCOOTGAC
CAGCTTACGTTTGGAAATATAGACCTTCTTCACTCAGCTGACTCACCTCAGCTTCACAAAATGAAAGGCTCTCCCTAGAGAGAA
GCCACAGTCCCTACTACATGCTGACCCGGGATCGAGACCTCAAAAATAATCAGCTGAGACCTGCAAAAGCTTCTGCTCAAGTCAA
CCTCCAGCAAGTCTGGCCCTAAACAGGCAACTAGGGTCCCGCCGCAATCCGCTCCGCTACCTATGAGAGATCCGATTTCCACCGAG
ATAAAAGCCCGGATTTGCTATAAAATATCTTCTAGTTTATATAGATACCTTTCTGCTGGCTGGATGAGAAAGCTTCCCAAGCA
AGAAAGAAACCCCAAGCTCTAACCAGCAAGCTACTAGAGGAGATCTTCCCGAGGTTCCGCAATCCCTCAGGATATGGCGAC
TGACAAATGGGCTGCTTCTCCAAAGGTGAGTTCAGACAGTGGCCGATCTGTTGGGGATTGATTGGAAATTAACATTTGCA
TACAGRCCCAAGGCTCAGGCCAGGTGAGAAGAAATGAAATAGAACATCAGAGGAGACTTAACTAAATTAACGCTTGGCAACTG
GCTTAGAGACTTGGTCTCTACTCCCTTAGCTCTGACCGAGCCGCAACACGCTGGGCTCCCTATGGCTCTACCCCTATA
TGAGATCTTATATCGGGCAACCCCGCCCTTCTAAACTTCCCTCAACCTGACATGACAGACTTACTAAGCAGCCCTCTCTC
CAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTACTCTAGCAGCAGAACTCTGGAGACCTCTGGCCGAGCTTACCAAGAACTACTGGACC
GACCGGCTGCTACTCAGCTTACCGAGTGGCCGACAGTGTGGGGTCCCGGACACCCAGACTAAGAACTTAGAACCTTGCCTG
GAAAGGACCTTACACAGTCTCTGCTGACACCCCTCCAGCCCTCAAAGTAGACGGCTTGGAGCTTGGATACAGCCGCGCCAC
GTGAAGGCTGCGACCCCGGGGCTGGACCACTCTCTAGACTGACCTGGCGCTTACAGCTCTCAAACCCCTCAAGATAA
GATTAACCGGTGAAGCCCTTAATAGCTATGGAGGCTCTGTTAGAGATAGGGATGGCAGAGAGCCCTCATCAGGCTTTTAAAT
GTAACCTGGAGACTCACCAACTGATGACTGGGGTACCGCCAAATGCCACCTCCCTCTGGGACTGTACAGATGCOCTTCC
CAAAATTAATTTTGGATCTATGAGATCTGGTGGGAGGAGGAGTGGGACCTTCAGACCCAGGAACTGATGTTGGGATGGCTG
CAAGTCCCTCCGAGGGGAGCAGCGGACCCCGACTTTTGACTTTTACGTTGGCTCTGGGCTATCCGTAAGTCCGGGCTGGG
GGACAGGAGAGGCTACTCTGGTAAATGGGGTGTCAAAACCTCGACAGCTTACTGCAAGCCACATCTATCTGGGAC
TAATCTCCCTTAAAGCCGGTAACTCCCTGGGACAGGGATGCTCTAAAGTTGCCCTGGCTCCCTGCTACAGCTCTCTCAA
AGTAATCCAAATCTCTCAAGGGGCTACTCTGAGGGGCGAGATCAAAACCTCTAGTCTTACATTCAGCTGCAAGGAAAGAA
GCTAACTGGGAGCCCAAAATCTGGGGCTGAGACTGTACCGGACAGGAAACAGATCTTATACATGTTCTCTCCCTGACCC
GGCAGGCTCTTAATGTTGGGACCCGAGTCCCTTAGGGCCCAACCCAGATTTACCCGACCAAGAGACTCCCTTCCCTCAACAT
AGAGATTTTACGGCTCCACAGCCACTAGCCCTCCCAATACAGTATACCCCTCTTCCACTACAGTACACCTTCAACCTCC
CTTACAGTCCAAGTCTCTACAGCCACTCCCGGACTGAGATAGACTACTAGTCTTACTAGTCAAAGGAGCCCTATCAGGGCT
TTAACTCACCAAATCCGACAGGACCAAGAAATGTTGGCTGCTCTAGTCTGGGACCTCTTATTAAGAGGATGAGCGGT
CTGGGGACTTATACCAATCATCTCCCGCTCCCGGCAACTGTACGGCCACTTCCCAACATAAGCTTACCTATCTGAGAGT
ACAGGACAGGGCTTATGATGGGGGAGTACTTAAACTCACCAGGCTTATGTAACACCCCAAGGCGCCGCTCTGGAT
CTACTACTCTGACAGCACCCCGGAAACAAGTGGGCTTGCACCACTGGATGACTCCCTGCTTGCACCAAGGCTCTCAA
CTCAACACAGATTTATGTTAGTTAGTTCAACTCTGCCCCAGAGTAAATTTACACTCCCCGATTAATGATGTTGCTGAGCTT
GAAAGGCTTACCAAAATAAAAGACAGCCAGTATCACTGACCTTGGCCCTTCTACTAGCAGATTAACCATGGGAGGCTTCT
CAGCTGGAATAGGACAGGCGACACTGCTTAAATTAAAACCCAGCAGTTTGGAGGCTTCACTCCCGCTATCCAGACAGACT
CAACGAGTCAAAAAGTCAATTAACCACTTAGAAAAGTCACTGACCTCTGTTGCTGAGTACTCTTACAGAACCCGAGAGCC
CTAGATTTGCTATTTCTAAAGGAGGAGGCTCTTGGCAGCCCTTAAAGAAAGATGTTGTTTTTATGAGACCCACAGGGCC
TAGTGGAGACAGCAGTGGCTTAAATTAAGAGAAAGGCTTAAATCAGAGACAAAAGCTATTTGAGACAGCCAGGATGGTCTGA
AGGCTCTTTAATAGATCCCTGCTTACCACTTACTCTCCACATCATGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTA
CTTTTGGACTTTCATTTCTCAAATGATTTGGCCAAATTTCTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTGGACTC
AGCAATATCACAGCTTAAACCCATAGAGTACAGCCATGACCCGTTACTGGCCGAGCCCTTCCATTAAGCCCGGCTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACATAATGGCTTTTGGCAATGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGCTCTTTGAC
GAGCATCTTACGGGCTTTTCCCTCTCGCCAAAGCAATGCAAGCTCTGTTGAATGCTGTAAGGAAAGCACTTCTCTGCA
GCTCTTGAAGCAAAACAGCTCTGAGCCACTTTTCCAGGACAGGCAACCCCTCCACTGGGACAGGCTGCTCTGCGGCT
AAAAGCCAGGTTATAGATACCTTGCAAAGGGGCAACCCAGTGGCAGGTTGAGTGGATAGTGTGGAAAGAGT
CAATGGCTCTCTCAGCTATTTCAACAAGGGGCTGAAAGGATGCCAGAAAGTACCCATTTGATGGGATCTGATCTGGGG
CTCTGGTGCATGCTTTACATGTTGTTGCTGAGGTTAAAABACSTCTAGGCCCCCGAACCCAGGGGACGTTGGTTTCC
TTTGA AAAACAGS [TATAA]TGGCTGACCCCGGGATGGCTCTCAAGTGGATCAAAAAGGCAATGGATATCTCTTACAGCA
GGCTCTGCTGGCTTACAGGAGGGCTGGCTGCTTCTGAGTCAACCAAGGACGGCAGTCTCTGCGCAGG
GGCCACAACATGAGSTTCCAGAGGCTTCCCGCACCTTCCAGCGGAGATCTCCACCTGAGCAACTGTGGAGCTTGGAGG
GCAAGGTTAGAGGACACCTCTGACACCCCTGCTCCCTGTTGACATGTTGACTGGGCTTACATGATGATGAGGAT
CCCTAGGCTGCTGCTGCGGAGACCTGAACTTCAAGTCCAAAGGGGAGAGATACCTCAAAACAGGCGCCAGAGGCTG
GTTGTTGAGGTTGAGGCTGATGAGAGCTTCAATGAGGAGGCTCAGGACTGGTTGAGGAAATCGGGC

AGI = 3'ss

4070A env1

Mut1

SMCV IRES1

P51T

yCD2

FIGURA 3D (Cont.)

ES 2 609 336 T3

Promotor de CMV (1-582)>>>

|

1 TAGTTAATTAATAGTAAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG 60
ATCAATAAATTAATCATTAGTTAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGC

61 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGGCCATT 120
GCAATGTATTGAATCCCATTTACCGGGCGGACCGACTGGCGGGTTGCTGGGGCGGGTAA

121 GACGTCATAAATGACGTATGTTCCCATAGTAAAGCCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA 180
CTGCAGTTATTAATGACATACRAGGGTATCATTCGCGTTATCCCTGAAAGCTAACTGCACT

181 ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 240
TACCCACCTCAATAATGCCATTTGACGGGTGAACCCATGTTAGTTCACATAGTATACGG

241 AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATCACGGTAAATGCCCCGCTGGCATTTATGCCAGTA 300
TTCATGCGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCGGGCGAACCATAATACGGGTCAAT

Eco105I
|
SnaBI
|
BstSNI
|

301 CATCACCTTATGCGCACTTTCCTACTGCGCAGTACATCTACCTATTACTCATTCGCTATTAC 360
GTACTGGAATACCCCTGAAAGGATCAACCGTCAATGTAGATGCATAATCAGTAGCGATAATG

361 CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAGCGGG 420
GTACCACTACGCCAAAACCGTCAATSTAGTTACCCGCACCTATCGCCAACTGAGTGCCCC

421 ATTTCCAAGTCTCCACCCCAATGACGTCAATGGCAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACG 480
TAAAGGTTTACAGAGGTGGGTAACTGCAGTTACCCCTCAAACAAAACCGTGGTTTTAATGTC

481 GCACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGT 540
CCTGAAAGCTTTTACAGCAATGTTGAGGCGGGTAACTGCGTTTACCGCCATCCGCACA

Región R (583-650)>>>

|

541 ACCGTTGGGAGGTCTATATAAGCACAGCTGCTTTAGTGAACCGCGCCCACTCCTCCGATTG 600
TGCCACCCCTCCAGTATATTCGTCTCGACCAAATCACTTGGCGGGTCCAGGAGGCTAAC

FIGURA 3E

ES 2 609 336 T3

05 región (651-1202)>>>

|

601 ACTGAGTCGGCCGGGTACCCGTTGATCCAAATAAACCCCTCTTGCASTTGCATCCGACTTGT 660
TGACTCAGCGGGCCCATGGGCACATAGCTTATTTGGGAGAACGTCACCGTAGGCTGAACA

661 GGTCTCGCTGTTCCTTEGGAGGGTCTCCTCTGAGTGTATTGACTACCCGTGAGCGGGGGTC 720
CCAGAGCGACAAAGGAACCCCTCCAGAGGAGACTCACTAATCTGATGGGCAGTCGCCCCAG

721 TTTCAFTTGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCACCA 780
AAACTAAACCCCGAGCAGGCCCTAGCCCTCTGGGGACGGGTCCCTGGTGGCTGGGTGGT

5' SS (758)

|

781 CCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTCTCTGTCGGATTGCTAGTGTCTATGAC 840
GGCCCTCCATTEGACCGGTGCTTGAATAGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACGT

841 TGATTTTATGCGCCTGCTCGGTACTAGTTAGCTAAGTACTAGCTCTGTATCTGGCGACCCG 900
ACTAAAATACCGCGACCCAGCCATGATCAATCGATTGATCGAGACATAGACCGCCGGGC

901 TGGTGGAACTGACGAGTTCGGAAACCCCGGCCCAACCCCTGGGAGACGTCGCCAGGGACTT 960
ACCACCTTGACTGCTCAAGCCTTGTGGCCGGCGTTGGGACCTCTGCGAGGGTCCCTGAA

961 CGCGGGCCCTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCAAAAATGCCGATCGTTTTGCACTCTTTG 1020
GCCCCCGSCAAAAACACCGGGCTGGACTCAGGTTTTTAGGGCTAGCBAACCTGAGAAAC

1021 GTGCACCCCTCTTAGAGGAGCGATATCTGGTTCGTGGTAGGAGACGAGAACCTFAAACAGT 1080
CNCCTGGGGGGAATCTCTCCCTATACACCAAGACCAATCCTCTGCTCTTGGATTTCTCA

1081 TCCCGCCTCCGTCTGAAFTTTTGGCTTTCGGTTCGGGACCGAAGCCGGCCGGCGGTCTTG 1140
AGGGCGGAGGCAGACTTAAAAACGAAAGCCAAACCCCTGGCTTCGGCGGGCGGGGAGAAC

1141 TCTGCTGCAGCATCGTTCTGTSTCTCTCTCTGACTGFTTTCTGTATTTCTCTGAGA 1200
AGACGACGTCCTAGCAAGACACACAGACAGACTSACACAAAGACATRAACAGACTCT

gag (1203, 2819)>>>

|

1201 ATATGGCCDAGACTGTTAACACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACCTGGAAAGATGTCG 1260
TATACCCGGTCTGCAATGCTGAGGGAAATCRAACTGGATCCACTGACCTTTCTGACAGC

1261 AGCGGATGCTCACAAACCAGTCCGTAGATGTCAGAGAGAGAGCTTGGGTTACCTTCTGCT 1320
TCGGCTAGCGAGTGTGGTCTGACCCTCTACAGTTCCTCTGCAACCCATGGAGAGCGA

1321 CTGCAGATGGCCACCTTTAAGCTCGGATGCGCCGGAGACCCACCTTTAACCCGACACC 1380
GAGCTCTTACCGGTTGGAAATTCAGGCTTACCGGCGTCTGCGCTGGAAATGGCTCTGG

1381 TCATCACCCAGGTTAAGATCRAGGCTTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCCGG 1440
AGTAGTGGGTCCAAFTCTAGTTCCAGAAAAGTGGACCGGGGCTACCTGTGGGTCTGGTCC

1441 TCCCTTACATGCTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGAACCCCTCCCTGGGTCAAGCCCT 1500
AGGGGATGTAGCACTGGACCTTTGGAAACCGAAAACGGGGGGAGGGACCCAGTTGGGA

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

1501 TTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCCCTTGAAC 1560
AACATGTGGGATTCGGAGGCCGGAGGAGAAGGAGGTAGCCGGGGCAGAGAGGGGAACTTG

1561 CTCTCTGGTTTGGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGGG 1620
GAGGAGCAAGCTGGGGCGGAGCTAGGAGGGAAATAGGTGGGGAGTGAGGAAGAGATCCGC

1621 CCAAACTTAAACCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGCCGCTCATCGACCTACTTTACAG 1680
GGTTTGGATTTGGAGTTCAAGAAAGACTGTCACCCCCGGGAGTAGCTGGATGAATGTC

1681 AAGACCCCCCGCTTTATAGGSAOCCAAAGACCACCCCTTCCGACAGGGACGGAAATGGTG 1740
TTCTGGGGGGCGGAATATCCCTGGGTTCBETGGGGGAAGGCTGTCCCTGCCTTTACCCAC

1741 GAGAAGCGGACCCCTGGGGGAGAGGCCACCGACCCCTCCCAATGGCATCTCGCTACGTG 1800
CTCTTCGCTGGGGACGCCCTCTCGTGGCTGGGGAGGGGTACCGTAGAGCGGATGCAC

1801 GGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCOCCCTCCGGCCAG 1860
CCTCTGCCCTCGGGGACACCGGCTGAGGTGATGGAGCGTCCGTAAGGGGGAGGGCCGTC

1861 GAGGAAACGGACAGCTTCAATACTGGCCSTTCTCCTTCTCTGACCTTTACAACCTGGAAAA 1920
CTCCTTTGCCTGTGGAAGTTATGACCGGCAAGAGGAGAAGACTGGAAATGTTGACCTTTT

1921 ATAATAACCCCTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTAAACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTTC 1980
TATTATGGGAAGAAAAAGACTTCTAGGTCATTTGACTGTGAGACTAGCTCAGACAAG

1981 TCATCACCCATCAGCCACCTGGGAGGACTGTGAGCAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCG 2040
AGTAGGGGTAGTCGGGTGGACCCTGCTGACAGTCCCTCGACAACCCCTGAGACGACTGGC

3121 ACTTTGAGGGATCAGGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGTA 3180
TGAAACTCCCTAGTCCCTCGGGTCCAAATACCTGGGTTACCCCTCGGGGACGTTCAACAAT

3181 CCCATAATATAGAAGATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240
GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAAGAG

3241 TAGGCTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCCCTGGGGGAAACCGGGGGCATGGGAC 3300
ATCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCGCTTTTGGCCCCGTACCCCTG

3' SS (3314)

3301 TGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACTCTGAAAGCAACCTCTACCCCGTGTCCA 3360
ACCGTCAGCGGTTCCGAGGAGACTAGTATGSAGACTTTCCTTGGAGATGGGGGCACAGGT

3361 TAAACAATACCCCATGTCACAAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGAC 3420
ATTTTGTATGGGSPACAGTGTCTTCCGGTCTGACCCCTAGTTTGGGGTGTATGTCTCTG

3421 TGTGGACACAGGGAATACTGGTACCTGCCAGTCCOCCCTGGAACAGCCOCCGTGCTACCG 3480
ACAACCTGGTCCCTTATGACCATGGGACGGTCCAGGGGACCTTGTGGGGGACGATGGCC

3481 TTAAGAAACCAGGGACTAATGATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCAACAAGC 3540
AATTCCTTGGTCCCTGATTACTAATAATCCGGACAGGTCCCTAGACTCTCTTCAGTTGTTCC

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

3541 GGGTGGGAAGACATCCACCCACCGTGCCCAACCCTTACACCTCTTGAGGGGGCTCCCAC 3600
 CCCACCTTCTGTAGGTGGGGTGGCACGGGTTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCGAGGGTG

3601 CGTCCCACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCTTTTTCTGCCTGAGACTCC 3660
 GCAGGGTGGTCACCATGTGACACCAACTAAATTTCCCTACGGAAAAAGACGGACTCTGAGG

PfeI
 |
 TfiI
 |

3661 ACCCCACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720
 TGGGGTGGTCAGTCGGAGAGAAGCGGAAACTCACCTCTCTAGGTCTCTACCCCTTAGAGTC

MfeI
 |
 MunI
 |

3721 GACAATFGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTGATG 3780
 CTGTTAACTGGACCTGGTCTGAGGGGTGTCCCAAAGTTTTTGTGAGGGTGGGACAAACTAC

MroI
 |
 BseAI
 |
 Bsp13I
 |
 BspEI
 |
 Kpn2I
 |
 AccIII
 |

3781 AGGCACFGCACAGAGACCTAGCAGACTTCGCGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTAC 3840
 TCCGTGACGTGTCTCTGGATCGTCTGAAGGCCTAGGTGCTGGGTCTGAAC TAGGACGATG

3841 AGTACGFGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTC 3900
 TCATGCACCTACTGAAFGACGACCGGGGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCATGAG

3121 ACTTTGAGGGATCAGGAGCCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGTA 3180
 TGAACCTCCCTAGTCTCTGGGTCCAAATACCTGGTTACCCCGTGGGGACGTTCCAACT

3181 CCCTAAATATAGAAGATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240
 GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAGAG

3241 TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCCTGGGCGGAAACCGGGGGCATGGGAC 3300
 ATCCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCGCCTTTGGCCCCCGFACCTG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3



FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

3841 AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTC 3900
 TCATGCACCTACTGAATGACGACCGCGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCCTGAG

3901 GGGCCCTGTTACAAACCCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCCTCGGCCAAGAAAGCCAAA 3960
 CCGGGACAAATGTTTGGGATCCCTTGGAGCCATAGCCCGAGCCGGTTCTTTCCGGTTTT

3961 TTTGCCAGAAACAGGTCAACTATCTGGGSTATCTTCTAAAAAGAGGTCAGAGATGGCTGA 4020
 AAACGGTCTTTGTCCAGTTCATAGACCCCATAGAAGATTTTCTCCAGTCTCTACCGACT

4021 CTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGSCAGCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACATA 4080
 GACTCCGGTCTTTCTCTGACACTACCCCGTCGGATGAGGCTTCTGGGGAGCTGTTGATT

4081 GGGAGTTCCCTAGGGACGGCAGGCTTCTGTGCGCTCTGGATCCCTGGGTTTGCAGAAAATGG 4140
 CCTCAAGGATCCCTGCCGTCCGAAGACAGGGAGACCTAGGGACCCAAACGCTCTTTACC

4141 CAGCCCCCTTGTACCCCTCTCACCAAAAACGGGACTCTGTTTTAATGGGGCCAGACCAAC 4200
 GTCCGGGAACATGGGAGACTGGTTTTGCCCTGAGACAAAATAACCCCGGCTCTGGTTG

4201 AAAAGGCCATATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGTTGCCAG 4260
 TTTTCCGGATAGTCTTTAGTTGCTTCGAGAAAGATTGACGGGGTCCGGACCCCAACGGTC

S_{al}I
 |

4261 ATTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTGCGACGAGAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCC 4320
 TAAACTGATTCGGGAAACTTGAGAAACASCTGCTCTTCGTCCGATGCGGTTTTCCACAGG

4321 TAAGCAAAAAAGCTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAAGCTAGACC 4380
 ATFGCGTTTTTTGACCCCTGGAACCCGACCCGGCCACCGGATGGACAGGTTTTTCGATCTGG

4381 CAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGCTAGCAGCCATTGCCGTACTGACAA 4440
 GTCATCGTCGACCCACCGGGGAACGGATGCTTACCATCGTCGGTACCGGCATGACTGTT

4441 AGGATGCAAGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCAATCTGGCCCCCATGCAGTAG 4500
 TCCTACGTCCGTTGATTTGGTACCTGTGCTGATCAGTAAGACCGGGGGGTACGTCATC

4501 AGGCACTAGTCAAACAACCCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCCGGATGACTCACTATC 4560
 TCCGTGATCAGTTTTGTTGGGGGGCTGGCGACCGAAAGGTTGCGGGCCTACTGAGTGATAG

4561 AGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCCGACCGGTTGGTAGCCCTGAACCCGG 4620
 TCCGGAACGAAAACCTGTGCTTGGCCAGGTCGAGCCTGGCCACCATCGGGACTTGGGCC

4621 CTACGCTGCTCCCACTGCTGAGGAAGGGCTGCAACACAACCTGCTTGATATCCTGGCCG 4680
 GATGCGACGAGGTTGACGGACTCTTCCCGAOGTTGTGTTGACGGAACTATAGGACCGGC

4681 AAGCCACCGAACCAGCCGACCTAACGGACCGCTCCAGACCGCCGACCCACACCT 4740
 TTCGGGTGCTTGGCTGGCTGGATTGCTGCTGCTGCGGAGGCTCTGCGGCTGCTGTGGA

4741 GGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGGGGGAGCTGCGSTGA 4800
 CCATGTGCTACCTTCGTCAGAGAATGTTCTCCCTGTCGCATTCGGCCCTCGACCGCACT

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

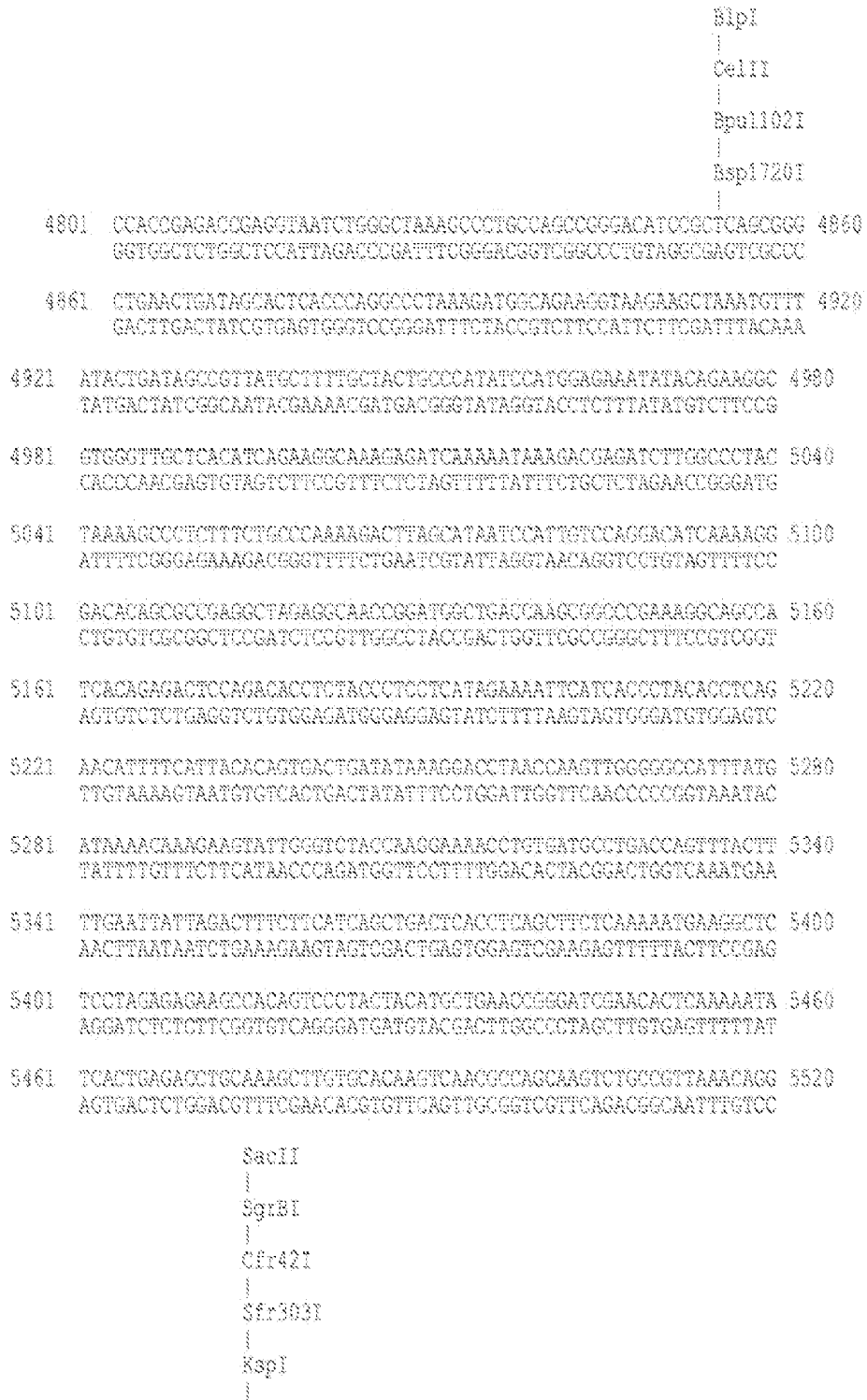


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

5521 GAACTAGGGTCCGCGGGCATCGGGCCCGGCACTCATTGGGAGATCGATTTCAACCGAGATAA 5580
 CTTGATCCCAGGCGCCCGTAGCCGGGCCGTGAGTAACCCCTCTAGCTAAAGTGGCTCTATT

5581 AGCCCCGATTGTATGGCTATAAAATATCTTCTAGTTTTTATAGATAACCTTTTCTGGCTGGA 5640
 TCGGGCCTAACATACCGATATTTATAGAACATCAAAAATATCTATGGAAAAGACCGACCT

5641 TAGAAGCCTTCCCNACCAAGAAAGAAACCGCCAAAGGTCGTAAACCAAGAGCTACTAGAGG 5700
 ATCTTCGGAAGGGTTGGTTCTTTCTTTGGCGGTTCCAGCATTGGTTCTTCGATGATCTCC

PaeI
 ↓
 BbuI
 ↓
 SpaHI
 ↓
 SphI
 ↓

5701 AGATCTTCCCAGGTTCCGCATGCCTCAGGTATTGGGAACGACAAATGGGCTGCCTTTCG 5760
 TCTAGAAAGGGTCCAAGCCGTACGGAGTCCATAACCCCTGACTGTTACCCGGACGGGAAGC

6901 CTTCCAAGGGGCTACTCGAGGGGGCAGATGCAACCCCTCTAGTCCCTAGAAATCACTGATGC 6960
 GAAGGTTCUCCCGATGAGCTCCCCCGTCTACGTTGGGAGATCAGGATCTTAAGTACTACG

6961 AGGAAAAAAGGCTAACTGGGACGGGCCAAATCGTGGGGACTGAGACTGTACCCGGACAGG 7020
 TCCFTTTTTCCGATTGACCCTGCCCGGGTTTAGCACCCCTGACTCTGACATGGCCTGTCC

7021 AACAGATCCCTAATTACCATGTTCTCCCTGACCCGGCAGGTCCTTAATGTGGGACCCCGAGT 7080
 TTGTCTAGGATAAATGGTACAAGAGGGACTGGCCGTCAGGAATTACACCCCTGGGGCTCA

7081 CCCCATAGGGCCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAAGACTCCCTTCCCTCACCAATAGAGAT 7140
 GGGGTATCCCGGGTTGGGTCAFAATGGGCTGGTTTCTGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141 TGTACCGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTCAATACCAGTTACCCCTTCCACTACCAG 7200
 ACATGGCCGAGGTGTCCGTGGATCGGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGAAGGTGATGGTC

7201 TACACCCCTCAACCTCCCTACAAGTCCAAGTGTCCACAGCCACCCCTAGGAACCTGGAGA 7260
 ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTGAGGTTCCACAGGGTGTGGTGGGGTCCCTTGACCTCT

7261 TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACCTCACCAATCCCGACAA 7320
 ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCCCTCGGATAGTCCGCGAATGGAGTGGTTAGGCCTGTT

7321 GACCCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCCGGACCTCCTTAFTAAGGAAGGAGTAGCGGT 7380
 CTGGGTTCTTACAACCGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCCCTCATCGCCA

7381 CGTGGGCACTTATACCAATCAATCCACCGCTCCGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440
 GCACCCGTGAATATGGTTAGTAAGGTGGCGAGGCCGTTGACATGCCGCTGAAGGCTTGT

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

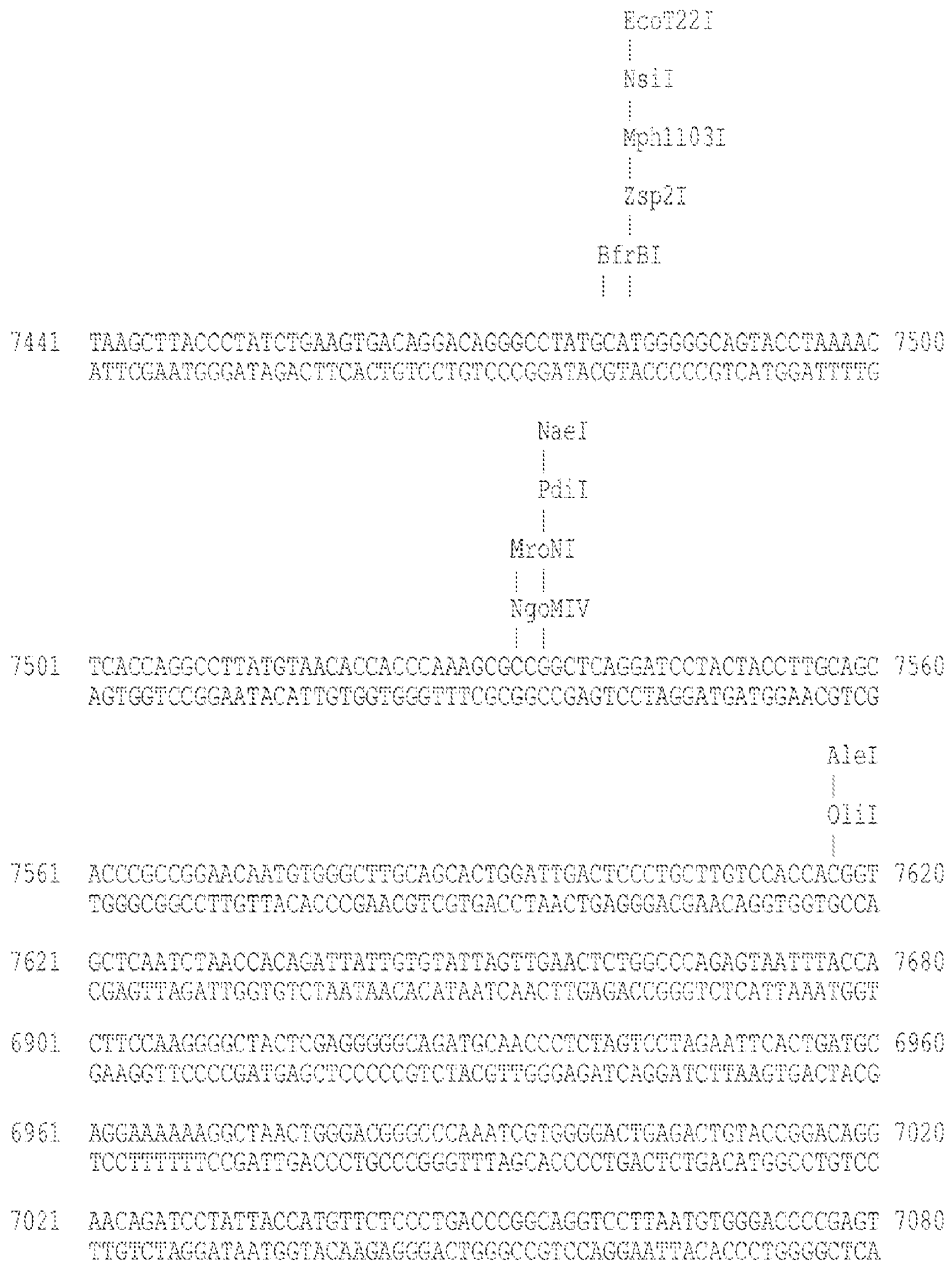


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

7081 CCCCATAGGGCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAAGACTCCCTTCCTCACCAATAGAGAT 7140
 GGGGTATCCCGGGTTGGGTCATAATGGGCTGGTTCCTGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141 TGTACCGGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTUAATACCAGTTACCCCCCTCCACTACCAG 7200
 ACATGGCCGAGGTGTCGGTGGATCGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGGAAGGTGATGGTC

7201 TACACCCTCAACCTCCCCFACAAGTCCAAGTGTCCCACAGCCACCCCCAGGAAC TGGAGA 7260
 ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTCAAGTTTACAGGGTCTCGGTGGGGGTCCTTGACCTCT

7261 TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCCTATCAGGCGCTTAACCTCACC AATCCCGACAA 7320
 ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCCTCGGATAGTCCGCGAAT TGGAGTGGTTAGGGCTGTT

7321 GACCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTGGGACCTCCTTATTACGAAGGAGTAGCGGT 7380
 CTGGGTCTTTACAACCGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCCTCATCGCCA

7381 CGTGGGCACTTATACCAATCATTCCACCGTTCGGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440
 GCACCCGTTGAATATGGTTACTAAGCTGGCGAGGCCGCTTGACATGCCGGTGAAGGGTTF

EcoT22I
 |
 NsiI
 |
 Mph1103I
 |
 Zsp2I
 |
 BfrBI
 | |

7441 TAAGCTTACCCCTATCTGAAGTGCACAGGACAGGGCCATGCAATGGGGCAGTACCTAAAAC 7500
 APTCGAATGGGATAGACTTCACCTGTCCTGTCCCGGATACGTACCCCGTTCATGGATTTG

NaeI
 |
 PdiI
 |
 MroNI
 | |
 NcoMIV
 | |

7501 TCACCAGGCCTTATGTAACACCACCCAAAGCGCCGCTCAGGATCCTACTACCTTSCAGC 7560
 AGTGGTCCGGAAATACATCTGGTGGGTTTCGGCGCCGAGTCTTAGGATGATGGAACGTCG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

```

                                                                 AleI
                                                                 |
                                                                 OIII
                                                                 |
7561 ACCCGCCGGAACAATGTGGGCTTGCAGCACTGGATTGACTCCCTGCTTGTCCACCACGGT 7620
    TCGGGGGCCCTTGTACACCCGAACGTCGTGACCTAACTGAGGGACGAACAGGTGGTGCCA

7621 GCTCAAFTCAACCACAGATTATTGTGTATTAGTTGAACTCTGGCCCACAGTAATTTACCA 7680
    CCAGTTAGATTGGTGTCTAATAACACATAATCAACTTGAGACCCGGTCTCATTAAATGST

7681 CTCCTCCGATTATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAAATATAAAAAGAGAGCCAGT 7740
    GAGGGGGCTAATATACATACCAGTCGAACCTTGTCCGATGGTTTATATTTCTCTCGGTC

7741 ATCATTGACCCIGGCCCTTCTACTAGGAGGATTAACCATGGGAGGGATTGCAGCTGGAAT 7800
    TACTAATCGGCACCGGGAAGATGATCCTCCTAATTGGTACCCCTCCCTAACGTCGACCTTA

7801 AGGGACGGGGACCACTGCCTTAATTAACCCAGCAGTTTGAGCAGCTTCATGCCGGTAT 7860
    TCCTGCCCTGCTGACGGAAATTAATTTTTGGGTGGTCAAACCTCGTCCGAGTACGGCGATA

7861 CCAGACAGACCTCAACGAAGTCGAAAAGTCAATTACCAACCTAGAAAAGTCACTGACCTC 7920
    GGTCTGTCTGGAGTTGCTTCAGCTTTTCAGTTAATGGTTGGATCTTTTCAGTGACTGGAG

7921 GTTGTCTGAAGTAGTCTACAGAACCCGAGAGGCCTAGATTTGCTATTCCCTAAAGGAGGG 7980
    CAACAGACTTCATCAGGATGCTTTGGCGTCTCCGGATCTAAACGATAAGGATTTCCFCCC

7981 AGGTCTCTGCCAGCCCTAAAAGAAGAATGTTGTTTTTATGCAGACCACACGGGGCTAGT 8040
    TCCAGAGACCGSTCGGGATTTTCTTTTACAACAAAAATACGTCTGGTGTGCCCCGATCA

8041 GAGACACAGCATGGCCAAATTAAGAGAAAGGCTTAATCAGAGACAAAAACTATTTGAGAC 8100
    CTCTCTGTGGTACCGGTTTAATTTCTCTTTCCGAATTAGTCTCTGTTTTTGATAAACTCTG

                                                                 NspV
                                                                 |
                                                                 BstBI
                                                                 |
                                                                 Bsp119I
                                                                 |
                                                                 AseII
                                                                 |
                                                                 Csp45I
                                                                 |
                                                                 SfuI
                                                                 |
                                                                 Bpu14I
                                                                 |
                                                                 BspT104I
                                                                 |
8101 AGGCCAAGGATGTTTCGAAGGGCTGTTTAATAGATCCCCCTGGTTTACCACCTTAATCTC 8160
    TCCGGTTCTTACCAAGCTTCCCGACAAATTAATCTAGGGGGACCAATGGTGGATTAGAG

```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

```

8161 CACCATCATGGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTACTCTTTGGACCTTGCATTCT 8220
      GTGGTACTACCCTGGAGATTATCATGAGAATGACTAGAAATGAGAAACCTGGAAACGTAAGA

8221 CAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGAC 8280
      GTTAGCTAACCAGGTTAAACAATTTCTGTCTTAGAGTCACCAGGTCCGAGACCAAAAACCTG

                                     IRES reg(8327,8876)>>>
                                     |
                                     MluI (8325)
                                     ||
8281 TCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCATGAACGGTTACTGGCCGAA 8340
      AGTCGTTATAGTGGTCGATTTTGGGTATCTCATGCTCGGTACTTGGCGCAATGACCCGGCTT

                                     ires_emcv reg(8378,8876)>>>
                                     |
8341 GCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCCSTTTGTCTATATGTTATTTTTCCACCATATTGCCGT 8400
      CGGCCAACCCTTATTCCGGCCACACGCCAARACAGATATACAATAAAAGGTGGTATAACGGCA

8401 CTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGG 8460
      GAAAACCGTTTACTCTCCCGGCCCTTTGGACCGGGACAGAAGAAGTGTCTGTAAGGATCCC

8461 GTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTC 8520
      CAGAAAGGGGAGAGCGGTTTTCTTACGTTCCAGACAACCTTACAGCACTTCTCTCGTCAAG

8521 CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCCACCCTTTGCAGGCAGCGGAACC 8580
      GACACCTTCGAAGAACCTCTGTTTGTGTCAGACATCGCTGGGAAACGTCCTCGCCCTTGG

8581 CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAACCTGCAA 8640
      GGGTGGACCGCTGTCCACGGGAGACGCGGTTTTTCGGTGCACATATCTATGTGGACGTT

8641 AGGCGGCACAAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGC 8700
      TCCGCGGTGTTGGGGTCAAGGTGCAACACTCAACCTTATCAACACCTTTCTCAGTTTACCG

8701 TCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCATTGTATGG 8760
      AGAGGAGTTGTCATAAGTTGTTCCCGACTTCTTACGGGTCTTCCATGGGGTAACATACC

8761 GATCTGATCTGGGGCCCTGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTAGTCEAGGTTAAAAAAC 8820
      CTAGACTAGACCCCGGAGCCACGTGTACGAAATGTACACAAATCAGCTCCAATTTTTTTG

```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

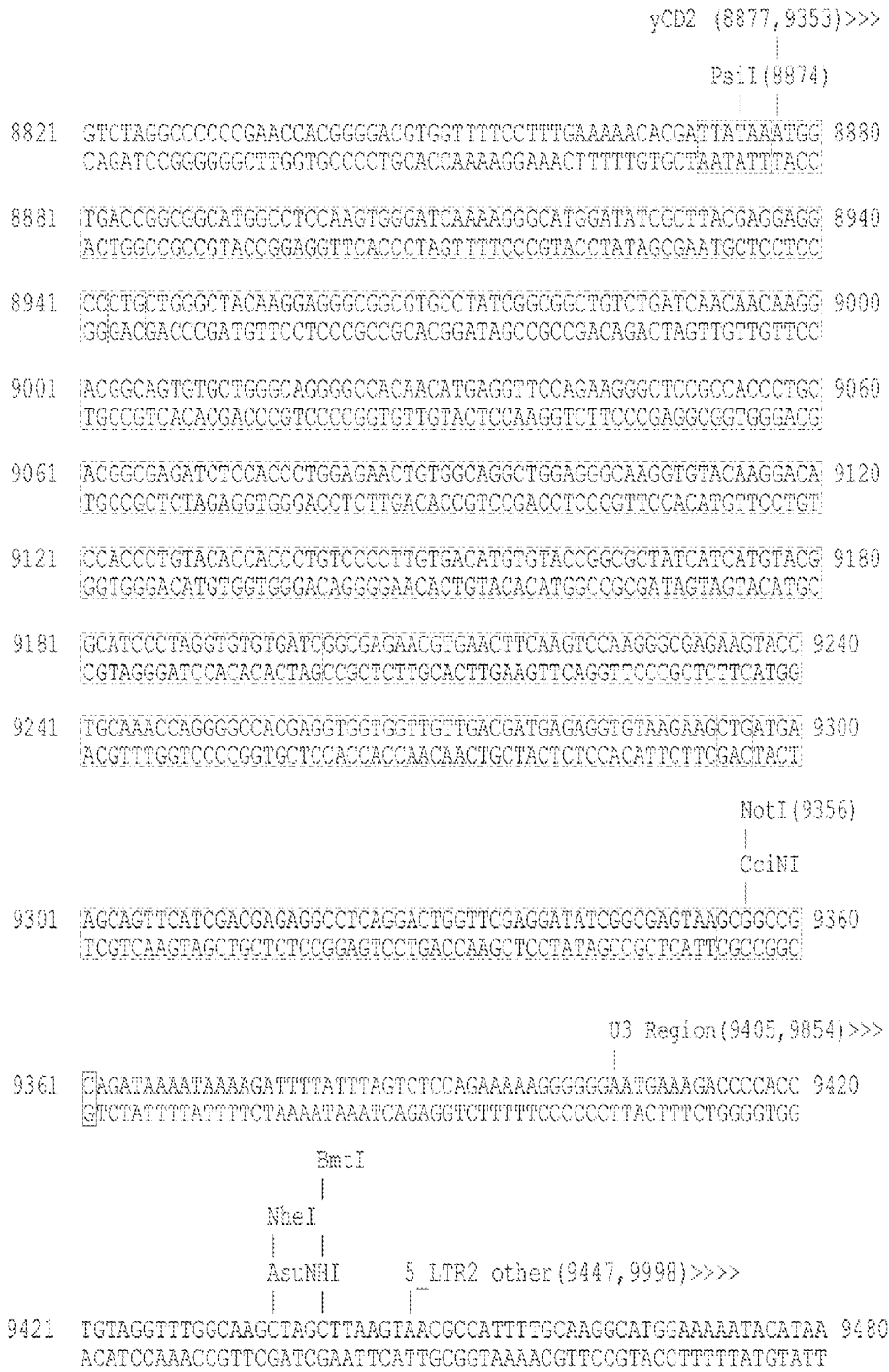


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

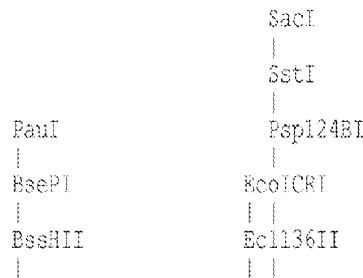
9481 CTCAGAAATAGAGAAGTTCAGATCBAAGGTCAGGAACAGATGGAAACAGCTGAATATGGGCCA 9540
 GACTCTTACCTCTTCAAGTCTAGTCCAGTCCCTTGTCTACCTTGTGGACTTATACCCGGT

9541 AACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACA 9600
 TTGTCTATAGACACCATTGTCAGGACGGGGCCGAGTCCCGGTTCTTGTCTACCTTGT

9601 GCTGAATATGGGCCAAGCAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCA 9660
 CCACTTATACCCGGTTFGTCTATAGACACCATTGTCAGGACGGGGCCGAGTCCCGGTT

9661 AGAACAGATGGTCCCGCAGATGGGTCCAGCCCTCAGCAGTTCCTAGAGAACCATCAGATG 9720
 TCTTGTCTACCAGGGGTCTACGCCAGGTGGGAGTCGTCAAAGATCTCTTGGTAGTCTAC

9721 TTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAG 9780
 AAAGGTCCACGGGGTTCCTGGACTTACTGGACACGGGAATAAAGTCTGATTGGTTAGTC



9781 TTCGCTTCTGGCTTCTGTTCCGGCGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCACAA 9840
 AAGCGAAGAGCGAAGACAAGCGCCGCAAGACGAGGGCTCGAGTTATTTCTCGGGTGT

R Region(9855, 9921)>>>>

9841 CCCCTCACTGGGGCCGACGCTCTCCGATTTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGATCCA 9900
 GGGGAGTGAGCCCCCGCTCAGGAGGCTAACTGACTCAGCGGGCCATGGCCACATAGGT

U5 Region(9922, 9998)>>>>

9901 ATAAACCCCTTGGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTTTCCTTGGGAGGGTCTCCT 9960
 TATTTGGGAGAACGTCACCTAGGCTCAACACCAGAGCGACAAGGAACCTCCACAGGA

9961 CTGAGTGACTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCATTACATGTTGAGCAAAAAGCCAGCA 10020
 GACTCACTAAGTATGGCCAGTCCGCCCCAGAAAGTAATGTACACTCGTTTTCGGTCTGT

pBR322 origin(10045, 10664)<<<

10021 AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC 10080
 TTTCCGGTCTCTGGCATTTTTCCGGCCACGACCGCAAAAAGGTATCCGAGGGGGGGG

10091 TGACGAGCATCACAATAATCGACCGTCAAGTCAAGAGGTGCCGAACCCGACAGGACTATA 10140
 ACTGCTCGTAGTGTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCCGCTTTGGGCTGTCTCTGATAT

10141 AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTTCTGTTCCGACCTGCC 10200
 TTCTATGGTCCGCAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGGAGAGGACAAGGCTGGGACGG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

10201 GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTC 10260
 CGAATGGCCTATGGACAGGGCGGAAGAGSSGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTTACGAG

10261 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTSTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA 10320
 TGGGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCCACCCGACACACGTGCT

10321 ACCCCCCGTTTCAGCCCCACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC 10380
 TGGGGGGCAAGTCCGGCTGGCGACCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGG

10381 GGTAAAGACACCGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAG 10440
 CCATTCGTGTCTGAATAGCGGTGACCGTCTCGTGGTGAACATTTCTCTAATCGTCTCGCTC

10441 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAG 10500
 CATACTCCGCCAGGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTC

10501 GACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG 10560
 CTGTCTATAAACCATAGACCGGAGACGACTTCGGTCAATGGGAAGCCTTTTTCTCAACCATC

10561 CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC AAGCAGCA 10620
 GAGAACTAGGCCGTTTTGTTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAAACAACGTTCCGTCT

10621 GATTACCGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCCTGA 10680
 CTAATGCGCGTCTTTTTTTTCTAGAGTTCTTCTAGGAACTAGAAAAGATGCCCCAGACT

10681 CGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGAT 10740
 GCGAGTCACTTTGCTTTTTGAGTGCATTTCCCTAAAACCAGTACTCTAATAGTTTTTCTTA

10741 CTTCACTAGATCCTTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA 10800
 GAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTTTCATATATACT

marcador de amp (10819,11679)<<<
 |

10801 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAAGGCACCTATCTCAGCGATCTG 10860
 CATTGAAACCAGACTGTCAATGTTTACSAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGAC

10861 TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAA ACTACGATACGGGA 10920
 AGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACFGAGGGGGCAGCACATCTATTTGATGCTATGCCCT

10921 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCC 10980
 CCGAATGGTAGACCGGGGTCACGACGTTACTAFGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGG

10981 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAAC 11040
 TCTAAATAGTCGTATTTGGTCCGGTCCGCCCTTCCCGGCTCGCGTCTTCACCAGGACGTTG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 609 336 T3

11041 TTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC 11100
 AAATAGGCGGAGGTAGGTACAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCATTTCATCAAGCGG

11101 AGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGGCTCGTC 11160
 TCAATTATCAAACGGCTTGCACAACGGTAACGACGTCGGTAGCACAC>GCGAGCAG

11161 GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCC 11220
 CAAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGGCTCAATGTACTAGGGG

11221 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTT 11280
 GTACAACACGTTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCAA

11281 GCGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAATGCC 11340
 CCGCGCTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTGTGACGTATTAAGAGAATGACAGTACGG

11341 ATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCATTCAGAAATAGTG 11400
 TAGGCATTCACGAAAAGACACTGACCACCTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCAC

11401 TATGCGGGGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAATACCGCGCCACATAG 11460
 ATACCGCGCTGGCTCAACGAGAACGGCGCCGAGTTGTGCCCTATTATGGCGCGGTGTATC

11461 CAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAATTGAAAACGTTCTTGGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT 11520
 GTCTTGAATTTTACAGAGTAGTAACCTTTTGCAGAAGCCCCGCTTTTGAGAGTTCTTA

11521 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC 11580
 GAATGGCGACAACCTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTGACTAGAAGTCC

11581 ATCTTTTACTTTCAACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA 11640
 TAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGTTTTTGTCTTCCGTTTTTACGGCGPTT

11641 AAAGGGAATAAGGGGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTA 11700
 TTTCCCTTATTCCCCTGTGCCTTACAACTTATGAGTATGAGAAGGAAAAGTTATAAT

prom. de amp (11721,11749)<<<
 |

11701 TTGAAGCATTATCAGGGTTAATTGTCATGACCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA 11760
 AACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTT

11761 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGA 11820
 TTTATTTGTTTATCCCCRAGGCGGTGTAAGGGGCTTTTTCACGGTGGACTGCAGATTCT

11821 AACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGGGTATCACGAGGCCCTTTTCTCT 11880
 TTGGTAATAATAGTACTGTAATTTGGATATTTTTATCCGCATAGTGTCTCCGGGAAAGCAGA

11881 TCAAGAATTCAT 11892
 AGTTCTTAAGTA

FIGURA 3E (Cont.)

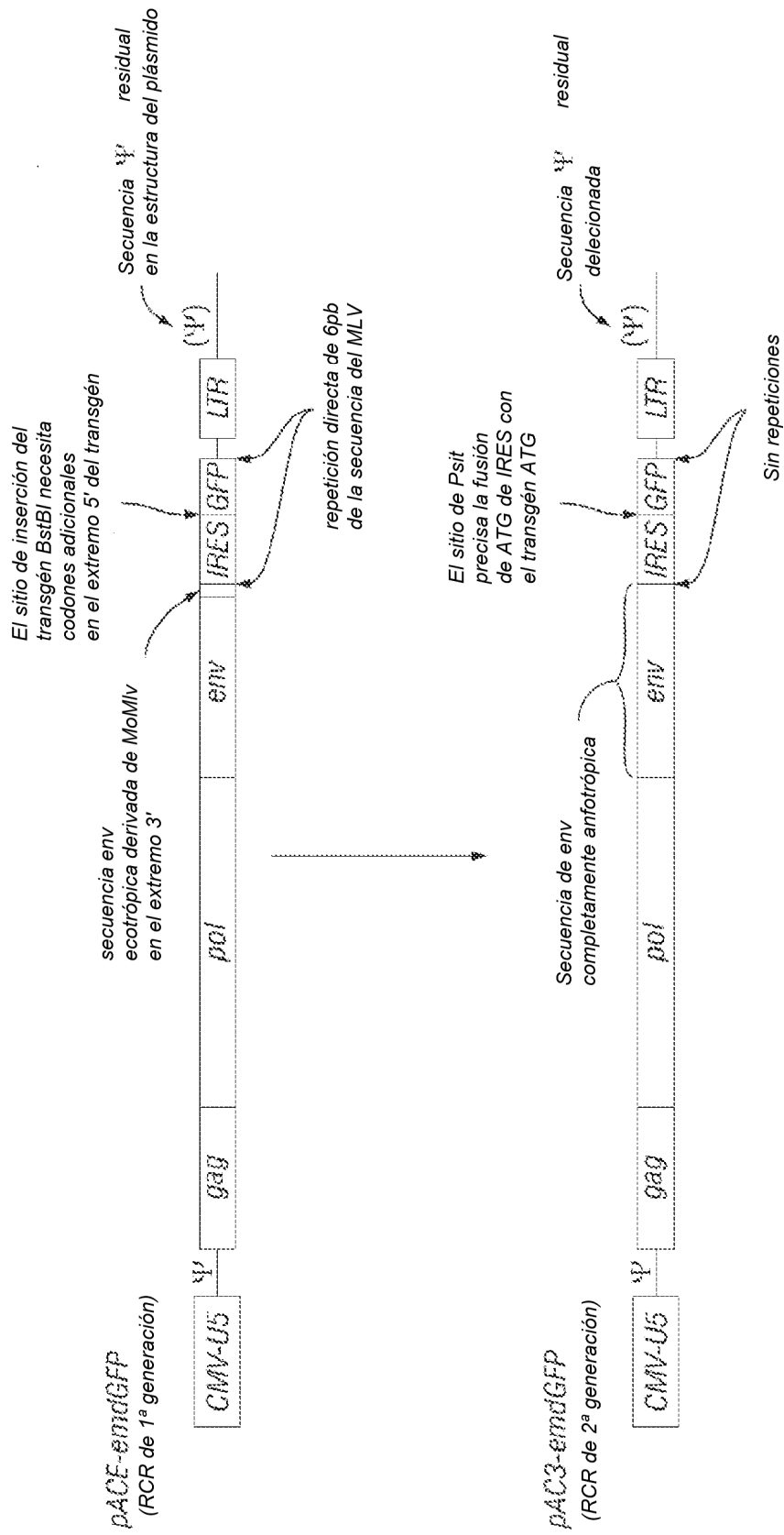
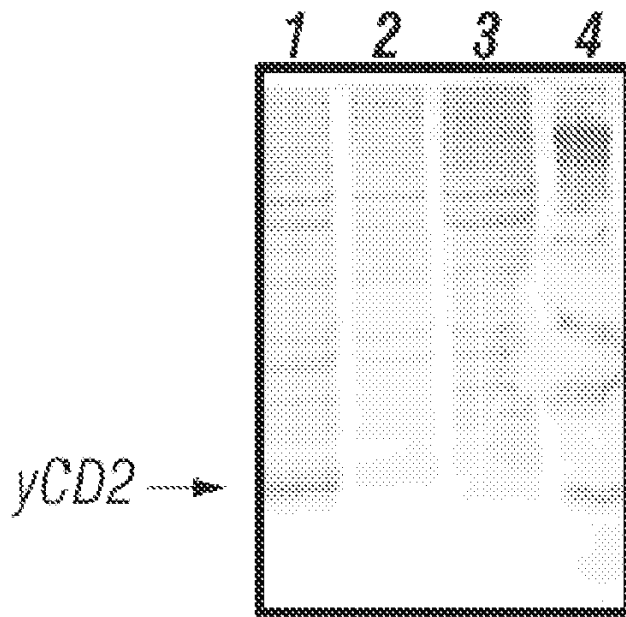


FIGURA 3F



- 1 - U87 + AC3-yCD2 (V)
- 2 - U87 + ACE-yCD (V)
- 3 - U87 (no infectada)
- 4 - Patrones del peso molecular

FIGURA 4

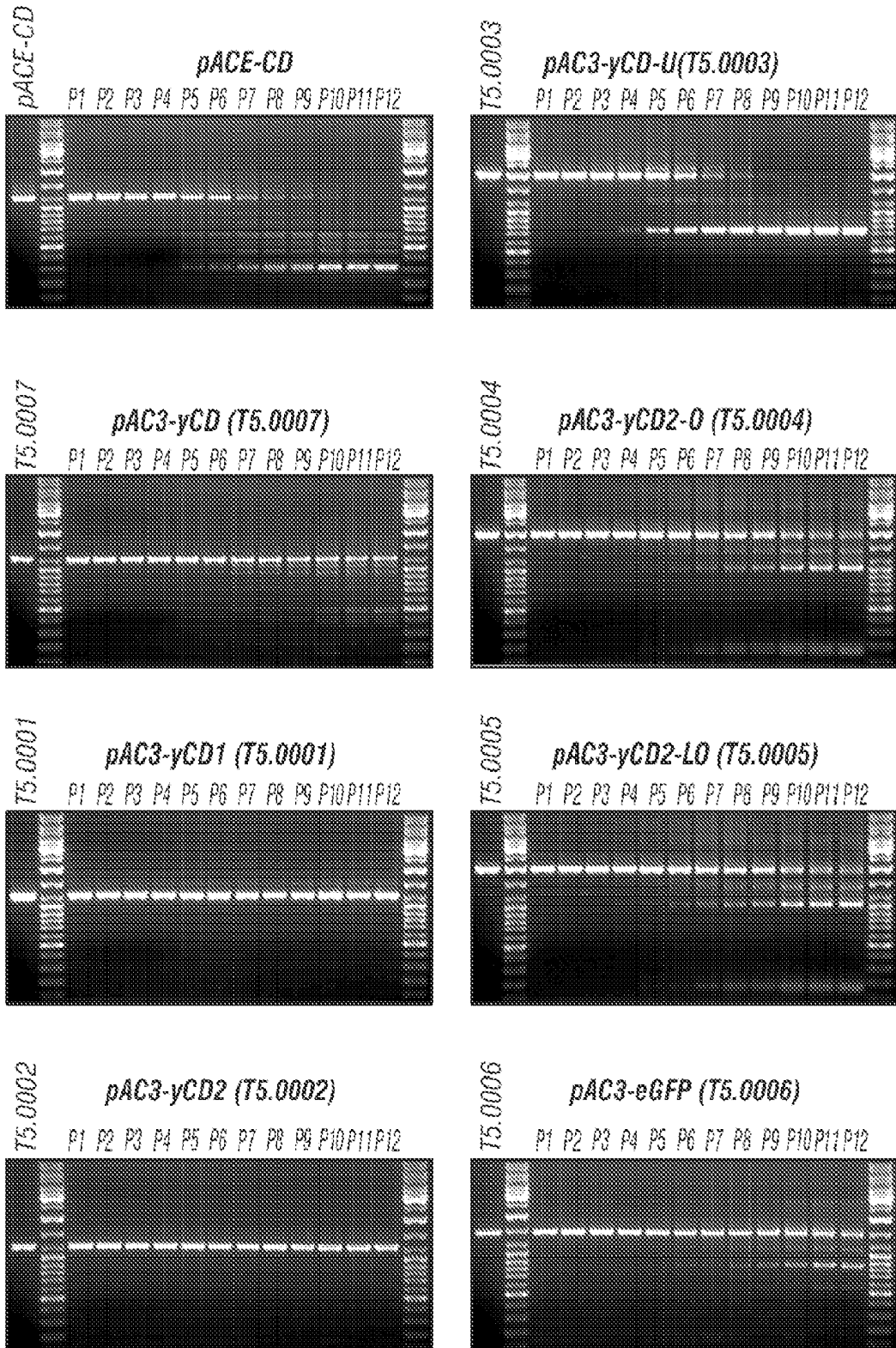


FIGURA 5

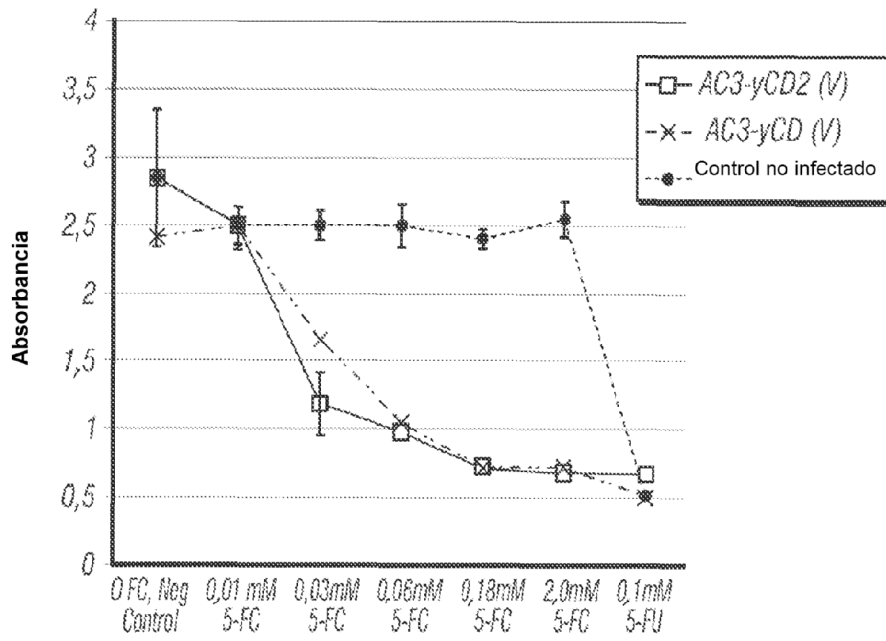


FIGURA 6A

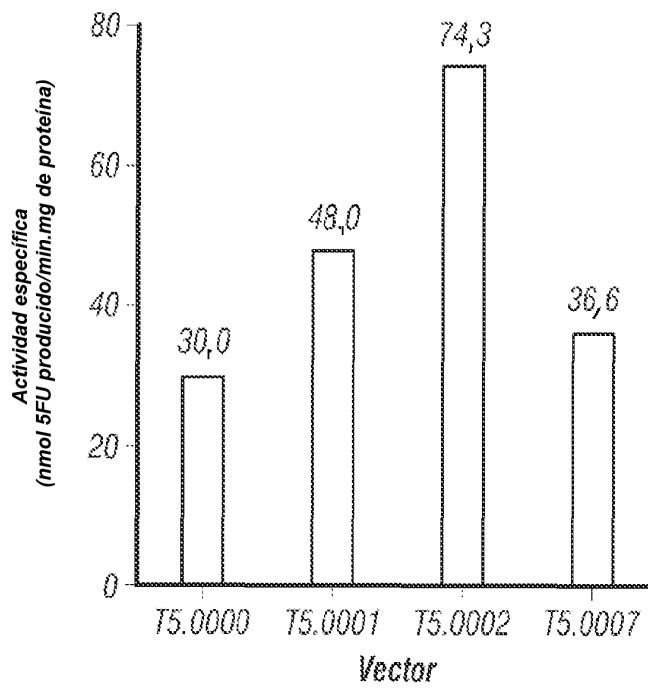


FIGURA 6B

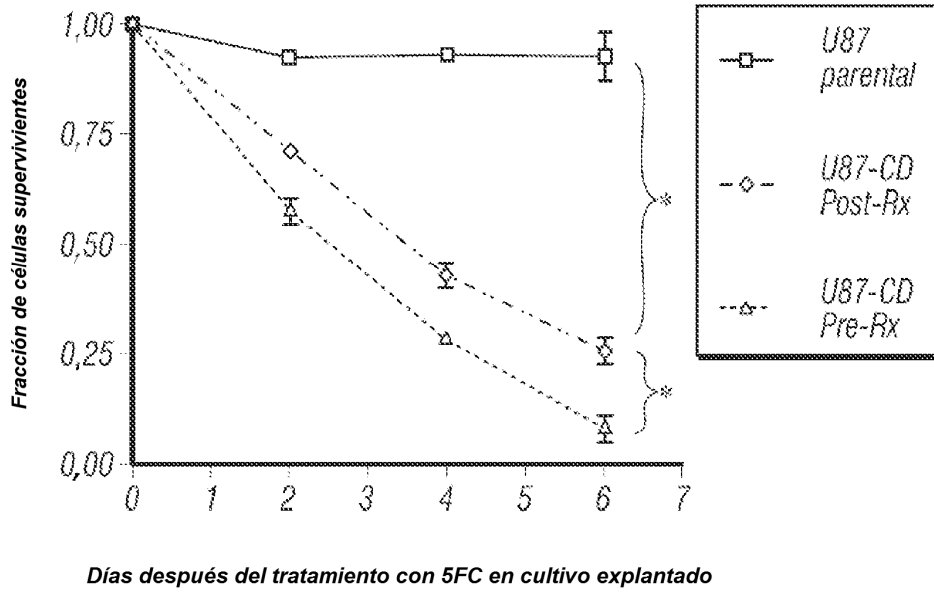


FIGURA 7

Modelo intracraneal de xenoinjerto desnudo U-87-10 animales/grupo

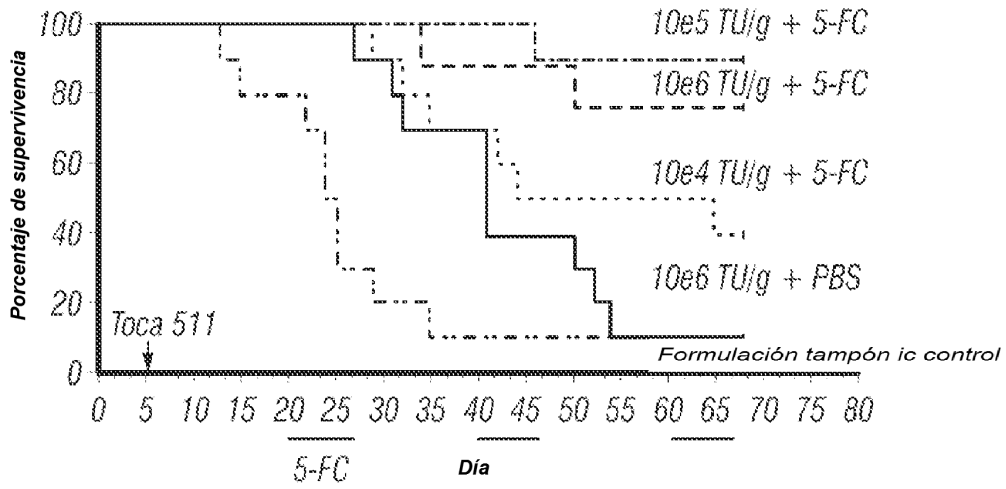


FIGURA 8

CT26 BALB/c. Modelo intracraneal singeneico -10 animales/grupo

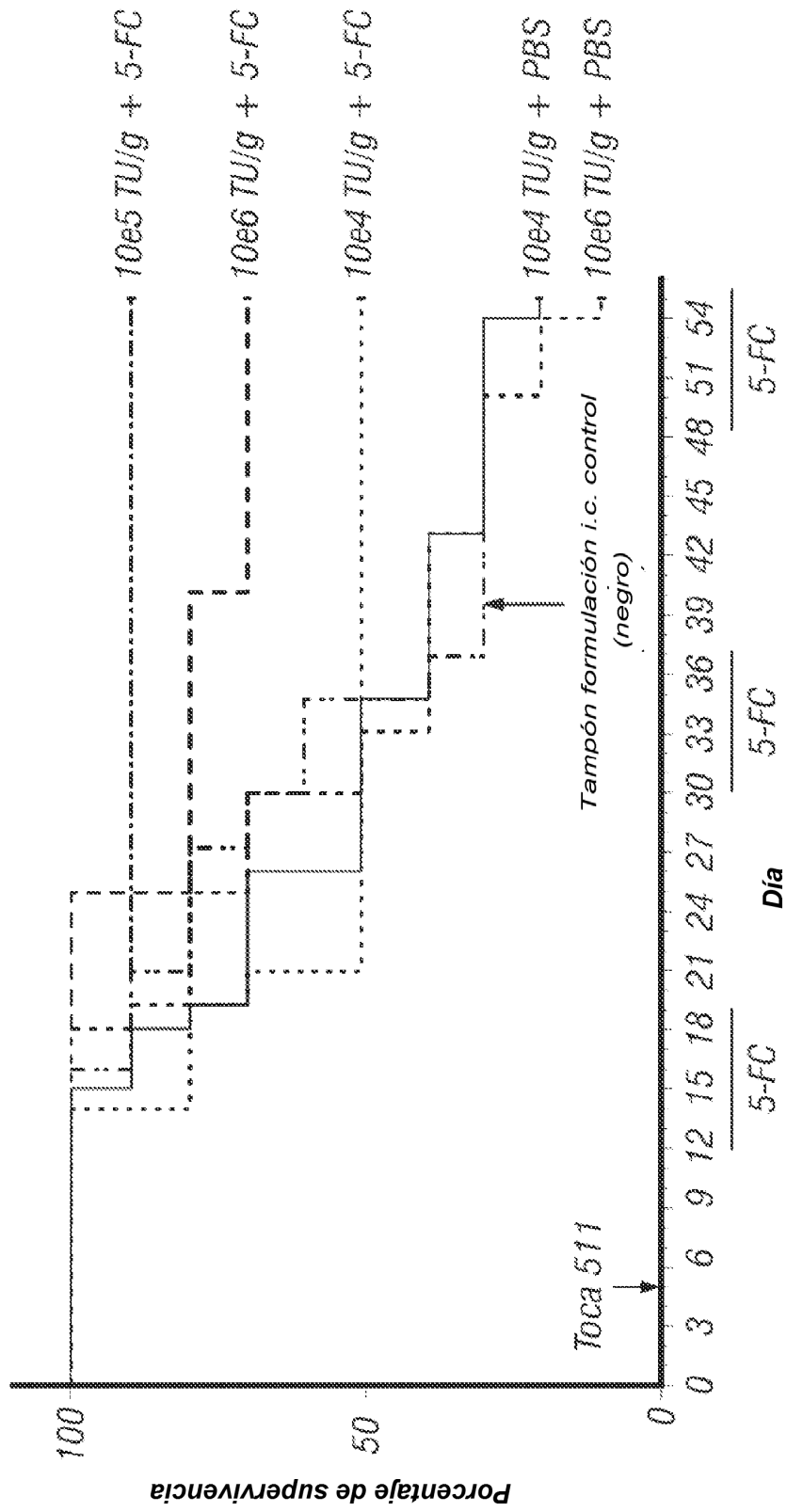
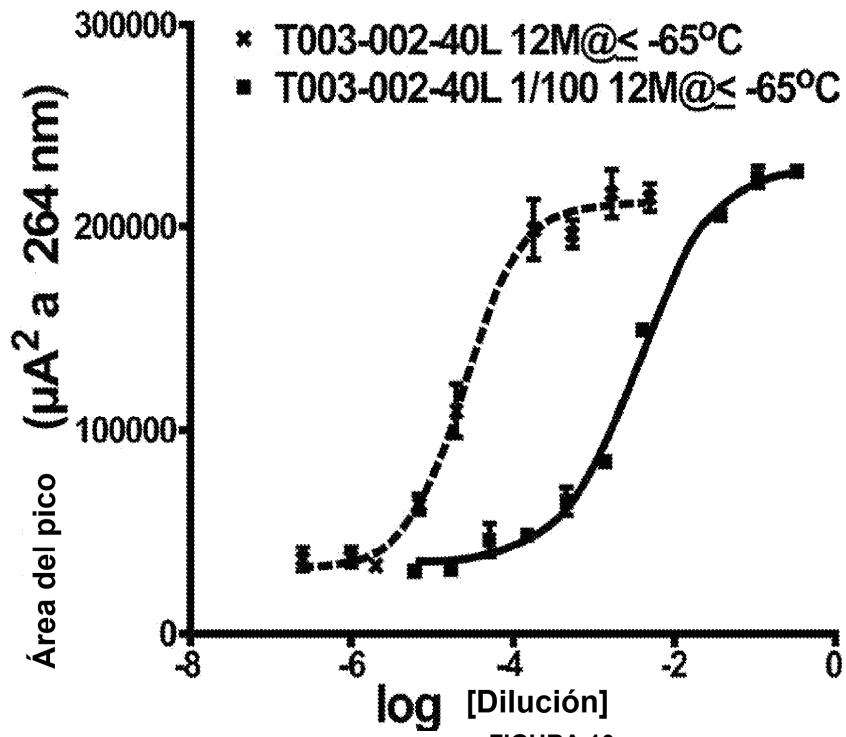


FIGURA 9



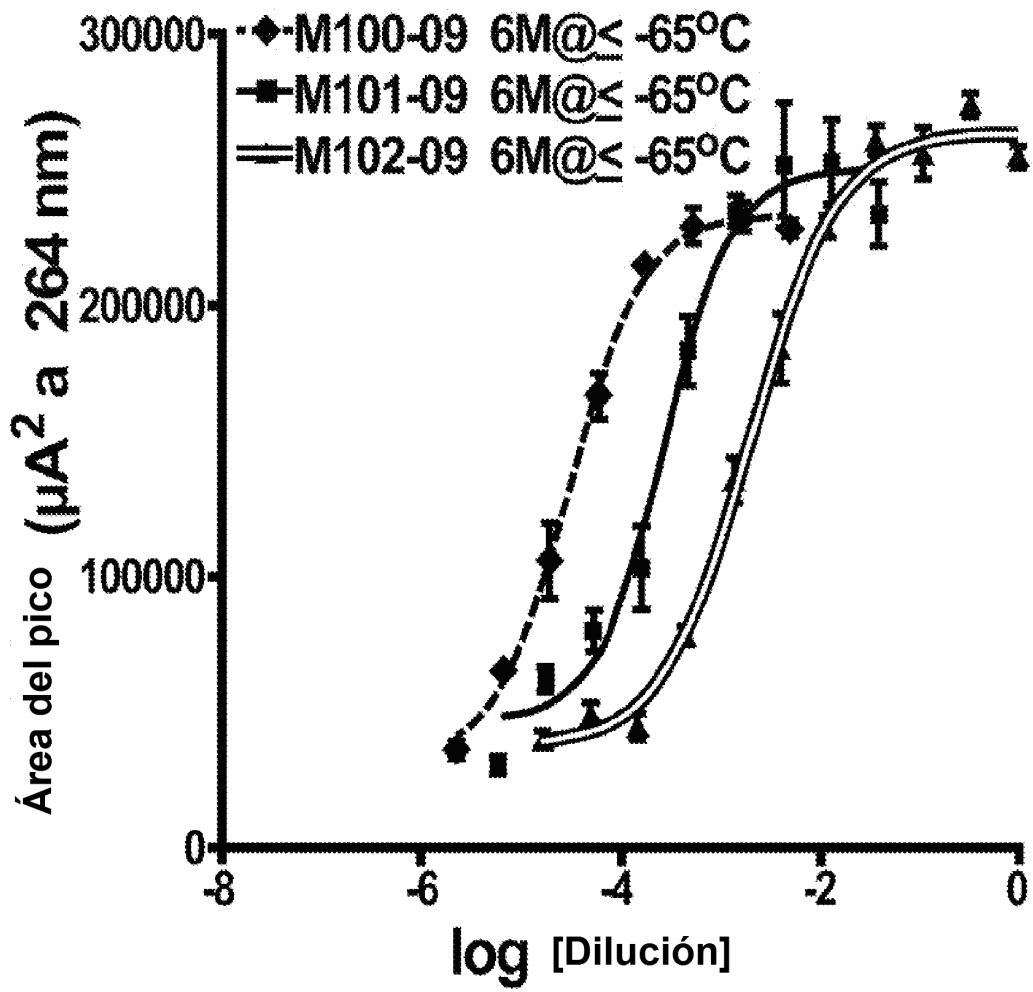


FIGURA 11

Comparación directa de clones HT1080T5.0002 Adherentes para la producción del título de cultivos

confluentes

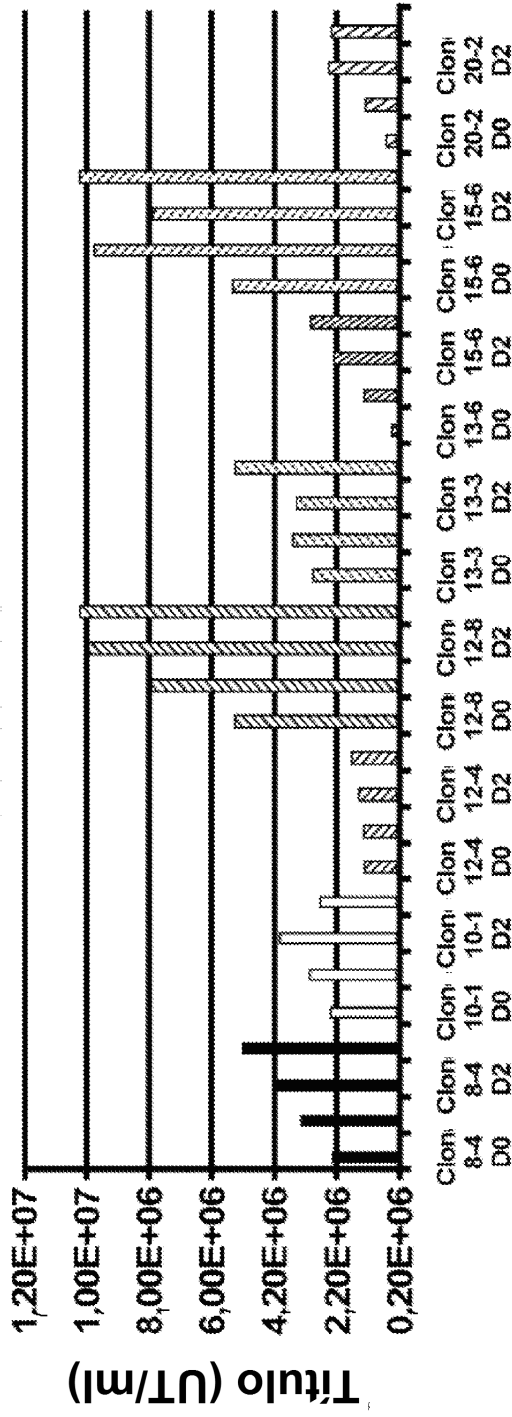


FIGURA 12

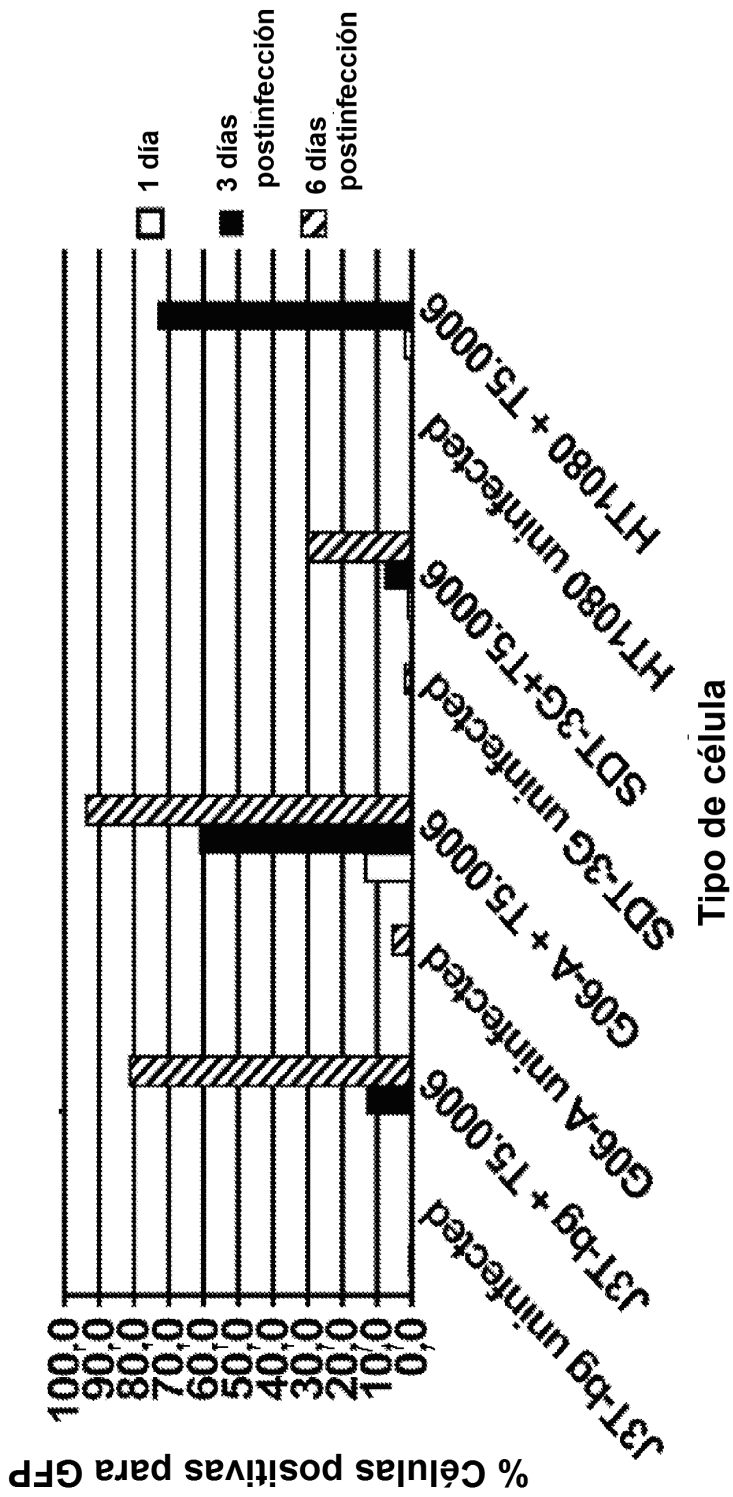


FIGURA 13

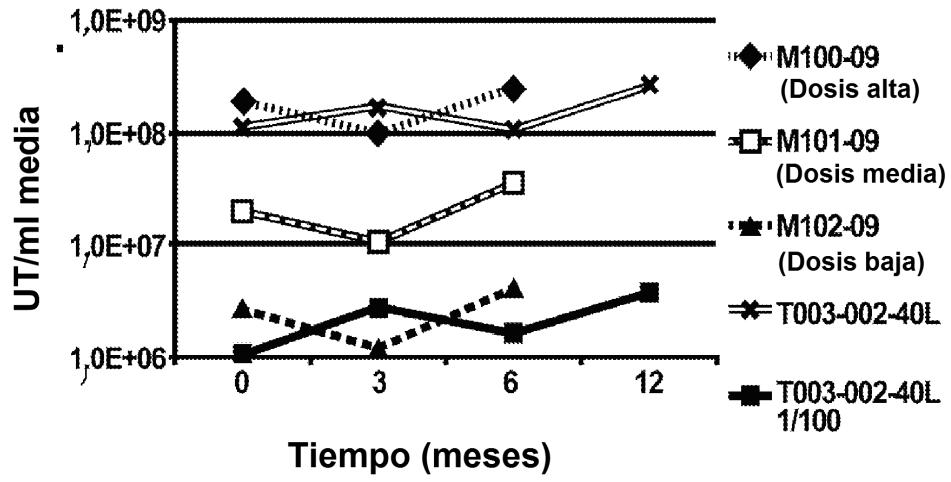


FIGURA 14

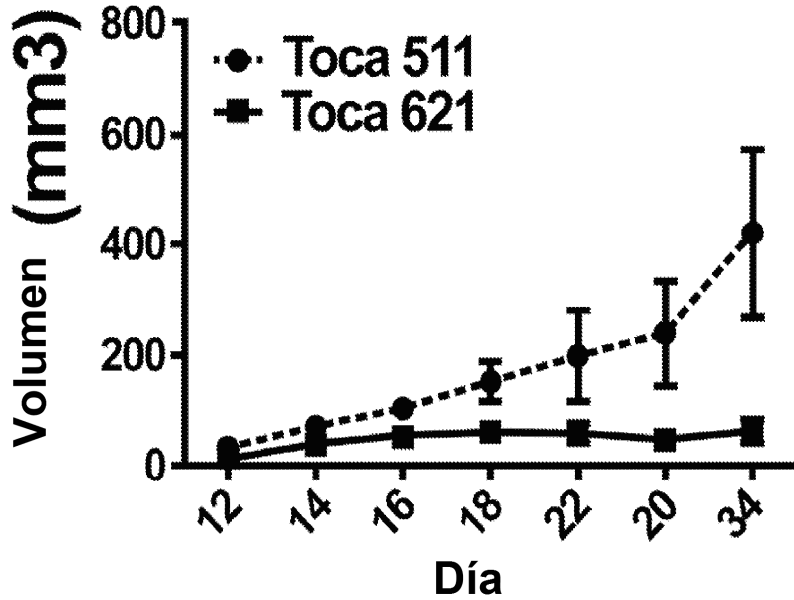


FIGURA 15

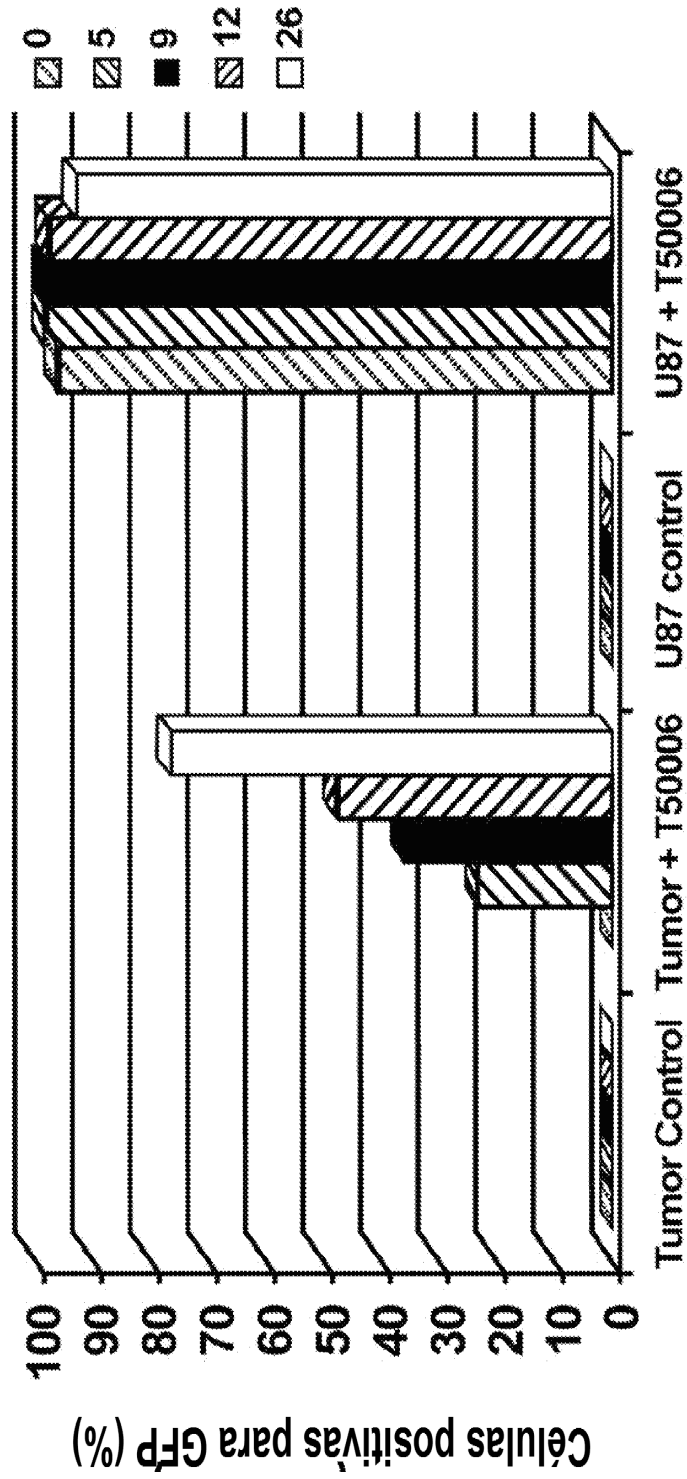


FIGURA 16