

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 880**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2011 PCT/US2011/056122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO2012054294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011 E 11770986 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2629791**

54 Título: **Vacuna de ADN de HER2 como tratamiento auxiliar para cánceres en animales de compañía**

30 Prioridad:

19.10.2010 US 394505 P

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

FISCHER, LAURENT, BERNARD

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 614 880 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

Vacuna de ADN de HER2 como tratamiento auxiliar para cánceres en animales de compañía

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] Esta solicitud se refiere a composiciones para el tratamiento de la diferenciación de cánceres dependientes de antígeno y a procedimientos de uso de dichas composiciones. La invención utiliza composiciones que contienen antígenos de diferenciación xenogénica que están asociados a cánceres para proporcionar una
10 terapia eficaz.

[0002] Los antígenos de diferenciación son antígenos específicos de tejido que son compartidos por tumores autólogos y algunos alogénicos de derivación similar y en contrapartidas de tejido normal en la misma etapa de diferenciación. Se ha mostrado que los antígenos de diferenciación se expresan por una variedad de tipos
15 tumorales, incluyendo melanoma, leucemia, linfomas, carcinoma colorrectal, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de ovario, carcinomas de páncreas y cánceres de pulmón. Por ejemplo, los antígenos de diferenciación expresados por células de melanoma incluyen Melan-A/MART-1, Pme117, tirosinasa y gp75. El antígeno de diferenciación expresado por linfomas y leucemia incluye los marcadores de diferenciación de linfocitos B CD 19 y CD20/CD20 B. Es un ejemplo de un antígeno de diferenciación expresado por carcinoma colorrectal,
20 carcinoma de mama, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, carcinoma de ovario y carcinoma de pulmón el polipéptido de mucina muc-1. Es un antígeno de diferenciación expresado, por ejemplo, por carcinoma de mama Her2 (sinónimos: Her2/neu, ECBB2, ErbB2, c-erb-2), que es un gen que codifica un receptor tirosina cinasa que es un miembro de la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico (De Maria y col., 2005). Se ha demostrado sobreexpresión de Her2 en tumores de glándula mamaria tanto en gato (Winston y col., 2005) como en
25 perro (Rungsipat y col., 2008). Winston y col. (2005) usaron procedimientos de ensayo existentes (HERCEPTEST™, Dako USA, Carpinteria, CA; NCL-CB11, Novocastra, Newcastle, RU) para graduar exitosamente los niveles de expresión de Her2 en tumores mamarios de felino como 0= mínimo/ausente, 1= débil, 2= moderado o 3= intenso. Los ensayos HERCEPTEST™ y NCL-CB11 identificaron a 27 y 23 gatos respectivamente, de los 30
30 examinados, por tener un grado 2 o 3 de expresión de Her2 en muestras de tumor mamario.

[0003] Además de graduar exitosamente los niveles de sobreexpresión de Her2 en tumores mamarios de felino, Winston y col. (2005) usaron HERCEPTEST™ para detectar bajos niveles de expresión de Her2 en tejidos
epiteliales felinos normales y en tipos de células que incluyen: folículo piloso, glándula mamaria, foveola gástrica, conducto de glándula salival, túbulos corticales y medulares renales, cripta colónica y del intestino delgado, cerebro,
35 conducto e islotes pancreáticos, macrófagos esplénicos, corteza suprarrenal, hepatocitos y células de Leydig testiculares. Se ha documentado la expresión de Her2 en una serie de tipos de células epiteliales humanas incluyendo gastrointestinales, respiratorias, reproductivas, urinarias, cutáneas, mamarias y placentarias (Press y col., 1990). Estos hallazgos indican que la expresión de Her2 es común en una serie de tipos de tejido de seres humanos y gatos. El hallazgo de la sobreexpresión de Her2 en tumores mamarios de perro sugiere que esta especie
40 compartiría características de expresión identificadas en seres humanos y gatos. Los ensayos y reactivos existentes pueden servir como herramientas para cribar los niveles de expresión de Her2 en cánceres de animal de compañía para justificar el tratamiento con la vacuna del cáncer de Her2.

[0004] Desgraciadamente, en la mayoría de casos, el sistema inmunitario del individuo es tolerante a dichos
45 antígenos de diferenciación y no consigue crear una repuesta inmunitaria eficaz. Se han considerado varias tecnologías para enfrentarse a este reto: (citocinas como coadyuvantes genéticos (Chang y col., 2004), vacunación xenogénica (Pupa y col., 2005), electrotransferencia (Quaglino y col., 2004), combinación con quimioterapia (Bernhardt y col., 2002). Aunque los resultados son esperanzadores, se requeriría mayor eficacia para que estos enfoques fueran considerados un componente clave de una estrategia terapéutica. Además, hallazgos recientes
50 indican que se requieren tanto inmunidad de anticuerpo como mediada por célula para la erradicación tumoral después de inmunización, lo que explica quizás la falta de éxito en el campo (Orlandi y col., 2007). Por lo tanto, para el tratamiento de cánceres donde el tumor expresa antígenos de diferenciación, sería deseable tener un procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz contra el antígeno de diferenciación *in vivo*. Es un objeto de la presente invención proporcionar dicho procedimiento.
55

Referencias**[0005]**

60 Orlandi y col. "Antibody and CD8+ T cell Responses against HER2/neu Required for Tumor Eradication after DNA Immunization with a Flt-3 Ligand FusionVaccine". *Clin Cancer Res* 2007; 13(20) 15 de octubre de 2007.
Amici A. y col. Venanzi FM, Concetti A. "Genetic immunization against neu/erbB2 transgenic breast cancer". *Cancer*

- Immunol Immunother* 1998; 47: 183-90.
- Bergman PJ y col. "Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial". *CCR*, Vol. 9, 1284-1290, abril de 2003.
- Bargmann y col. "The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein". *Nature*, 16-22 de enero de 1986; 319(6050): 226-30.
- 5 Norell H y col. "Vaccination with a plasmid DNA encoding HER2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial". *JTM*, 7 de junio de 2010, 8:53.
- Jacob, JB y col. "Combining Human and Rat Sequences in Her2 DNA Vaccines Blunts Immune Tolerance and Drives Antitumor Immunity"; *Cancer Res*, 1 de enero de 2010, 70; 119.
- 10 De Maria R y col. "Spontaneous Feline Mammary Carcinoma is a Model of Her2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer"; *Cancer Res* 2005; 65 (3); 907-912.
- Philibert JC y col. "Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors"; *J Vet Intern Med* 2003; 17: 102-106.
- Press MF y col. "Expression of the Her2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues"; *Oncogene*, 5: 15 953-62.
- Rungsipipat A y col.; "C-erbB-2 oncogene and P21WAF/CIPI tumor suppressor gene expression as prognostic factors in canine mammary adenocarcinomas"; *Comp Clin Pathol* 2008, 17: 35-41.
- Winston J y col. "Immunohistochemical detection of Her=2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours"; *Veterinary and Comparative Oncology* 3, 1, 8-15, 2005.
- 20 Chang SY y col. "Enhanced efficacy of DNA vaccination against Her2/neu tumor antigen by genetic adjuvants"; *IJC* vol 111 páginas 86-95, 10 de agosto de 2004
- Pupa y col. "HER2: A biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine". *JCP* vol. 205 paginas 10-18, 10 de mayo de 2005.
- Quaglino E y col. "Concordant morphologic and gene expression data show that a vaccine halts HER2/neu preneoplastic lesions". *JCI*, vol. 113 N° 5 marzo de 2004.
- 25 Bernhard H y col. "Vaccination against the HER2/neu oncogenic protein". *Endocrine-Related Cancer* 9 (1) 33-44, 2002.
- Berta, GN y col. "Anti-HER2 DNA vaccine protects Syrian hamsters against squamous cell carcinomas". *Br J Cancer*, vol 93(11), 28 de noviembre de 2005.
- 30 Disis y col. "Peptide-based, but not whole protein, vaccines elicit immunity to HER2/neu, an oncogenic self-protein". *The Journal of Immunology* 156: 3151-3158, 1 de mayo de 1996.
- Eck y col. ("Gene Based Therapy in The Pharmacological Basis of Therapeutics", Goodman and Gilman, Eds, 1996, pág. 77-101).
- Zhai y col. "Antigen-Specific Tumor Vaccines". *The Journal of Immunology* 156: 700-710, Enero de 1996. Verma y
- 35 Somia. "Gene and therapy-promises, problems and prospects". *Nature* 389: 239-242, septiembre de 1997.
- Miller y Vile. "Targeted vectors for gene therapy". *FASEB J*. 9: 190-199, 1995.
- Deonarain, Mahendra. "Ligand-targeted receptor-mediated vectors for gene delivery". *Exp. Opin. Ther. Patents* 8(1): 53-69, 1998.
- Crystal. "Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success". *Science* 270: 404-410, 20 de octubre de 1995.
- 40 B. Bouchard y col., "Induction of Pigmentation in Mouse Fibroblasts by Expression of Human Tyrosinase cDNA", *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, pág. 2029-2042.
- B. Bouchard y col., "Production and Characterization of Antibodies against Human Tyrosinase", *The Journal of Investigative Dermatology*, 1994, vol. 102, n° 3, pág. 291-295.
- 45 J. Rowell y col., "Lysosome-Associated Membrane Protein-1-Mediated Targeting of the HIV-1 Envelope Protein to an Endosomal/Lysosomal Compartment Enhances Its Presentation to MHC Class II-Restricted T Cells", *The American Association of Immunologists*, 1995, pág. 1818-1828.
- S. Krishnan y col., "Paving the way towards DNA vaccines", *Nature Medicine*, 1995, vol. 1, n° 6, pág. 521-522.
- S. Barclay y col., "Rapid isolation of monoclonal antibodies specific for cell surface differentiation antigens", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986 vol. 83, pág. 4336-4340.
- 50 S. Vijayasaradhi y col., "Intracellular Sorting and Targeting of Melanosomal Membrane Proteins: Identification of Signals for Sorting of the Human Brown Locus Protein, GP75", *The Journal of Cell Biology*, 1995, vol. 130, n° 4, pág. 807-820.
- D. Pardoll y col., "Exposing the Immunology of Naked DNA Vaccines", *Immunity*, Cell Press, 1995, vol. 3, pág. 165-169.
- 55 S. Vijayasaradhi y col., "The Melanoma Antigen gp75 is the Human Homologue of the Mouse b (Brown) Locus Gene Product", *J. Exp. Med.*, 1990, vol. 171, pág. 1375-1380.
- G. Adema y col., "Molecular Characterization of the Melanocyte Lineage-specific Antigen gyp 100", *The Journal of Biology Chemistry*, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 1994, vol. 269, n° 31, pág. 20126-20133.
- 60 A. Houghton y col., "Recognition of Autoantigens by Patients with Melanoma", *Annals New York Academy of Sciences*, 1993, pág. 59-69.

- C. Naftzger y col., "Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: A study of tumor rejection and autoimmunity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, pág. 14809-14814.
- F. Ausubel y col., "Expression of Proteins in Insect Cells using Baculoviral Vectors", *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1990, vol. 8, 16.8.1-16.11-7.
- 5 J. Ulmer y col., "Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein", *Science*, 1993, vol. 259, pág. 1745-1749.
- C. Tiffs y col., "The Folding and Cell Surface Expression of CD4 Requires Glycosylation", *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, nº 5, pág. 3268-3273.
- S. Park, "JL1, A Novel Differentiation Antigen of Human Cortical Thymocyte", *J. Exp. Med.*, The Rockefeller University Press, 1993, vol. 178, pág. 1447-1451.
- 10 C. Cabanas y col., "Characterization of a CD 11 c-Reactive Monoclonal Antibody (HCl/I) Obtained by Immunizing with Phorbol Ester Differentiated U937 Cells", *Hybridoma*, 1988, vol. 7, nº 2, pág. 167-177.
- N. Nanda y col. "Induction of Anti-Self-Immunity to Cure Cancer", *Cell*, 1995, vol. 82, pág. 13-17, citado por otros.
- D. Peruzzi y col., *Vaccine* 28 (2010), pág. 1201-1208 describe a telomerasa y HER-2/neu como dianas de vacunas
- 15 genéticas del cáncer en perros.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] Se ha encontrado ahora que puede superarse la tolerancia del sistema inmunitario por antígenos de
 20 diferenciación diana autoderivados y estimularse una respuesta inmunitaria mediante la administración de un
 antígeno de diferenciación xenogénico (de tipo silvestre o mutante) del mismo tipo de una especie diferente del
 sujeto que se está tratando (documentos 6.328.969 y US 7.556.805 de Sloan-Kettering).

[0007] Por ejemplo, puede usarse un antígeno de diferenciación de rata para estimular una respuesta
 25 inmunitaria en el correspondiente antígeno de diferenciación en un sujeto canino. La administración de antígenos
 alterados de acuerdo con la invención da como resultado una inmunidad eficaz contra el antígeno original expresado
 por el cáncer en el sujeto tratado. Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un
 antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por células mamarias de
 30 mamario canino, en el que el antígeno Her2/neu xenogénico está en una cantidad inmunológica eficaz y el antígeno
 Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos
 cánceres, y en el que el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que
 comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria
 terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a
 35 tumor de glándula mamaria en el perro. Se proporciona también un antígeno Her2/neu xenogénico que es
 xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por células de glándula mamaria de perro, para uso en el
 tratamiento de tumor de glándula mamaria canina en un perro que padece carcinoma/tumor de glándula mamaria
 canina, en el que el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector
 que comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula
 40 mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu
 asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico en perro, y en el que el vector tiene una secuencia que
 comprende 106-3885 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra
 después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres. Se proporciona además un
 vector que es capaz de expresar *in vivo* en un canino la proteína expuesta en la SEQ ID NO:2 para uso en el
 45 tratamiento de carcinoma/tumores mamarios caninos en un perro que padece carcinoma/tumor mamario canino, en
 el que el carcinoma/tumor mamario canino es un carcinoma/tumor mamario canino asociado a Her2/neu, en el que el
 vector se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres. Se
 proporciona además el uso de un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu
 expresado por células mamarias de perro, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de
 50 carcinoma/tumor mamario canino en un perro que padece carcinoma/tumor mamario canino, en el que el antígeno
 Her2/neu xenogénico está en una cantidad inmunológica eficaz y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra
 después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres, y en el que el antígeno
 Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que comprende una secuencia de ADN
 que codifica el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de
 55 un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria en perro.
 Como aspecto adicional, se proporciona el uso de un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un
 antígeno Her2/neu expresado por células de glándula mamaria de perro, para la fabricación de un medicamento
 para el tratamiento de tumor de glándula mamaria canina en un perro que padece carcinoma/tumor de glándula
 mamaria canina, en el que el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria xenogénico es
 60 un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de
 glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno
 Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico en perro, y en el que el vector tiene una secuencia que

comprende 106-3885 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres. Se define el alcance de la presente invención por las reivindicaciones. La materia en cuestión fuera del alcance de las reivindicaciones es sólo para información.

5

[0008] Se usan antígenos de diferenciación terapéuticos basados en antígenos de diferenciación asociados a carcinoma/tumor de glándula mamaria de acuerdo con la invención para tratar, por ejemplo, carcinoma de glándula mamaria después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres. En una realización de la invención, se administra a un sujeto un plásmido que comprende una secuencia que codifica un receptor 10 tirosina cinasa xenogénico, por ejemplo receptor tirosina cinasa de rata, bajo el control de un promotor adecuado. Por ejemplo, se han tratado perros usando plásmidos que comprenden una secuencia de ADN que codifica el receptor tirosina cinasa de rata con un beneficio clínico pronunciado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15

[0009]

La FIG. 1A muestra el tiempo de supervivencia global después de inmunización y resección quirúrgica del MGT; la FIG. 1B muestra el tiempo de supervivencia libre de enfermedad después de inmunización y resección quirúrgica 20 del MGT; la FIG. 1C muestra el tiempo de supervivencia libre de metástasis después de inmunización y resección quirúrgica del MGT; la FIG. 2 muestra un mapa del plásmido pcDNA3.1 (+/-); la FIG. 3 muestra un mapa y la secuencia del plásmido pING-tirosinasa humana, en que se ha retirado la secuencia 25 de codificación de tirosina humana. Es aquí donde se insertó Her2/neu de rata (nucleótidos 17-3799 de la SEQ ID NO: 1) para producir rHer2/neu-pING de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

[0010] La presente invención proporciona un procedimiento para tratar tumores de glándula mamaria en un sujeto mediante la estimulación de una respuesta inmunitaria ante un antígeno de diferenciación asociado a glándula mamaria. El sujeto es preferiblemente canino o felino, aunque la invención puede aplicarse a otras especies animales, preferiblemente especies de mamíferos o aves también.

35

[0011] Como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones de esta solicitud, el término "respuesta inmunitaria" engloba tanto respuestas inmunitarias celulares como humorales. Preferiblemente, la respuesta inmunitaria es suficiente para proporcionar inmunoprotección frente al crecimiento de tumores que expresan el antígeno de diferenciación diana. El término "estimula" hace referencia a la estimulación inicial de una nueva respuesta inmunitaria o a la potenciación de una respuesta inmunitaria preexistente.

40

[0012] De acuerdo con la invención, se trata un sujeto mediante la administración de un antígeno de diferenciación xenogénico del mismo tipo que un antígeno de diferenciación diana expresado por células de tumor de glándula mamaria del sujeto en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria. Por tanto, el antígeno de diferenciación diana es el antígeno Her2/neu encontrado en células mamarías, y el antígeno terapéutico 45 es un antígeno Her2/neu xenogénico.

[0013]

En una realización, el uso de la invención puede incluir las siguientes etapas: (1) inmunización de un animal necesitado de un antígeno xenogénico, por ejemplo Her2/neu de rata expuesto en la SEQ ID NO:2 y codificado por los nucleótidos 106-3885 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1, (2) sensibilización sin aguja 50 de respuestas inmunitarias, (3) recuerdo basado en electrotransferencia y (4) vacunación después de citorreducción tumoral por terapia primaria quirúrgica.

[0014]

En otra realización, se lleva a cabo el uso de la invención en sujetos, incluyendo animales de compañía, sin metástasis (concretamente, en etapas relativamente tempranas de la progresión de la enfermedad 55 carcinoma mamario).

[0015]

En algunas realizaciones, el recuerdo comprende administrar plásmidos que codifican antígenos xenogénicos, por ejemplo aquellos que codifican la proteína Her2 de rata (SEQ ID NO:2).

60 **[0016]**

En algunas realizaciones, el antígeno xenogénico está codificado por un nucleótido que tiene sustituciones nucleotídicas favorables con respecto a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1. Las sustituciones favorables incluyen cualquier cambio que dé como resultado una respuesta inmunitaria mejorada frente a Her2/neu

expresado por células de tumor/carcinoma mamario. Las sustituciones pueden incluir secuencias existentes tales como Her2 de murino (SEQ ID NO:3), Her2 humana (SEQ ID NO:4) o cualquier secuencia de Her2 xenogénica, o un fragmento de las mismas, capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz en un animal diana contra un carcinoma mamario asociado a Her2.

5

[0017] En algunas realizaciones, el recuerdo comprende administrar un antígeno de diferenciación xenogénico.

[0018] En otras realizaciones, el recuerdo comprende administrar un antígeno de diferenciación singénico.

10

[0019] El antígeno de diferenciación xenogénico puede administrarse como un antígeno de diferenciación purificado derivado del organismo fuente. Las proteínas pueden purificarse con este fin a partir de lisados celulares usando procedimientos de cromatografía en columna. Las proteínas con este fin pueden purificarse también a partir de fuentes recombinantes, tales como clones bacterianos o de levadura o líneas celulares de mamífero o insecto que expresan el producto deseado.

15

[0020] La administración del antígeno de diferenciación xenogénico puede lograrse por varias vías. En primer lugar, puede administrarse el antígeno de diferenciación xenogénico como parte de una composición de vacuna que puede incluir uno o más coadyuvantes tales como alúmina, QS21, TITERMAX o sus derivados, coadyuvante de Freund incompleto o completo y relacionados y citocinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, ligando flt-3, interleucina 2, interleucina 4 e interleucina 12 para aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria. La composición de vacuna puede estar en forma de un antígeno de diferenciación xenogénico en una solución o suspensión, o puede introducirse el antígeno de diferenciación terapéutico en un portador lipídico tal como un liposoma. Dichas composiciones se administrarán generalmente por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular. Las composiciones de vacuna que contienen antígeno de diferenciación xenogénico expresado se administran en cantidades que sean eficaces para estimular una respuesta inmunitaria ante el antígeno de diferenciación diana en el sujeto. La cantidad preferida para administrar dependerá de la especie del sujeto y del antígeno específico, pero puede determinarse mediante pruebas preliminares rutinarias en que se procuran dosis crecientes y se mide la extensión de la formación de anticuerpos o la respuesta de linfocitos T mediante ELISA o pruebas similares. Las respuestas de linfocitos T pueden medirse también mediante ensayos inmunitarios celulares tales como citotoxicidad, ensayos de liberación de citocinas y ensayos de proliferación.

20

25

30

[0021] El antígeno de diferenciación xenogénico puede introducirse también de acuerdo con la invención usando una técnica de inmunización de ADN en que se introduce ADN que codifica el antígeno en el sujeto de tal modo que el antígeno de diferenciación xenogénico se exprese por el sujeto. Se combina ADNc que codifica el antígeno de diferenciación con un promotor que sea eficaz para la expresión del polímero de ácido nucleico en células de mamífero. Esto puede lograrse digiriendo el polímero de ácido nucleico con una endonucleasa de restricción y clonándolo en un plásmido que contiene un promotor tal como el promotor de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) o el promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV). Se usa entonces el constructo resultante como vacuna para inmunización genética. El polímero de ácido nucleico podría clonarse también en vectores de plásmido y víricos que son conocidos por transducir células de mamífero. Estos vectores incluyen vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores de virus Vaccinia, vectores de poxvirus y vectores asociados a adenovirus.

35

40

45

[0022] Los constructos de ácido nucleico que contienen el promotor y la región de codificación de antígeno pueden administrarse directamente o pueden empaquetarse en liposomas o recubrirse sobre partículas de oro coloidal antes de la administración. Las técnicas para empaquetar vacunas de ADN en liposomas son conocidas en la materia, por ejemplo, en Murray, ed. "Gene Transfer and Expression Protocols" Humana Press, Clifton, N.J. (1991). De forma similar, se enseñan técnicas para recubrir ADN desnudo sobre partículas de oro en Yang, "Gene transfer into mammalian somatic cells in vivo", *Crit. Rev. Biotech.* 12: 335-356 (1992), y se encuentran técnicas para la expresión de proteínas usando vectores víricos en Adolph, K. ed. "Viral Genome Methods" CRC Press, Florida (1996).

50

[0023] Para inmunización genética, se administran preferiblemente las composiciones de vacuna por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular mediante inyección o bombardeo de partículas accionado por gas, y se suministran en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria en el organismo hospedador. Las composiciones pueden administrarse también *ex vivo* a sangre o células derivadas de médula ósea (que incluyen APC) usando transfección liposómica, bombardeo de partículas o infección vírica (incluyendo técnicas de cocultivo). Se reintroducen entonces de nuevo las células tratadas en el sujeto para inmunizar. Aunque se entenderá que la cantidad de material necesaria dependerá de la inmunogenicidad de cada constructo individual y no puede predecirse *a priori*, el proceso de determinación de la dosificación apropiada para cualquier constructo dado es claro. Específicamente, se administran una serie de dosificaciones de tamaño creciente, partiendo de aproximadamente

60

0,1 µg, y se observa la respuesta inmunitaria resultante, por ejemplo midiendo el título de anticuerpo usando un ensayo ELISA, detectando la respuesta de CTL usando un ensayo de liberación de cromo o detectando la respuesta de TH (linfocitos T auxiliares) usando un ensayo de liberación de citocinas.

5 **[0024]** Una vez se rompe la tolerancia mediante la administración del antígeno de diferenciación xenogénico, pueden emplearse tratamientos posteriores con diferenciación singénica para mantener, y en algunos casos potenciar, la respuesta inmunitaria (véase, Weber, y col., "Tumor immunity and autoimmunity induced by immunization with homologous DNA." *J Clin Invest* 102 (6):1258 (1998)). Por tanto, en una realización de la invención, se trata en primer lugar el sujeto mediante la administración de un antígeno de diferenciación xenogénico
 10 (por ejemplo, durante tres ciclos de tratamiento) y posteriormente mediante la administración de un antígeno de diferenciación singénico (por ejemplo, durante tres ciclos de tratamiento adicionales). Como alternativa a los ciclos de tratamiento que usan diferentes agentes terapéuticos, puede usarse un solo agente terapéutico que contenga tanto antígenos de diferenciación xenogénicos como singénicos. Por tanto, puede emplearse por ejemplo una
 15 mezcla de vectores rHer2-pING y hHer2-pING, o un solo vector que codifica tanto Her2/neu de rata como humana bajo el control de un promotor de tal modo que se expresen en un sujeto canino, para el tratamiento de tumor de glándula mamaria en caninos. Hay vectores disponibles comercialmente, por ejemplo en Stratagene y otras compañías, que pueden expresar dos genes independientes. Comúnmente, estos vectores usan un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, entre los dos genes. Este enfoque tiene la ventaja de requerir la aprobación de solo un
 20 único agente terapéutico.

[0025] Se describirá ahora la invención además con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1- Construcción del plásmido de expresión de Her2/neu

25 **[0026]** Se amplificó por PCR el dominio extracelular de HER2/neu de rata (nucleótidos 17-3799 de la SEQ ID NO:1) a partir del plásmido pCMVneuNT (Amici y col., 1998) usando los cebadores de codificación: 5'-CGAAGCTTACCATGGAGCTGGCGGCCTGG-3' (SEQ ID NO:6) e inverso: 5'-CGGAATTCTTATGTCACCGGGCTGGC-3' (SEQ ID NO:7). Se clonó el fragmento HindIII-EcoRI en pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA; y FIG. 2). Se ha descrito anteriormente la secuencia original de ADNc de neu de rata
 30 (Bargmann y col., 1986), y se expone en la presente memoria en la SEQ ID NO:1, con la secuencia de codificación de los nucleótidos 17 a 3799. Se subclonó entonces la secuencia de codificación de HER2/neu de rata en el vector pING (Bergman y col., *Clin Cancer Res*, 9: 1284-1290, 2003, esqueleto representado en la FIG. 3; mapa representado en la FIG. 3A; y secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5), procurando HER2/neu-pING de rata.

35 Ejemplo 2 – Inmunización de caninos positivos de tumor de glándula mamaria (MGT) con pING-rHer2

[0027] En este ensayo, se inscribieron 10 perros con MGT y se inmunizaron con 100 µg de ADN de pING-rHer2 por dosis. Se expone en la Tabla 1 la caracterización para estos perros y se expone en la Tabla 2 la estadificación tumoral.

40

Tabla 1. Características de los animales de ensayo

	Edad (años)	Raza	Peso (kg)
MGT 01	9	Yorkshire terrier	1,75
MGT 02	13	Mixta	9,8
MGT 03	12	Yorkshire terrier	5
MGT 04	7	Lhasa Apso	11
MGT 05	10	Maltesa	3,35
MGT 06	12	Cavalier King Charles Spaniel	9
MGT 07	8	Pomerania	2,8
MGT 08	12	Maltesa	3,9
MGT 09	13	Pomerania	2,7
MGT 10	12	Yorkshire terrier	3
Mediana	12		3,6

Tabla 2. Estadificación tumoral

	Tamaño de tumor (cm)	Tipo de MGT	Etapas
MGT 01	2x2x4 0,2x0,2x0,2 0,2x0,3x0,2 0,1x0,1x0,1 0,5x0,5x0,5 0,2x0,2x0,2 0,5x0,5x0,5	Carcinoma tubulopapilar	T ₃ N ₀ M ₀
MGT 02	12x10x8 5x3x1,5 1x1x1 1x1x0,5 0,5x0,1x0,1	Carcinoma rico en lípidos	T ₃ N ₀ M ₀
MGT 03	5,6x4,8x4,6 1,8x1,5x1,2	Carcinoma tubulopapilar con fibroadenoma	T ₃ N ₀ M ₀
MGT 04	4,2x5,6x2,5	Carcinoma tubulopapilar	T ₃ N ₀ M ₀
MGT 05	1,2x1x0,5 1x1,4x0,5 1x1x0,4 0,5x0,5x0,5	Adenoma simple	T ₁ N ₀ M ₀
MGT 06	10x4x3	Adenoma rico en lípidos con fibroadenoma	T ₃ N ₀ M ₀
MGT 07	1x1x1 0,5x0,5x0,5	Tipo complejo	T ₁ N ₀ M ₀
MGT 08	1x1x1 0,5x0,5x0,5	Tipo complejo	T ₁ N ₀ M ₀
MGT 09	2,5x2x1 1,5x2x1	Tipo complejo	T ₁ N ₀ M ₀
MGT 10	1x1x1 0,5x0,5x0,5 0,1x0,1x0,1	Carcinoma tubulopapilar	T ₁ N ₀ M ₀

- 5 **[0028]** Como se indica, este grupo incluía cinco perros en etapa I y cinco en etapa II, que recibieron todos tres dosis de vacuna a intervalos de dos semanas. Se administraron la primera y segunda dosis con el dispositivo transdérmico VITAJET™ y la tercera dosis por inyección intramuscular simultáneamente con electroporación. Se inició la vacunación después de la retirada quirúrgica del MGT con ovariectomía (OHE) simultánea. Todos los perros eran negativos de metástasis regional en nódulo linfático y pulmonar. Se calcularon los tiempos de supervivencia libre de enfermedad y global usando el día de cirugía como el día 0, con los resultados presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Tiempo de supervivencia libre de enfermedad y global

Perro	Etapas de OMS	Supervivencia libre de enfermedad		Tiempo de supervivencia global (días)	Resultado clínico
		Recurrencia	Metástasis		
MGT 05	I	703	703	703	Vivo
MGT 07	I	669	669	669	Vivo
MGT 08	I	548	548	548	Vivo
MGT 09	I	536	536	536	Vivo
MGT 10	I	482	482	482	Muerto
Perros de etapa I		548	548	548	-
MGT 01	III	779	779	779	Vivo
MGT 02	III	212	182	212	Muerto
MGT 03	III	762	762	762	Vivo
MGT 04	III	575	381	720	Vivo con met.
MGT 06	III	686	686	686	Vivo
Perros de etapa III		686	686	720	-
Mediana de todos los perros		622	609	678	

- 15 **[0029]** Se identificó un grupo de 19 perros como casos de control históricos. Todos los perros de control experimentaron la retirada quirúrgica de MGT con OHE simultánea y eran negativos de metástasis regional en nódulo linfático y pulmonar. Este grupo incluía 7 perros en etapa I, 3 en etapa II y 9 en etapa III. Se calcularon los tiempos de supervivencia libre de enfermedad y global para estos perros usando el día de cirugía como día 0. Se expone la caracterización de estos perros en la Tabla 4 y se expone la estadificación tumoral para cada perro en la

Tabla 5. Se calcularon los tiempos de supervivencia libre de enfermedad y global para el grupo de control y se presentan en las FIG 1A-1C.

Tabla 4. Caracterización del perro de control

	Número de caso	Edad (años)	Raza	Peso (kg)
1	9403460	7	Mixta	1,75
2	9404023	14	Caniche	2,5
3	9405132	14	Yorkshire	2,3
4	9409179	12	Spitz finlandés	6,8
5	9409043	14	Caniche	3,2
6	9500057	9	Lhasa Apso	6,5
7	9500890	14	Maltesa	6
8	9500959	15	Cocker	14
9	923543	11	Husky siberiano	16
10	9405082	13	Caniche	3,9
11	9505202	9	Mixta	12
12	9600998	10	Maltés	4,6
13	9700451	13	Maltés	2,7
14	892285	12	Yorkshire	1,6
15	9502927	14	Maltés	3,2
16	9405356	10	Cocker	12
17	9409104	11	Maltés	3,8
18	9503957	6	Schnauzer miniatura	4
19	9404023	14	Caniche	3
	Mediana	12		3,9

5

Tabla 5. Estadificación tumoral para perros de control

	Nº clínico	Tamaño tumoral	Tipo de MGT	Etapas
1	9403460	6x6x7	Carcinoma complejo	T ₃ N ₀ M ₀
2	9404023	3x3x3	Carcinoma espinocelular	T ₂ N ₀ M ₀
3	9405132	7x4x7 2x2x2 0,3x0,2x0,2 0,5x0,5x0,5	Carcinoma simple o complejo	T ₃ N ₀ M ₀
4	9409179	13x12x12 6x7x7 1x1x1	Carcinoma simple con carcinoma espinocelular	T ₃ N ₀ M ₀
5	9409043	3,5x2,1 3x1,5x1	Carcinoma tubulopapilar	T ₂ N ₀ M ₀
6	9500057	3x2x2 2x1x1	Carcinoma tubulopapilar	T ₂ N ₀ M ₀
7	9500890	8x3x1	Carcinoma simple	T ₃ N ₀ M ₀
8	9500959	8x3x2 2x1x0,5	Adenocarcinoma	T ₃ N ₀ M ₀
9	923543	5x5x4 0,2x0,2x0,2	Carcinoma simple	T ₃ N ₀ M ₀
10	9405082	5x4x3,5 3x3,5x3	Carcinoma simple	T ₃ N ₀ M ₀
11	9505202	0,3x0,3x0,3 1x1x0,5 0,4x0,4x0,4	Carcinoma tubulopapilar	T ₁ N ₀ M ₀
12	9600998	0,5x0,5x0,4 1x0,5x0,5	Carcinoma	T ₁ N ₀ M ₀
13	9700451	1x1x1 1x1x1	Carcinoma tubulopapilar	T ₁ N ₀ M ₀
14	892285	0,5x0,8x0,3 1x0,8x0,5	Carcinoma en tumor mixto benigno	T ₁ N ₀ M ₀
15	9502927	5x4x4 0,5x0,5x0,5	Carcinoma en tumor mixto benigno	T ₃ N ₀ M ₀
16	9405356	10x3x1,5	Carcinoma tubulopapilar	T ₃ N ₀ M ₀
17	9409104	1x1x1 0,5x0,5x0,5 2x2x2	Adenocarcinoma	T ₁ N ₀ M ₀
18	9503957	2x2x2 0,3x0,3x0,3	Adenocarcinoma, tipo complejo	T ₁ N ₀ M ₀
19	9404023	2x2x1	Adenocarcinoma	T ₁ N ₀ M ₀

10 **[0030]** Philibert y col. (2003) revisaron las estadísticas de supervivencia para 97 perros con MGT y reseñaron que los tiempos de supervivencia medianos para 41 perros con MGT menor de 3 cm de diámetro eran de 22 meses (~666 días) frente a 14 meses (~424 días) para 56 perros con MGT mayor de 3 cm de diámetro. En ausencia de afectación o metástasis del nódulo linfático, un tamaño tumoral menor de 3 cm se correlaciona con enfermedad de etapa I y mayor de 3 cm se correlaciona con un estado patológico de etapa II o mayor. No encontraron diferencia en el tiempo de supervivencia para los perros en las etapas II, III o IV.

15 **[0031]** El tiempo de supervivencia global mediano para todos los perros tratados con vacuna de pING-rHer2 es de 678 días. Esto era significativamente mayor en comparación con los datos históricos de los 19 perros proporcionados por NTU, que indican un tiempo de supervivencia global mediano de 300 días, y con los datos publicados por Philibert y col. (2003), que indican 424 días de tiempo de supervivencia global para los perros con

MGT de etapa II o mayor.

[0032] La vacuna de ADN de pING-rHer2 se orientará a perros y gatos con tumores que se muestra que sobreexpresan el antígeno Her2 basándose en análisis del tejido tumoral, usando ensayos de expresión en tejido de Her2 existentes. La vacuna se administrará usando el dispositivo transdérmico Vetjet™ para suministrar 100 µg de ADN al muslo medial de perros o al muslo lateral de gatos, a intervalos de dos semanas para cuatro dosis. Los perros y gatos que sobrevivan recibirán una dosis de recuerdo cada 6 meses.

REIVINDICACIONES

1. Un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por células mamarias de un perro, para uso en el tratamiento de carcinoma/tumor mamario canino en un perro que padece carcinoma/tumor mamario canino, donde el antígeno Her2/neu xenogénico está en una cantidad inmunológicamente eficaz y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres, y donde el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria en perro.
2. El antígeno Her2/neu xenogénico de la reivindicación 1 para uso según la reivindicación 1, donde el antígeno de diferenciación asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico es Her2/neu de rata.
3. Un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por las células de glándula mamaria de un perro, para uso en el tratamiento de tumor de glándula mamaria canina en un perro que padece carcinoma/tumor de glándula mamaria canina, donde el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica un antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico en perro, y donde el vector tiene una secuencia que comprende 106-3885 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres.
4. El antígeno Her2/neu xenogénico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde:
- 1) se citorreduce quirúrgicamente el carcinoma asociado a Her2/neu;
 - 2) se administra una inmunización sensibilizadora que comprende un primer plásmido que codifica un antígeno Her2/neu xenogénico; y
 - 3) se administra una inmunización mediante electrotransferencia/electroporación; donde el recuerdo es el primer plásmido o es un segundo plásmido capaz de expresar *in vivo* en un canino un antígeno Her2/neu xenogénico diferente, incluyendo aquellos codificados por las SEQ ID NO:3 o 4, o es un vector recombinante capaz de expresar *in vivo* cualquier proteína Her2/neu que sea capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria terapéuticamente eficaz contra Her2/neu heterólogo expresado por el carcinoma asociado a Her2/neu.
5. El antígeno Her2/neu xenogénico de acuerdo con la reivindicación 4 para uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde:
- 1) la inmunización sensibilizadora se administra sin aguja;
 - 2) el primer plásmido es capaz de expresar *in vivo* en un canino una secuencia expuesta en la SEQ ID NO:2;
 - 3) la inmunización de recuerdo comprende la administración del plásmido de la etapa 2.
6. El antígeno Her2/neu xenogénico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde se proporciona la inmunización de recuerdo a los caninos supervivientes una vez cada 3 a 6 meses.
7. El antígeno Her2/neu xenogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde se administra el antígeno de diferenciación xenogénico mediante la inmunización con ADN del sujeto con ADN que codifica el antígeno de diferenciación xenogénico en un vector de plásmido no vírico que comprende ADN que codifica el antígeno de diferenciación xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno de diferenciación xenogénico.
8. El antígeno Her2/neu xenogénico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1, 2 o 7 efectuado simultáneamente a la resección de un tumor de glándula mamaria (MGT).
9. Un vector que es capaz de expresar *in vivo* en un canino la proteína expuesta en la SEQ ID NO:2, para uso en el tratamiento de carcinoma/tumores mamarios caninos en un perro que padece carcinoma/tumor mamario canino, donde el carcinoma/tumor mamario canino es un carcinoma/tumor mamario asociado a Her2/neu, donde el vector se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres.
10. Uso de un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por células de mamífero de un perro, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de carcinoma/tumor

mamario canino en un perro que padece carcinoma/tumor mamario canino, donde el antígeno Her2/neu xenogénico está en una cantidad inmunológicamente eficaz y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres, y donde el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria en perro.

11. Uso de un antígeno Her2/neu xenogénico que es xenogénico de un antígeno Her2/neu expresado por células de glándula mamaria de un perro, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumor de glándula mamaria canina en un perro que padece carcinoma/tumor de glándula mamaria canina, donde el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria xenogénico es un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el antígeno Her2/neu asociado a carcinoma/tumor de glándula mamaria terapéutico xenogénico bajo el control de un promotor que promueve la expresión del antígeno Her2/neu asociado a tumor de glándula mamaria xenogénico en perro, y donde el vector tiene la secuencia que comprende 106-3885 de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 y el antígeno Her2/neu xenogénico se administra después de la retirada quirúrgica de tumores en sujetos que padecen dichos cánceres.

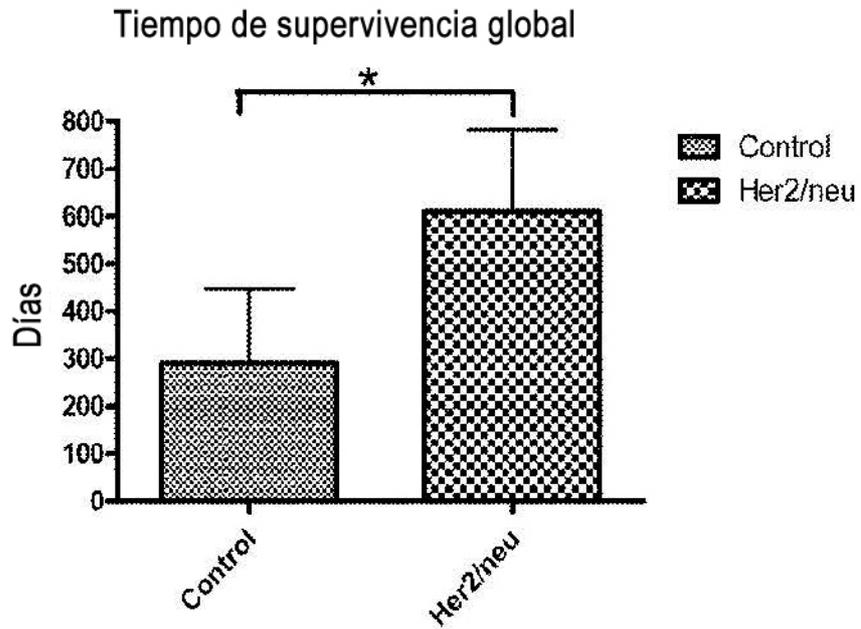


FIG. 1A

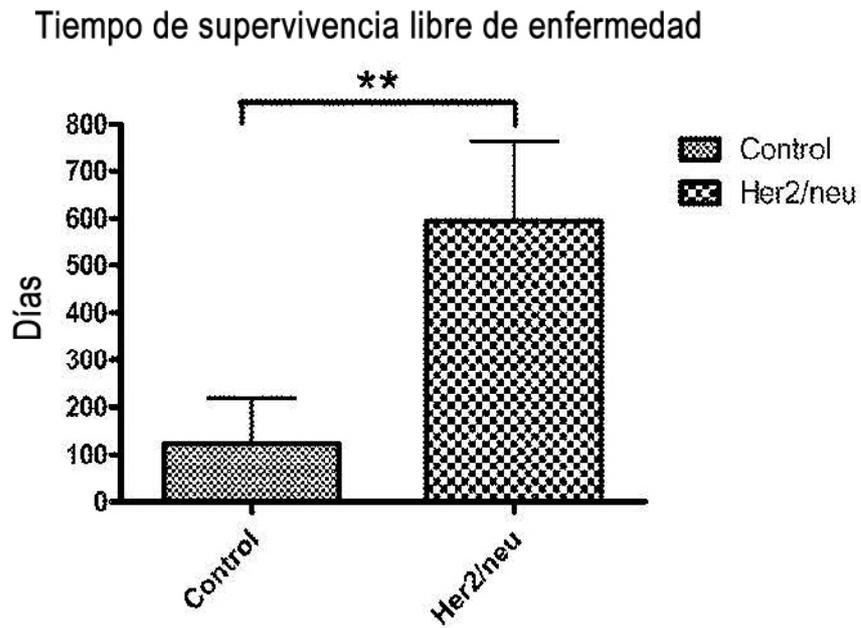


FIG. 1B

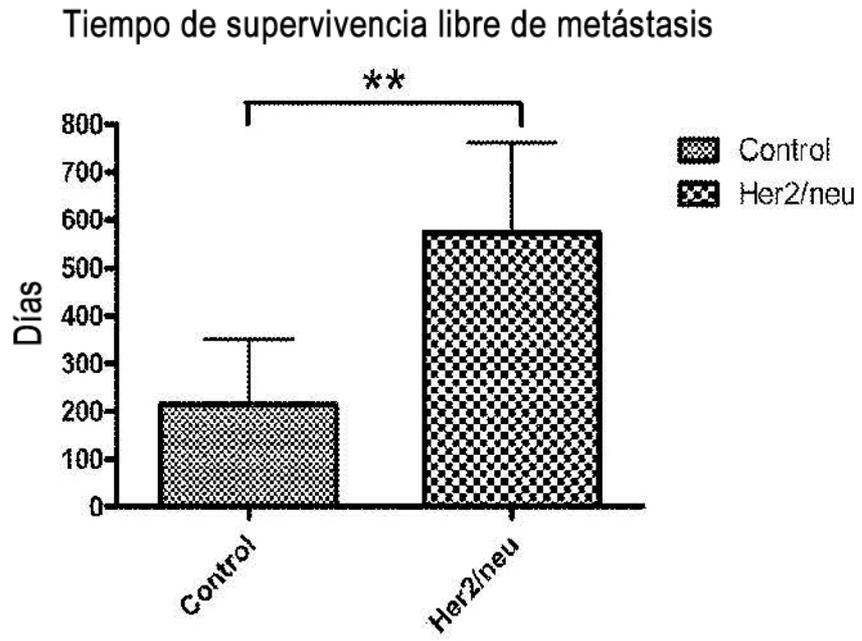


FIG. 1C

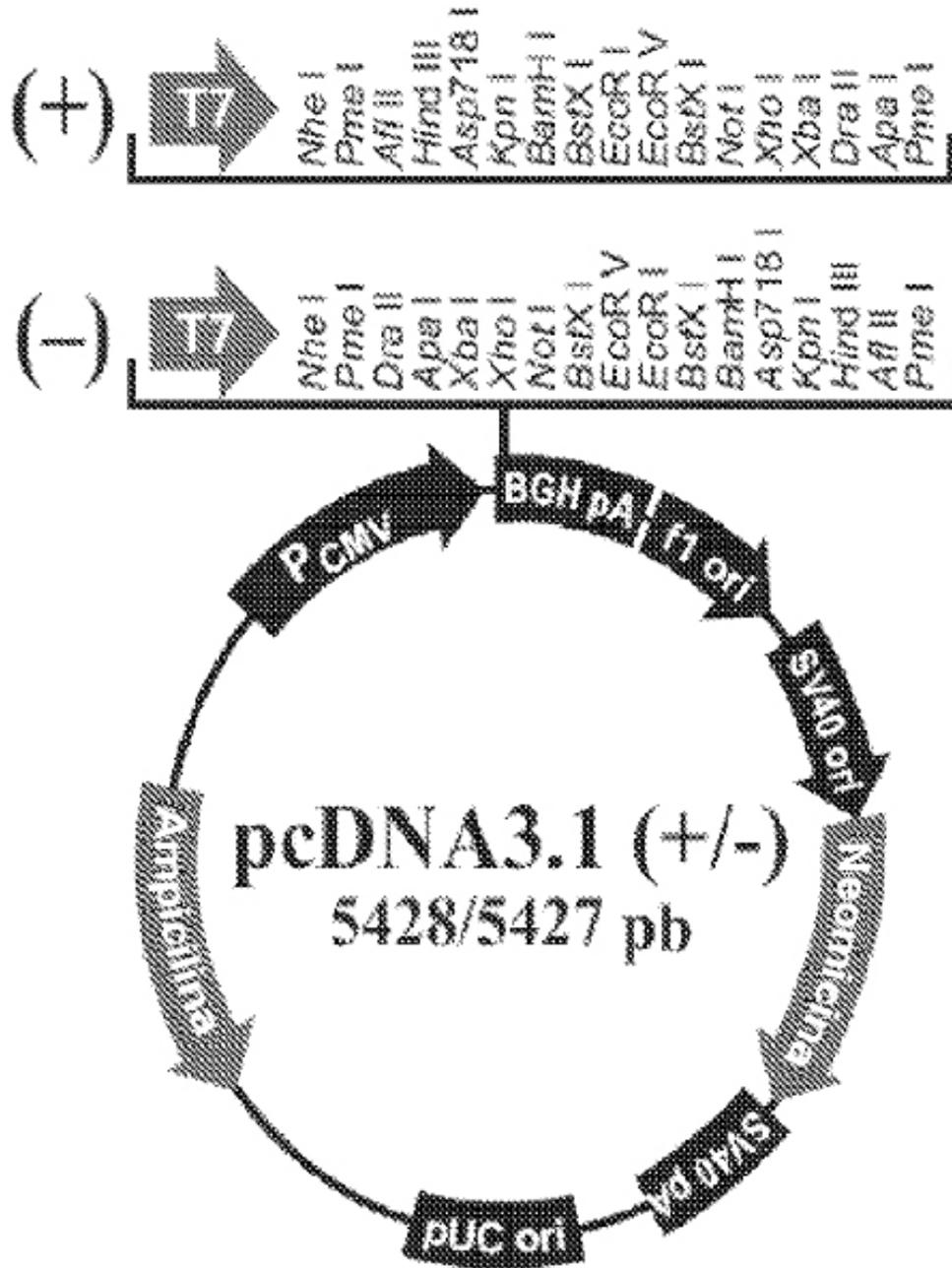


FIG. 2

ES 2 614 880 T3

```

1 ttggetattg gccattgcat acgttgtatc tatatcataa tatgtacatt
51 tatattgect catgtccaat atgaaccgca tgttgacact gattattgac
101 tagttattaa tagtaataa ttaccgggtc attagttcat agcccatata
151 tggagttoeg cyttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg
201 cccaaacgacc cccgccatt gacgtcaatg atgacgtatg tcccatagt
251 aacgccaaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttaacgt
301 aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtccgccc
351 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcact atgcccagta
401 catgacctta cgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca
451 tcgctattac catgggtgat cggttttggc agtacacca tgggctgga
501 tagcggtttg actcacgggg atttccaaat ctccacccca ttgacgtcaa
551 tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaaag ggaactttca aaatgtcgta
601 ataacccccg cccgttgacg caaatggggg gtaggcgtgt accgtgggag
651 gtctatataa gcagagctcg tttactgaac cgtcagatcg cctggagacg
701 ccatocacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgtaccagcc
751 lcccgggccg ggaacgggag allcgaaacc ggallccccg lgcgaagagl
801 gacgtaagta cccctatag actotataag cacacccctt tggctottat
851 gcatctata ctgtttttgg cttcgggcct atacacccc gcttcottat
901 gctataggtg atggtatagc ttagcctata ggtgtgggtt attgaccatt
951 attgaccact cccctattgg tgaccatact ttccattact aatccataac
1001 atggctottt gccacaacta tctotattgg ctatatgcca atactotgtc
1051 clcagagac lgacacggac lclglallll lacaggalgg gglcccally
1101 attatttaca aattcacata tacaacaacg ccgtccccg tgcocgagt
1151 ttttattaaa catagcgtgg gatctccaag cgaatctcgg gtacgtgttc
1201 cggacatcgg ctctctccg gtacggcgg agcttcaca tccagaccct
1251 ggtcccatgc ctccagcggc tcatcgtccc tcggcagccc cttgtctcta
1301 acagtggagg ccagacttag gcacagcaca atgcccacca ccaccagtgt
1351 gccgcacaag gccgtggcgg tagcctatct gtctgaaaat gagctcggag
1401 attggcctcg caccgctgac gcacatggaa gacttaaggc agcggcagaa
1451 gaagatgcag gcagctgagt tgttctatc tgataagagt cagaggtaac
1501 tcccgttcgg gtctctgtaa cggctgagcg cagtgtagcc tgagcagtac
1551 tcgttctgc cgcgcgcgcc accagacata atagctgaca gactaacaga
NcoI (1611) PstI (1624)
1601 ctgttctctt ccatgggtct tttctgact caccgtccac gcgttaatac
1651 gactcactat agggagacc aagctggcta gcgtttaaac ttaagcttgg
BamHI (1711) EcoRI (1734)
1701 taccgagctc ggatccaacta gtccagtgtg gtggaattcc ggaaga

```

FIG. 3 (1/4)

ES 2 614 880 T3

3338 aaggcttagg caatagagta gggccaaaa gcctgacctc actctaacte
 3388 aaagtaatgt ccaggttccc agagaatato tgctggattt tctctgtaaa
 3438 gaccatttgc aaaattgtaa cctaatacaa agtgtagcct tcttccaact
 3488 caggtagaac acacctgtct ttgtcttget gttttcactc agccccctta
 3538 acattttccc ctaagcccat atgtotaacg aaaggatget atttggtaat
 3588 gaggaactgt tatttctatg tgaattaaag tgctcttatt ttaaaaaacc
 3638 ggaattctgc agatatccag cacagtggcg gccgctcgag tctagagggc
 3688 ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg tgccctctag tggccagcca
 3738 tctgttggtt gcccccccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac
 3788 tcccactgtc ctttccctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgctctga
 3838 gtagctgtca ttctattctg gggcgtggcg tggggcagga cagcaagggg
 3888 gaggattcgg aagacaatag caggcatgct ggggatgcag gggggggggg
 3938 gccctgaggt ctgcctcgtg aagaaggctt tgctgactca taccaggcct
 3988 gaatgccccc atcatccagc cagaaaagta gggagccacg gttgatgaga
 4038 gctttgttgt aggtggacca gttcctgatt ttgaactttt gctttgccac
 4088 ggaacgggcl gggllglogg gaagalggcl galclgalcc lccaacclcag
 4138 caaaagtctg atttattcaa caaagccgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa
 4188 tgctctgcca gtgttacaac caattaacca attctgatta gaaaaactca
 4238 tcgagcatca aatgaaactg caatttatto atatcaggat tatcaatacc
 4288 atatttttga aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgagggc
 4338 agttccatag gatggcaaga tctcgttato ggtctcgat tccgactcgt
 4388 ccaacalcaa lacaacclal laallcccc loglcaaaaa laagg.lalcl
 4438 aagtggaaa tcaccatgag tgaccactga atccggtgag aatggcaaaa
 4488 gcttatgcat ttctttccag acttcttcaa caggccagcc attacgctcg
 4538 tcatcaaaat cactcgcato aaccaaaacc ttattcattc g-gat-gcgc
 4588 ctgagcgaga cgaataaccg gatcctctgtt aaaaggacaa ttaaaaacag
 4638 gaatcgaatg caaccggcgc aggaaccctg ccagcgcate aacaaatatt
 4688 tcacctgaat caggatatto ttctaatacc tggaaatgctg ttttcccggg
 4738 gatcgcagtg gtgagtaacc atgcacatc aggagtagcg aaaaaatgct
 4788 tgatcgtcgg aagagccata aattccgta gccagtttag tctgaccatc
 4838 tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatggt tcagaaacaa
 4888 ctctcgcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacc-gatt
 4938 gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaato agcatccatg
 XhoI (5006)
 4988 ttggaattta atcgcggcct cgagcaagac gtttcccgtt gaataaggct
 5038 cataacacc cttgtattac tgtttatgta agcagacagt tctat-gttc
 5088 atgatgatat atttttatct tgtccaatgt aacatcagag a-tttgagac
 PstI (5162)
 5138 acaacgtggc tttccccccc cccctgcag cgtttcttcc ttttcccac

FIG. 3 (2/4)

ES 2 614 880 T3

5188 cccaccccc aagttcgggt gaaggcccag ggctcgcagc caacgcgcgg
5238 gcggcagccc ctgccatagc ctacaggttac tcatatatac tctagattga
5288 tttaaaactt cttttttaat ttaaaaggat ctagggtgaag atcctctttg
5338 ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt ccaactgagc
5388 tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tottgagatc cttttttct
5438 gcgcgtaatc tgetgettgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg
5488 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaaactggc
5538 ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt agccgtagtt
5588 aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gctacatac ctgcctcgc
5638 taatcctctt accagtggct gctgcagtg gcgataagtc ggtcctacc
5688 gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg
5738 aacgcggcgt tctgtcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg
5788 aactcagata cctacagcct gagctatgag aaagcgcac gcttcccga
5838 gggagaaagg cggacaggta tccgctaagc ggcagggtcg gaacaggaga
5888 gcgcacgagc gagcttcag ggggaaacc ctggtatctt tatagcctg
5938 cggccllccg ccaccclcga cllgagcglc gllllllglg a_gcclglca
5988 ggggcgcgga gcctatggaa aaaccgcagc aaccgcgctt tttacggtt
6038 cctgcccttt tgetggcctt ttgctccat gttctttcct gcgttatccc
6088 ctgattctgt ggataaccgt attaccgcca tgcattagtt actaatagta
6138 atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag tccgcggtta

BglI (6206)

6188 calaacllac gglaaalggc ccgcclggcl gaccgcccac cgacccccgc
6238 ccattgacgt caataatgac gagatctgat ataggtgaca gacgatatga
6288 ggctatatcg ccgatagagg cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat
6338 atcgatctat acattgaatc aatattggca attagccata ttagtcattg
6388 gttatatagc ataatcaat a

FIG. 3 (3/4)

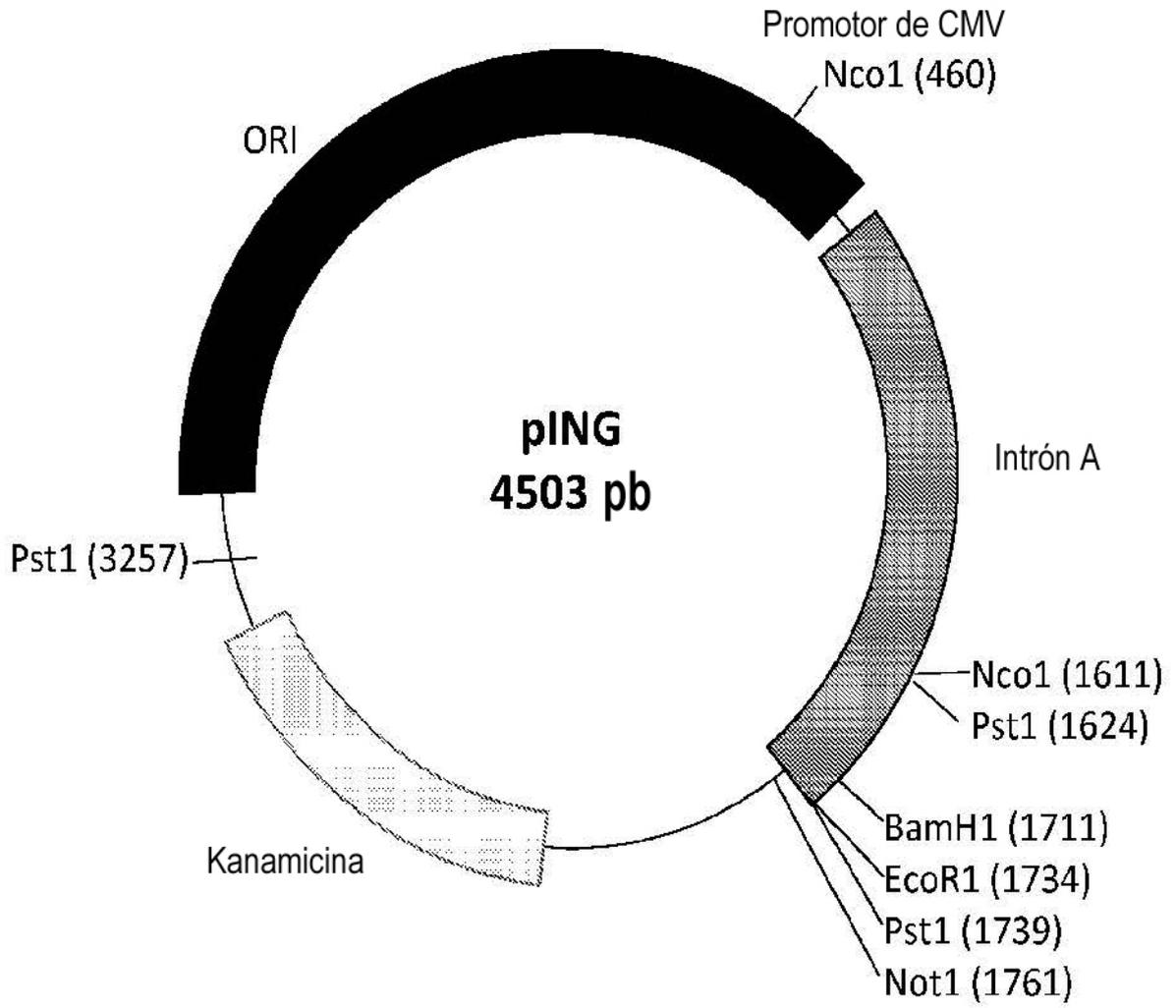


FIG. 3 (4/4)