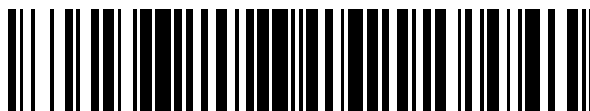


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 156**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/80** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/EP2012/058219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150326**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12719960 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2705052**

54 Título: **Proteínas 2B6 mutantes de citocromo P450 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**05.05.2011 EP 11305530**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.03.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (25.0%);  
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%) y  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**DE WAZIERS, ISABELLE;  
TOUATI, WALID;  
DIRY, MONIQUE;  
FLINOIS, JEAN-PIERRE;  
DANSETTE, PATRICK y  
BEAUNE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 660 156 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

Proteínas 2B6 mutantes de citocromo P450 y usos de las mismas

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a proteínas 2B6 mutantes del citocromo humano P450 (CYP2B6), y proteínas de fusión que comprenden dichas proteínas CYP2B6 mutantes. La invención también se refiere al uso de dichas proteínas y proteínas de fusión en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades, en particular a través de la terapia enzimática con profármacos, así como métodos de tratamiento del cáncer y otras enfermedades.

**ANTECEDENTES**

15 **[0002]** La familia de enzimas del citocromo P450 (CYP) es un grupo diverso de enzimas, la mayoría de las cuales catalizan la oxidación de sustancias orgánicas, incluyendo intermediarios metabólicos y toxinas, tales como fármacos. Las CYP catalizan reacciones de oxidación a través de la transferencia de electrones desde NADPH por una reductasa, por lo general la NADPH-citocromo P450 reductasa.

20 **[0003]** Las CYP son las principales enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos y bioactivación. Se han utilizado en terapia enzimática con profármacos, una terapia tumoral dirigida a reducir los efectos secundarios sistémicos de la medicación antitumoral. La medicación se administra como un profármaco no citotóxico y se convierte en su forma activa mediante las enzimas metabolizadoras de fármacos que están dirigidas a las células tumorales. Generalmente, las células tumorales se transfectan con un gen que codifica la enzima que es capaz de bioactivar el profármaco inactivo, seguido de un tratamiento del paciente con el profármaco (terapia enzimática con profármacos dirigidos a genes o GDEPT). Los vectores virales se utilizan a menudo para la introducción de transgenes, una estrategia conocida como terapia enzimática con profármacos dirigida a virus (VDEPT). Esta estrategia puede aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad del tratamiento con fármacos, reduciendo así los efectos secundarios y mejorando la eficacia.

30 **[0004]** CYP2B6 metaboliza una gama de sustancias tóxicas, incluyendo la nicotina y los medicamentos contra el cáncer ciclofosfamida, ifosfamida y tiotepa. Debido a esta actividad, se ha utilizado CYP2B6 en los modelos de VDEPT utilizando el agente quimioterapéutico ciclofosfamida (CPA), que requiere la activación por CYP2B6 con el fin de hacerla citotóxica. En pacientes tratados con CPA en la forma estándar, la activación por CYP2B6 se produce en el hígado, y el fármaco activo se transporta entonces al sitio del tumor a través de la corriente sanguínea. Dicha administración no específica puede causar efectos secundarios graves debido a la actividad citotóxica sobre células no tumorales, incluyendo cardiotoxicidad, toxicidad renal, supresión de la médula ósea y neurotoxicidad. La CYP2B6 es por lo tanto un candidato ideal para VDEPT, y se ha utilizado con éxito en modelos in vivo de VDEPT utilizando ensayos de citotoxicidad (Waxman et al, Drug Metab Rev 1999, 31: 503-522; Tychopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508).

40 **[0005]** Una de las desventajas del uso de CYP2B6 en una estrategia de VDEPT es la afinidad relativamente baja de CYP2B6 para CPA, que muestra una  $K_m$  elevada. La modificación de la enzima CYP2B6 para aumentar su eficacia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) para la 4-hidroxilación de CPA, por lo tanto, se ha intentado a fin de mejorar el efecto terapéutico de CYP2B6 cuando se utiliza en VDEPT. Los inventores han producido previamente un doble mutante de sitio activo (I114V/V477W) mediante mutagénesis del sitio activo de CYP2B6 que tenía un aumento de cuatro veces en la eficiencia de la 4-hidroxilación de CPA en comparación con la enzima de tipo natural, principalmente como resultado de un aumento de la afinidad de la enzima (Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133).

50 **[0006]** Otra posibilidad para mejorar la eficiencia de VDEPT mediada por CYP2B6 es cotransfectar células tumorales con NADPH citocromo P450 reductasa (RED) a fin de suministrar CYP2B6 con electrones, ya que la actividad de la reductasa celular basal puede ser insuficiente y por lo tanto puede ser un factor limitante para la actividad de CYP2B6. Un trabajo anterior por los inventores ha demostrado que el suministro de RED externa de esta manera puede aumentar la toxicidad mediada por CYP2B6. Se utilizaron con éxito dos estrategias para complementar la actividad de RED intratumoral y para aumentar la actividad de CYP2B6: la cotransfección de las proteínas RED y CYB2B6 separadas, y la creación de una proteína de fusión CYP2B6-RED que tiene actividad de 4-hidroxilasa y actividad de reductasa (Tychopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508).

60 **[0007]** Estos estudios han demostrado que hay margen para mejorar la eficiencia de CYP2B6 cuando se usa en la terapia enzimática con profármacos dirigida. Tal mejora podría permitir usar fármacos conocidos en nuevas dianas tumorales, así como mejorar la respuesta de dianas conocidas de la terapia con medicamentos. La modulación de la actividad CYP2B6 es por tanto de gran importancia clínica potencial y representa una potencial herramienta útil en el tratamiento del cáncer.

**CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

5 [0008] Los inventores han producido una nueva proteína CYP2B6 humana mutante que tiene una afinidad por CPA 8 veces mayor que la de la enzima de tipo natural, a la vez que conserva la misma  $V_{max}$ . El mutante se obtuvo mediante la mutación de isoleucina en la posición 114 a valina, la leucina en la posición 199 a metionina y la valina en la posición 477 a triptófano. Los inventores han demostrado que la proteína mutante conserva su actividad cuando se produce como parte de una proteína de fusión con la proteína de fusión NADPH citocromo p450 reductasa, y que la proteína de fusión puede conferir actividad citotóxica en CPA contra líneas celulares tumorales que no responden a CPA solas. También han demostrado que el enlazador de la proteína de fusión puede desempeñar un papel en la mejora de la eficacia de la proteína de fusión; en particular, mediante la mejora de actividad de la reductasa.

15 [0009] La proteína mutante triple CYP2B6 creada por los inventores fue 10 veces más eficiente en la metabolización de CPA en metabolito citotóxico que la proteína de tipo natural, una mejora mucho mayor que la obtenida con el mutante doble descrito anteriormente. El triple mutante sensibilizó muy eficazmente células tumorales resistentes a CPA a CPA y dio como resultado reducciones espectaculares en el tamaño del tumor en modelos animales. El triple mutante puede así ser utilizado para hacer que los tumores resistentes a los fármacos sean sensibles al tratamiento y se reduzca la cantidad de fármaco necesaria para el tratamiento tumoral efectivo, reduciendo el riesgo de efectos secundarios.

20 [0010] La invención es como se define en las reivindicaciones.

25 [0011] Por lo tanto, la memoria proporciona una proteína CYP2B6 que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 1 (SEQ ID No 1), o una variante o fragmento de la misma, en la que dicha variante o fragmento comprende los residuos 114V, 199M y 477W como se muestra en figura 1 (SEQ ID No 1). Preferiblemente, dicha variante o fragmento retiene una actividad biológica de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la figura 1 (SEQ ID No 1).

30 [0012] También se proporciona una proteína de fusión que comprende (i) una proteína CYP2B6 según la invención, y (ii) una proteína NADPH-citocromo P450 reductasa como se define en el presente documento. En un aspecto preferido, dicha proteína CYP2B6 comprende los aminoácidos 1 a 490 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1), y/o dicha NADPH-citocromo P450 reductasa comprende los aminoácidos 57-678 de la figura 2 (SEQ ID No 2). En un aspecto, la proteína CYP2B6 está en dirección 5' de la NADPH-citocromo reductasa P450. En algunos aspectos, las proteínas están separadas por un enlazador, preferiblemente un enlazador polipeptídico. En algunos aspectos, el enlazador comprende Ser<sub>n</sub>Thr, en el que n puede ser de 1 a 7, opcionalmente 3, opcionalmente 5.

35 [0013] También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas descritas en este documento, incluyendo todas las variantes, fragmentos y proteínas de fusión descritas.

40 [0014] También se proporciona un vector que comprende dicho ácido nucleico, por ejemplo un vector de expresión y/o un vector capaz de transfectar una célula huésped, tal como una célula tumoral. Los vectores adecuados incluyen ARN, ADN, vectores virales y retrovirales.

45 [0015] También se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector. Una célula huésped puede ser, por ejemplo, una levadura, célula bacteriana, de mamífero o planta. Cuando la célula es una célula de mamífero, dicha célula preferiblemente no está comprendida dentro de un cuerpo humano.

50 [0016] También se proporciona un procedimiento de fabricación de una proteína de fusión, tal como se describe en el presente documento, que comprende cultivar dicha célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína, y, opcionalmente, purificar dicha proteína del cultivo celular.

55 [0017] También se proporciona una proteína, proteína de fusión o vector de acuerdo con la invención para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. El tratamiento puede ser un tratamiento de cáncer, por ejemplo cáncer de la cabeza y cuello, leucemia, linfoma, gliosarcoma, cáncer pancreático, cáncer de mama y melanoma. En aspectos preferidos, dicha proteína o vector se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, ya sea simultáneamente o secuencialmente. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico se administra en forma de profármaco.

60 [0018] También se proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende la administración de una proteína, proteína de fusión o vector de acuerdo con la invención, a un paciente, preferiblemente un paciente en necesidad de los mismos, en combinación con un agente quimioterapéutico, ya sea secuencial o simultáneamente. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico se administra en forma de profármaco.

65 *Terapia enzimática con profármacos*

**[0019]** Las proteínas en el contexto de la la invención pueden usarse en la terapia enzimática con profármacos, incluyendo la terapia con profármaco dirigida por anticuerpos (ADEPT), y la terapia con profármacos dirigida por genes (GDEPT), tales como la terapia enzimática con profármacos dirigida por virus (VDEPT). El principio de estos diferentes enfoques es idéntico: un agente quimioterapéutico se administra en forma de profármaco inactivo, y se convierte dentro del cuerpo en un fármaco activo mediante una enzima que se dirige a las células tumorales. En GDEPT, las células tumorales se transfectan con un vector, tal como un virus, que expresa la enzima deseada dentro de las células tumorales. En ADEPT, la enzima se suministra a las células tumorales mediante la unión a un anticuerpo de reconocimiento que se une preferentemente a las células tumorales. Una vez que el profármaco se ha convertido en fármaco activo por la enzima específica, entonces se puede difundir a las células vecinas para ejercer su efecto.

**[0020]** La VDEPT se lleva a cabo usando un virus que puede infectar las células tumorales. Tales virus pueden incluir retrovirus, preferiblemente virus que referencialmente infectan células que se dividen, tal como se detalla a continuación.

**[0021]** Alternativamente, la enzima de interés se puede expresar bajo el control de una secuencia reguladora de la transcripción cuya expresión se limita a un determinado tipo de célula o tipo de cáncer.

**[0022]** Un agente quimioterapéutico es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes citostáticos, agentes citotóxicos, agentes inhibidores del crecimiento y toxinas. Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo que pueden usarse en la terapia de tumores con las proteínas de acuerdo con la invención incluyen ciclofosfamida (número CAS 50-18-0, también conocido como ciclofosfano, y los nombres comerciales Endoxan, Neosar, Procytox y Revimmune), AQ4N (1,4-bis-[[2-(dimetilamino-N-óxido)etil]amino]-5,8-dihidroxi-antraceno-9, 10-diona, también conocida como Banoxantrona), ifosfamida (número CAS 3778-73-2), beclorixesorufina, 7-etoxi-4-trifluoro-metil-cumarina (EFC), Bupropion, tiotepa (N,N',N'-trietilentiófosforamida, número CAS 52-24-4), mitomicina C (CAS número 50-0-07) y la tirapazamina (SR-4233, número CAS 27314-97-2).

**[0023]** En aspectos preferidos, el agente quimioterapéutico es un profármaco, o se administra en forma de profármaco. Un profármaco es una forma inactiva de un fármaco que se convierte en su forma activa por acción enzimática. Los profármacos para uso en el contexto de la presente invención se activan preferiblemente por CYP2B6 y/o NADPH-citocromo P450 reductasa.

**[0024]** La terapia enzimática con profármacos puede aplicarse concebiblemente a enfermedades distintas de cáncer que se tratan con fármacos que requieren activación enzimática. Por ejemplo, CYP2B6 metaboliza muchos otros medicamentos, además de los fármacos quimioterapéuticos. CYP2B6 y las proteínas y las proteínas de fusión de acuerdo con la invención por lo tanto se pueden usar en la terapia con profármacos de enfermedades tratables con tales fármacos. Estos medicamentos incluyen bupropione, que se utiliza para ayudar a dejar de fumar y adicción a la nicotina; clopidogrel, que se utiliza para prevenir y tratar la aterotrombosis; efavirenz y nevirapina, los antirretrovirales usados para tratar la infección por VIH y el SIDA.

#### *Secuencias de proteína y de ácido nucleico*

**[0025]** La memoria descriptiva proporciona proteínas que tienen las secuencias descritas en cualquiera de las SEQ ID Nos 1 a 4, variantes y fragmentos de las mismas, y ácidos nucleicos que codifican dichas secuencias. La referencia en el presente documento a "proteínas" o "las proteínas de acuerdo con la invención" puede entenderse que abarca dichas variantes y fragmentos, además de las secuencias descritas en las figuras 1-4.

**[0026]** La memoria descriptiva se describe en parte para proporcionar formas mutantes de 2B6 del citocromo P450 (CYP2B6). La secuencia de aminoácidos de la CYP2B6 humana de tipo natural se muestra en la figura 5 (SEQ ID No 5). Los inventores han producido una nueva proteína CYP2B6 humana mutante que tiene una afinidad por CPA 8 veces mayor que la de la enzima de tipo natural, a la vez que se conserva la misma  $V_{max}$ , mediante la introducción de las sustituciones I114V, L199M y V477W, tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID No 1). La secuencia mutante se muestra en la figura 1 (SEQ ID No 1).

**[0027]** Tal como se describe a continuación, las variantes y fragmentos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1) están abarcados dentro del alcance de acuerdo con la invención. Sin embargo, todas las proteínas CYP2B6, variantes y fragmentos de acuerdo con la invención retienen Val en la posición correspondiente al residuo 114 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1), Met en la posición correspondiente al residuo 199 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1), y Trp en la posición correspondiente al residuo 477 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1).

**[0028]** La secuencia de aminoácidos de NADPH-citocromo P450 reductasa de tipo natural se muestra en la figura 2 (SEQ ID No 2). Las proteínas NADPH citocromo P450 reductasa que son variantes y fragmentos de la secuencia de aminoácidos de la figura 2 (SEQ ID No 2), tal como se describe a continuación, también se incluyen dentro del alcance de acuerdo con la invención.

**[0029]** Las proteínas variantes pueden ser variantes de origen natural, tales como variantes de empalme, alelos e isoformas, o pueden ser producidos mediante medios recombinantes. Las variaciones en la secuencia de aminoácidos se pueden introducir por sustitución, delección o inserción de uno o más codones en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Opcionalmente, la variación es por sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos por cualquier otro aminoácido en la proteína. Adicional o alternativamente, la variación puede ser por adición o delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos dentro de la proteína.

**[0030]** Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas. Preferiblemente, las sustituciones son sustituciones conservativas, en las que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares. Sustituciones conservativas de ejemplo se enumeran a continuación.

Ala (A) val; leu; ile  
 Arg (R); lys, gin; asn  
 Asn (N) gln; his; lys  
 Asp (D) glu  
 Cys (C) ser  
 Gln (Q) asn  
 Glu (E) asp  
 Gly (G) pro; ala  
 His (H); asn; Gln; lys; arg  
 He (I) leu; val; met; ala  
 norleucina leu  
 Leu (L) norleucina; ile; met; ala; phe  
 Lys (K) arg; Gln; asn  
 Met (M) leu; phe; ile  
 Phe (F) leu; val; ile; ala; tyr  
 Pro (P) ala  
 Ser (S) thr  
 Thr (T) ser  
 Trp (W) tyr; phe  
 Tyr (Y) trp; phe; thr; ser  
 Val (V) ile; leu; met; phe; ala; norleucina

**[0031]** Las proteínas variantes pueden incluir proteínas que tienen al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido descrita en el presente documento. Preferiblemente, una proteína variante tendrá al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido de longitud completa o un fragmento de una secuencia de polipéptido tal como se describe en el presente documento. La identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia variante que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máxima, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede determinarse sobre la longitud completa de la secuencia variante, la longitud completa de la secuencia de referencia, o ambas. Los procedimientos para la alineación de secuencias y la determinación de la identidad de secuencia son bien conocidos en la técnica, por ejemplo utilizando un software informático disponible públicamente, tal como el software BioPerl, BLAST, BLAST-2, CS-BLAST, FASTA, ALIGN, ALIGN-2, LALIGN, JAligner, matcher o Megalign (DNASTAR) y algoritmos de alineación, tales como los algoritmos de Needleman-Wunsch y Smith-Waterman.

**[0032]** Los fragmentos de las proteínas y proteínas variantes descritas en este documento también se incluyen en el contexto de la invención. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad enzimática. Preferiblemente, dichos fragmentos tienen al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más aminoácidos de longitud.

**[0033]** Los fragmentos preferidos de las proteínas descritas en este documento comprenden todo o una parte del sitio activo. Los fragmentos preferidos de CYP2B6 comprenden o consisten en los aminoácidos 1-490 de la secuencia de longitud completa mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1). Los fragmentos preferidos de NADPH-citocromo P450 reductasa comprenden o consisten en fragmentos que comprenden o consisten en los aminoácidos 27-678 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura 2 (SEQ ID No 2).

**[0034]** Las variantes y fragmentos en el contexto de la invención retienen preferiblemente una actividad biológica de la proteína de longitud completa descrita en este documento. Las variantes y fragmentos de CYP2B6 de longitud completa tienen preferiblemente la actividad de oxidación de un sustrato, tal como ciclofosfamida, u otro sustrato, tal como se describe en el presente documento, en particular, mediante la catalización de la hidroxilación de 4-OH-CPA. En un aspecto preferido, dichas variantes y fragmentos tienen una afinidad por CPA mayor que la de la secuencia de CYP2B6 de tipo natural que se muestra en la figura 5, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la de la secuencia de tipo natural. En un aspecto particularmente preferido, dichas variantes y fragmentos tienen una afinidad por CPA igual que, sustancialmente igual que, o mayor que, la de la secuencia CYP2B6 mutante de longitud completa mostrada en la figura 1 (SEQ ID No 1). Los procedimientos para ensayar dicha actividad y afinidad se describen a continuación y en Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133. Las variantes y fragmentos de NADPH-citocromo P450 reductasa tienen preferiblemente la actividad de reducción del citocromo c, preferiblemente de una manera dependiente de NADPH. En un aspecto preferido, dichas variantes y fragmentos tienen una actividad igual que, sustancialmente igual que, o mayor que, la de la secuencia de NADPH citocromo P450 reductasa mutante de longitud completa que se muestra en la figura 2 (SEQ ID No 2). Los procedimientos para ensayar dicha actividad se describen a continuación y en Yasukochi et al; Arco Biochem Biophys 1980, 202: 491-498.

**[0035]** La persona experta será capaz de determinar los residuos de aminoácidos que pueden insertarse, sustituirse o eliminarse sin afectar adversamente a la actividad de la proteína usando el conocimiento de la estructura de proteínas disponible en la técnica y técnicas de modelización molecular disponibles públicamente (véase, por ejemplo Nguyen et al, Mol Pharmacol 2008, 73: 1122-1133). La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la proteína parental.

#### 25 *Vectores*

**[0036]** Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de acuerdo con la invención se pueden incorporar en vectores, por ejemplo, vectores replicable para la clonación y la amplificación, vectores para la transfección o infección de las células, o vectores para la producción *in vitro* de las proteínas. Todos estos vectores se incluyen dentro del alcance en el contexto de la invención.

**[0037]** El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, se inserta el ADN en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en el sector. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. Muchos vectores están disponibles al público y la construcción de vectores adecuados utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas para el experto en la materia.

**[0038]** Cuando el vector está destinado a la introducción de la proteína en las células de un paciente, se prefieren los vectores virales, aunque el vector puede ser cualquier vector de ADN o ARN utilizado o adecuado para terapias VDEPT o GDEPT. Los vectores virales pueden incluir virus de ADN, tales como adenovirus y retrovirus, preferiblemente retrovirus que preferentemente infectan células que se dividen, tales como las células tumorales. Los retrovirus de ejemplo incluyen lentivirus, alfaretrovirus, betaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus y epsilonretrovirus. Los vectores lanzadera retrovirales también se incluyen dentro del alcance en el contexto de la invención. Los vectores lanzadera retrovirales se generan utilizando la forma de ADN del retrovirus contenida en un plásmido con ciertos genes retrovirales parentales endógenos (por ejemplo, gag pol y env) eliminados y la secuencia de ADN de interés insertada. Los vectores lanzadera retrovirales se pueden derivar de retrovirus o de ciertos virus de ADN, tales como el virus BPV o adenovirus.

**[0039]** El vector puede ser un vector de expresión adecuado para la expresión de la proteína, por ejemplo, en una célula en cultivo, o dentro de una célula tumoral en un paciente. El ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la invención estará preferiblemente unida operativamente a un promotor que permite la expresión de la proteína. "Unida operativamente" significa unida como parte de la misma molécula de ácido nucleico, adecuadamente posicionada y orientada para iniciar la transcripción a partir del promotor. De este modo, puede haber elementos, tales como la secuencia no codificante 5' entre el promotor y la secuencia codificante que no es nativa al promotor ni a la secuencia codificante. Tales secuencias pueden incluirse en el vector si no perjudican al correcto control de la secuencia codificante por el promotor.

Los promotores adecuados incluyen promotores virales, tales como promotores de retrovirus de mamífero o virus de ADN, por ejemplo promotores MLV, CMV, RSV y de adenovirus. Los promotores de adenovirus preferidos son los primeros promotores de genes. También pueden ser adecuados promotores fuertes de mamífero. También se pueden utilizar variantes de tales promotores que retienen actividades transcripcionales sustancialmente similares.

#### 65 *Proteínas de fusión*

[0040] Las proteínas de fusión son proteínas quiméricas creadas por la unión de dos o más genes que codifican proteínas separadas o fragmentos de proteínas, tales como diferentes dominios de la proteína, en un marco de lectura único que codifica una única proteína traducida. Las proteínas de fusión en el contexto de la presente invención comprenden, preferiblemente, una proteína CYP2B6, tal como se describe en el presente documento, y una proteína NADPH-citocromo P450 reductasa, tal como se describe en el presente documento. En un aspecto preferido, dicha proteína de fusión comprende los residuos 1-490 de CYP2B6 y los residuos 57-678 de la NADPH-citocromo reductasa P450, aunque se puede utilizar cualquiera de las proteínas de longitud completa, variantes y fragmentos descritos en el presente documento. La proteína CYP2B6 puede en dirección 5' o 3' de la NADPH-citocromo P450 reductasa. Preferiblemente, la proteína CYP2B6 está en dirección 5' de la NADPH-citocromo P450 reductasa.

[0041] Cuando el contexto lo permita, la referencia en el presente documento a "las proteínas de acuerdo con la invención", "las proteínas descritas en el presente documento" etc debe entenderse que abarca dichas proteínas de fusión.

[0042] Las proteínas o fragmentos de proteínas que componen la proteína de fusión pueden estar separadas por una secuencia peptídica enlazadora o espaciadora. El enlazador sirve para separar las proteínas componentes o los fragmentos de proteínas y ayudan al plegado eficaz y la actividad de los componentes individuales. El enlazador puede comprender un sitio de escisión de la enzima para permitir que los polipéptidos componentes se separen por digestión enzimática. El enlazador puede tener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 aminoácidos o más de longitud. Preferiblemente, el enlazador tiene menos de 10, menos de 8, menos de 7, menos de 6 o menos de 5 aminoácidos de longitud. Los enlazadores de ejemplo para su uso en las proteínas de fusión de la presente memoria comprenden Ser<sub>n</sub>Thr, donde "n" es cualquier número entero, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9. En un aspecto preferido, "n" es 5. En otro aspecto preferido, "n" es 3.

#### *Métodos de tratamiento*

[0043] "Tratamiento" incluye el tratamiento terapéutico y el tratamiento profiláctico o preventivo, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar la afección o el trastorno patológico objetivo. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. Los términos "terapia", "terapéutico", "tratamiento" o "tratar" incluyen reducir, aliviar o inhibir o eliminar los síntomas o el progreso de una enfermedad, así como el tratamiento destinado a reducir, aliviar, inhibir o eliminar dichos síntomas o el progreso. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos aspectos, los procedimientos y composiciones en el contexto de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para retardar la progresión de una enfermedad o trastorno.

[0044] El tratamiento en el contexto de la invención incluye un método de tratamiento de un cáncer u otro trastorno neoplásico que comprende administrar a un paciente en necesidad de tratamiento una proteína, vector o composición farmacéutica en el contexto de la invención. Preferiblemente, el tratamiento comprende además administrar a dicho paciente un fármaco quimioterapéutico, preferiblemente un fármaco en forma de profármaco. Los dos componentes se pueden administrar juntos, por ejemplo en forma de una píldora combinada, o por separado. La administración puede ser secuencial o simultánea. La administración "secuencial" indica que los componentes se administran en momentos o puntos de tiempo diferentes, que pueden no obstante estar solapados. La administración simultánea indica que los componentes se administran al mismo tiempo.

[0045] Preferiblemente, se administra una cantidad eficaz, preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o vector en el contexto de la invención. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con el fármaco o profármaco con el que la proteína o el vector se coadministran.

[0046] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína o vector en el contexto de la invención puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la proteína, para provocar un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz abarca una cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la proteína es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente eficaz también abarca una cantidad suficiente para conferir beneficios, por ejemplo, un beneficio clínico.

[0047] En el caso de tumores precancerosos, benignos, de fase temprana o de fase tardía, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición en el contexto de la invención puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir o retrasar, en cierto grado, el crecimiento del tumor o la progresión del tumor; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida

en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la destrucción de las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia de cáncer, la eficacia in vivo puede, por ejemplo, medirse mediante la evaluación de la duración de la supervivencia, tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta, y/o calidad de vida.

[0048] “Enfermedad neoplásica”, “cáncer” y “tumor” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer de estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, gliosarcoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B; leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; cáncer de cabeza y cuello, y metástasis asociadas. En ciertos aspectos, los cánceres que son susceptibles de tratamiento por los anticuerpos en el contexto de la invención incluyen cánceres de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, gliosarcoma, cáncer pancreático, cáncer de mama y melanoma.

#### *Composiciones y administración farmacéutica*

[0049] Las proteínas y vectores en el contexto de la invención pueden formularse en una composición farmacéutica en combinación con un portador. Los portadores incluyen portadores, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG).

[0050] La formulación o composiciones farmacéuticas también pueden contener más de un compuesto activo. Por ejemplo, puede comprender un agente quimioterapéutico o profármaco, además de la proteína o el vector en el contexto de la invención. También pueden incluirse otras moléculas o compuestos con actividades complementarias, tales como agentes inmunosupresores.

[0051] Las proteínas, vectores y composiciones en contexto de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía de administración de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo inyección o perfusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o mediante sistemas de liberación prolongada.

Las dosificaciones y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosis o la vía de administración apropiada está dentro de la capacidad de un médico ordinario. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana.

[0052] La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

[0053] Todos los documentos citados en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

#### **FIGURAS**

[0054]

La **figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos de una CYP2B6 mutante que comprende 114V, 199M y 477W.

La **figura 2** muestra la secuencia de aminoácidos de NADPH-citocromo P450 reductasa humana de tipo natural.

La **figura 3** muestra la secuencia de la proteína de fusión CYP2B6 mutante-NADPH-citocromo P450 reductasa.

La **figura 4** muestra la secuencia de la proteína CYP2B6 humana de tipo natural.

La **figura 5** muestra la estrategia de clonación para la construcción de proteínas de fusión CYP2B6TM-RED, incluyendo la inserción de diferentes secuencias enlazadoras.

La **figura 6** muestra el plásmido pENG1 delta cypT (pENG1 cypT.EF1 largo eGFP eliminado de eGFP por escisión del fragmento entre los sitios de restricción Eco47III y BsrG1).

La **figura 7** muestra el plásmido pCMV8.91 que codifica las proteínas gag y pol.

La **figura 8** muestra el plásmido p.MD2G que codifica proteínas de la envoltura.



La **figura 9** muestra  $V_{\max}$  y  $K_m$  de hidroxilación CPA-4' en microsomas de levadura que expresan CYP2B6wt (triángulos rellenos invertidos) y CYP2B6TM (triple mutante, cuadrados rellenos). La  $V_{\max}$  de la proteína de tipo natural era  $107,3 \pm 3,74 \text{ min}^{-1}$  y la  $K_m$  era  $4,33 \pm 0,5 \text{ mM}$ . La  $V_{\max}$  del triple mutante era  $107,5 \pm 3,4 \text{ min}^{-1}$  y la  $K_m$  era de  $0,51 \pm 0,08 \text{ mM}$ . CYP2B6TM mostró un aumento de 8,5 en la eficiencia catalítica CPA-4OH ( $V_{\max}/K_m$ ), principalmente como resultado de un aumento en la afinidad de la enzima.

La **figura 10** muestra los valores de  $IC_{50}$  de líneas de células pulmonares A549 infectadas después del tratamiento con CPA. Se infectaron células A549 con Ad-CYP2B6wt (200MOI), Ad-CYP2B6wt-RED (enlazador 2S + 1T) (200 MOI) y se trataron con CPA durante cinco días a partir del día después de la infección, o se infectaron por LV-CYP2B6TM-RED (enlazador 5S + 1T) (100MOI) y se trataron durante cinco días. Las células que expresaban CYP2B6TM-RED eran más sensibles a CPA que las células que expresaban CYP2B6wt o CYP2B6wt-RED.

La **figura 11** muestra la citotoxicidad de la ciclofosfamida en líneas de células tumorales humanas A549 (línea celular de cáncer pulmonar) y A253 (carcinoma de glándula submandibular) que expresan GFP (control; rombos rellenos) o CYP2B6TM-RED (enlazador 5S + 1T; cuadrados rellenos), después de 2 días de tratamiento.

La **figura 12** muestra la citotoxicidad de la ciclofosfamida sobre células TC1-Luc2 que expresaban GFP (control; diamantes rellenos) o CYP2B6TM-RED (enlazador 5S + 1T; cuadrados rellenos) en placas de 96 pocillos después de 2 días de tratamiento.

La **figura 13** muestra la citotoxicidad de la ciclofosfamida sobre células TC1-Luc2 que expresaban GFP (control; diamantes rellenos) o CYP2B6TM-RED (enlazador 5S + 1T; cuadrados rellenos) en placas de 96 pocillos después de 3 días de tratamiento.

La **figura 14** muestra el cambio en el volumen del tumor después del tratamiento con CPA en explantes de tumor de pulmón en un modelo de ratón. Se inyectaron ratones C57 Bl/6 por vía subcutánea con células TC1 que expresaban CYP2B6TM-RED o con células no infectadas. Se administró CPA a 140 mg/kg por inyección i.p. (flechas). En los ratones de control no tratados con CPA, el volumen del tumor aumentó rápidamente tanto en las células no infectadas (triángulos invertidos) como en células que expresan CYP2B6TM-RED (diamantes). El tratamiento con CPA desaceleró este rápido aumento en las células tumorales no infectadas, pero no obtuvo reducción en el tamaño tumoral global (cuadrados). En cambio, el tratamiento con CPA produjo una rápida regresión de tumores que expresaban CYP2B6TM-RED (triángulos).

## **EJEMPLOS**

### *Construcción de la CYP2B6 mutante triple (CYP286TM):*

[0055] La mutagénesis dirigida se basó en el kit QuikChange (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) usando cebadores mutagénicos y V-60CYP2B6 wt (descrito en Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, et al (1999): Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. Pharmacogenetics 9: 295-306) como molde seguido por la digestión DpnI y la transformación en bacterias DH5 $\alpha$  competentes. Se hicieron tres mutaciones: I114V, L199M y V477W. El triple mutante CYP2B6 se secuenció para asegurarse de que se obtuvo la mutación deseada.

### *Construcción y expresión de los genes de fusión de triple mutante CYP2B6-reductasa (CYP286TM-RED) con diferentes enlazadores.*

[0056] Para tener un sistema completo que puede operar de manera eficiente en las células tumorales, los inventores eligieron expresar la NADPH-P450 reductasa (RED) como parte de una proteína de fusión con CYP2B6 en lugar de dos proteínas separadas. El gen de fusión se construyó con dos secuencias de origen humano: CYP2B6 humana, en el extremo N-terminal, unida a la parte soluble de la NADPH-CYP reductasa humana, en el extremo C-terminal. La región hidrófoba amino-terminal de la RED (primeros 56 aminoácidos) se eliminó y la proteína de fusión se ancló a la membrana mediante la CYP2B6 N-terminal. La región hidrófoba amino terminal de CYP2B6 era importante para la correcta localización del polipéptido recién sintetizado en las membranas microsomales, así como para su actividad enzimática suficiente. El extremo C-terminal hidrófilo restante de RED (de Ile-57 al codón de parada 678) contiene el dominio de unión a FMN, el dominio de conexión y los dominios de unión a FAD-NADPH (Wang y otros, PNAS 94: 8.411-8.416, 1997) que permiten la transferencia eficiente de electrones.

[0057] Los inventores habían informado anteriormente de la construcción con éxito y la expresión en células de mamífero de una NADPH P450 reductasa humana-CYP2B6 humana activa en células de mamífero utilizando un enlazador Ser-Ser-Thr. (Tychopoulos et al, Cancer Gene Ther 2005, 12: 497-508). Sin embargo, aunque la proteína de fusión era funcional y, por tanto, los electrones se transfirieron con éxito de la fracción de flavina al hemo en el fragmento de la proteína CYP2B6, esta transferencia de electrones sin embargo no fue óptima. La estructura de la región bisagra entre los dominios de CYP2B6 y RED tenía que optimizarse.

[0058] A partir de una investigación de péptidos enlazadores que unen los dominios en estructuras terciarias de 51 proteínas naturales, Argos (J. Mol Biol, 211: 943-958,1990) mostró que Thr, Ser, Gly son constituyentes del enlazador deseables. Los aminoácidos del enlazador preferidos son principalmente pequeños y no hidrófobos, los grupos básicos y ácidos están excluidos, así como los residuos hidrófobos grandes y voluminosos y la longitud media del enlazador es de 6,5 residuos. Además, un enlazador peptídico utilizado para conectar dos dominios de

polipéptido y que comprende una gran proporción de residuos de serina produce una proteína de fusión con una resistencia mejorada a la proteólisis.

5 **[0059]** Los inventores compararon el efecto de varios enlazadores sobre la eficiencia de la proteína de fusión CYP2B6-NADPH P450 reductasa humano para metabolizar los sustratos de CYP2B6, tales como ciclofosfamida o bencyloxiresorufina. Los enlazadores probados fueron: Ser-Thr, Ser-Ser, Ser-Ser-Thr y (Ser)<sub>3-7</sub>-Thr.

10 **[0060]** CYP2B6TM (la secuencia codificante completa sin el codón de parada TGA) y la parte soluble de RED humana (desde el pb 171 hasta el codón de parada TAG) con diferentes secuencias enlazadoras (1ser + 1thr, 2ser o 2 a 7ser + thr) entre las dos proteínas (figura 6) se subclonaron en plásmido pYEDP60 y se expresaron en una cepa de levadura W (R) *S. cerevisiae* para probar su eficacia para metabolizar ciclofosfamida o en pENG1 delta cPPT (pENG1 cppT.EF1 largo eGFP eliminado de eGFP por escisión del fragmento entre los sitios de restricción Eco47III y BsrG1, figura 7) para la producción de lentivirus. Las construcciones se secuenciaron utilizando un secuenciador automático de Perkin Elmer para asegurar que el marco de lectura correcto se retuvo cualquiera que fuera la  
15 secuencia enlazadora utilizada.

#### *Expresión en levaduras.*

20 **[0061]** El plásmido de expresión en levadura pYeDP60 y la cepa W(R) de *S. cerevisiae* se construyeron por sustitución del promotor de reductasa de levadura W303-1B natural por el promotor híbrido GAL10-CYC1 inducible por galactosa (descrito en Truan G, Cullin C, Reisdorf P, Urban P, Pompon D. (1993): Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5. Gene 125: 49-55).

25 **[0062]** CYP2B6wt o CYP2B6TM sola o en fusión con RED se expresaron en la cepa de levadura W (R), en la que se expresó constitutivamente la NADPH citocromo P450 reductasa de levadura. Los plásmidos pYeDP60 se introdujeron en células de levadura intactas sobre la base de un protocolo mediado por acetato de litio refinado, tal como se describe en Truan et al, 1993, anteriormente. Las condiciones de cultivo de levadura fueron como las descritas en Bellamine A, Gautier JC, Urban P, Pompon D (1994): Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability. Eur J Biochem 225: 1005-1013.  
30

#### *Líneas celulares*

35 **[0063]** Se cultivó una línea de células pulmonares humanas (A549) en RPMI que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) y estaba suplementado con penicilina (200 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y fungizona (0,5 µg/ml). Se desarrolló una línea celular de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello A-253 humano como una monocapa en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales para el medio de Eagle modificado por Dulbecco, penicilina a 200U/ml, estreptomycin a 50 µg/ml y fungizona (0,5 µg/ml).  
40

#### *Infecciones por adenovirus*

45 **[0064]** CYP2B6wt o CYP2B6wt-RED se clonaron en el adenovirus de serotipo 5. Los vectores adenovirales recombinantes se generaron mediante recombinación homóloga entre un vector lanzadera (pTrack-CMV) y el esqueleto del vector adenoviral (pAdEasy-1) (véase HE TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998): A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 2509-14). La delección de E1 adenoviral hace que el virus no pueda producir partículas víricas infecciosas en las células diana, y la supresión de la región E3 es prescindible para la producción viral, ya que codifica proteínas implicadas en la evasión de la inmunidad del huésped. Un vector adenoviral que expresa LacZ se utilizó como control (Ad-LacZ).  
50

**[0065]** El procedimiento de infección estándar consistió en diluir la cantidad adenoviral deseada en medio de cultivo celular (con 2% de FBS) para infectar las células con 200 multiplicidad de infección (MOI) (es decir, número de partículas infecciosas/célula). Las células se incubaron durante 4 horas con las construcciones adenovirales y a continuación se reconstituyeron en medio de cultivo celular.  
55

#### *Infecciones por lentivirus*

60 **[0066]** La producción lentiviral se realizó en células HEK293T transfectadas con 3 plásmidos: pENG1 delta cppT-CYP2B6TM-RED, pCMV8.91 que codifican las proteínas gag y pol (figura 7) y p.MD2G que codifica proteínas de la envoltura (figura 8). La cuantificación de las partículas virales se estimó mediante medición de p24 (antígeno p24 de VIH-1 por ELISA, corporación Zeptomatrix). Un vector lentiviral que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizó como control (LV-GFP).

[0067] El procedimiento de infección estándar consistió en diluir la cantidad lentiviral deseada en medio de cultivo celular para infectar células con 100 MOI. Para aumentar la infección por lentivirus, se añadió sulfato de protamina (8 µg/ml) al medio. Las células se incubaron 3 horas en un volumen mínimo antes de añadir medio de cultivo celular hasta un volumen recomendado. 24 horas más tarde, se renovó el medio de cultivo celular.

5

#### *Expresión de transgenes*

[0068] La expresión de transgenes se comprobó por transferencia Western usando un anticuerpo anti-CYP2B6 policlonal y/o un anticuerpo anti-RED humano policlonal (Lifespan Biosciences). Después de la infección adenoviral, la sobreexpresión de los transgenes fue máxima a los 3 días después de la infección, tal como se describió previamente (Narjoz C, Marisa L, Imbeaud S, Paris A, Delacroix H, Beaune P, et al. Genomin consequences of cytochrome P450 2C9 overexpression in human hepatoma cells. Chem Res Toxicol 2009; 22: 779-87). Después de la infección lentiviral, la sobreexpresión de los transgenes se mantuvo estable a partir de 8 días después de la infección hasta varias semanas, ya que el transgén se integra en el genoma de la célula. Estos resultados fueron confirmados por inmunofluorescencia.

10

15

#### *Preparación microsomal*

[0069] Los microsomas de levadura se prepararon en base al procedimiento de alteración mecánica usando esferas de vidrio, tal como se describe en Bellamine A, Gautier JC, Urban P, Pompon D. (1994): Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. Accumulation in microsomal membranes, enzyme kinetics and stability. Eur J Biochem 225: 1005-1013.

20

25

30

[0070] Tres días después de las infecciones adenovirales o al menos 8 días después de la infección lentiviral, las células infectadas se trataron con tripsina y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y el sedimento celular se resuspendió en tampón STE (sacarosa 0,25 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) que contenían antiproteasas (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y se sometieron a ultrasonidos tres veces 10 segundos. El lisado sonificado se centrifugó a 9000 g durante 20 minutos, y posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 1 hora. El sedimento de 100.000 g que contenía los microsomas se resuspendió en tampón (NaPO<sub>4</sub> 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 20% de glicerol (p/v) a pH 7,4), se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C.

35

[0071] La concentración de proteína microsomal se determinó por el procedimiento del ácido bicinconínico (BCA) según las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL) utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

#### *Actividad de CPA 4-hidroxilasa.*

40

45

50

55

[0072] La determinación fluorométrica de CPA 4-hidroxilasa microsomal de levadura se adaptó de una técnica descrita anteriormente (Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ (1999): Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. Drug Metab Dispos. 27: 655-66) para una microplaca de 96 pocillos con varias modificaciones. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hora a 28°C en un volumen total de 200 µl e incluían tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, 10 pmol de CYP2B6wt o CYP2B6TM o CYP2B6TM-RED con diferentes enlazadores (el contenido de P450 microsomal se determinó espectralmente por el método de Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, von Oldershausen HF (1972): Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. Eur J Clin Pharmacol. 4: 65-73) y CPA 10 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del sistema generador de NADPH y se detuvieron mediante la adición de 200 µl de ácido tricloroacético al 10%. Después de centrifugación a 13.000 g y 4°C durante 15 min para sedimentar las proteínas, se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo de ensayo limpio que contenía 160 µl de la mezcla de fluorescencia (6 mg de 3-aminofenol y 6 mg de clorhidrato de hidroxilamina recién disuelto en 1 ml de HCl 1 N). Las muestras se calentaron a 90°C durante 20 min para formar 7-hidroxiquinolina por condensación de la 4-hidroxil-CPA con 3-aminofenol. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se realizó la lectura de fluorescencia en un lector de fluorescencia en microplacas Bio-tek FL600 (excitación a 350 nm y emisión a 515 nm). Bajo estas condiciones de ensayo, la formación de producto fue lineal con el tiempo, y la concentración de enzima y la cantidad de 4-hidroxil-CPA bajo estas condiciones de ensayo se determinaron en base a una curva estándar de 4-hidroxil-CPA (0-20 µM) incubada con albúmina de suero bovino y tratada en paralelo en las mismas condiciones de ensayo.

60

[0073] Las constantes cinéticas de ciclofosfamida hidroxilasa se determinaron mediante una regresión no lineal con 15 concentraciones de sustrato (0,05 a 25 mM). Los datos se analizaron usando el software Prism (Graph-Pad Software, Inc., San Diego, CA) para calcular los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ), con valores de  $V_{max}$  expresados como moles de producto formado por minuto, normalizados a los moles de P450 incluidos en cada reacción (número de recambio expresado como minutos<sup>-1</sup>). Los datos mostrados se basaron en las determinaciones por duplicado para cada punto de datos.

[0074]  $V_{max}$  y  $K_m$  de hidroxilación de CPA-4' se determinaron en los microsomas de levadura que expresaban CYP2B6wt y CYP2B6TM (Figura 9). CYP2B6TM mostró un aumento de 8,5 en la eficiencia catalítica de CPA-4OH ( $V_{max}/K_m$ ), principalmente como resultado de un aumento en la afinidad de la enzima.

5 *Ensayo de actividad de RED*

[0075] La actividad de RED se midió en la fracción microsomal celular. Se ensayó la reducción dependiente de NADPH del citocromo c por RED, tal como se describe en Yasukochi Y, Okita RT, Masters BS. (1980): Comparison of the properties of detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductases from pig liver and kidney. Immunochemical, kinetic, and reconstitutive properties. Arch Biochem Biophys 202: 491-8. El citocromo c se añadió a una concentración de saturación final de 80 M y la actividad de RED se calculó como nmol de citocromo c reducido/mn/ mg usando =  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 550 nm.

[0076]  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  se determinaron en los microsomas de levadura que expresaban CYP2B6wt, CYP2B6TM y CYP2B6TM-RED con diferentes enlazadores (Tabla 1). Para todas las proteínas de fusión, la eficiencia catalítica de CPA-4OH estaba en el mismo rango de magnitud, con variaciones débiles de acuerdo con el tamaño del enlazador usado, y comparable a la observada con CYP2B6TM sola, mostrando que la adición de RED no afectó a la eficiencia catalítica de CYP2B6TM. Por otro lado, después de la deducción de la actividad de reductasa de levadura endógena, la actividad de reductasa debido a la expresión de la proteína de fusión difería de acuerdo con el tamaño del enlace de 721 a 6528 nmol/min/mg. A partir de estos resultados, se utilizaron las construcciones de tres CYP2B6TM-RED con diferentes actividades de reductasa (indicadas con asteriscos) para producir lentivirus recombinante.

Tabla 1

Efecto del enlazador sobre la actividad de CPA hidroxilasa y la actividad de NADPH reductasa de la proteína de fusión CYP2B6-RED				
Enlazador (cuando está presente)	Actividad de CPA hidroxilasa			Actividad de reductasa
	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}/K_m$	
CYP2B6wt (sin reductasa)	62,5	4,9	12,7	[n/a]
CYP2B6TM (sin reductasa)	105,5	1,05	100,5	[n/a]
1 Ser + 1 Thr	98,82	1,31	75,4	342,0
2 Ser	87,95	1,1	80,0	72,1
2 Ser + 1 Thr	92,28	1,14	81	344,9
3 Ser + 1 Thr	114,5	1,1	104,1	652,8
4 Ser + 1 Thr	85,22	1,11	76,8	98,6
5 Ser + 1 Thr	108,5	0,89	141,9	291,7
6 Ser + 1 Thr	94,36	0,97	97,27	313,9
7 Ser + 1 Thr	95,11	1,04	91,45	119,8

[0077] La  $V_{max}$  de la actividad de CPA hidroxilasa se expresa como nmol 4OH-CPA/min/nmol CYP2B6 y  $K_m$  como  $\mu\text{M}$ . La actividad de la reductasa se expresa como nmol/min/mg, ajustada para tener en cuenta la actividad de la reductasa intrínseca de la levadura.

30 *Ensayos de citotoxicidad in vitro*

[0078] Las células se infectaron en placas de seis pocillos a  $4 \times 10^5$  células/pocillo, con las construcciones adenovirales o construcciones lentivirales, tal como se describen anteriormente. A continuación, las células se tripsinizaron y sembraron en placas de 96 pocillos a  $10^4$  células/pocillo por triplicado. Se utilizaron como controles células infectadas con un vector adenoviral que expresa LacZ o con un vector lentiviral que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Las células se trataron con CPA 0-3 mM durante 5 días, la viabilidad celular se ensayó usando el "Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay" (Promega) según las instrucciones del fabricante. Este ensayo colorimétrico mide la actividad deshidrogenasa en las mitocondrias metabólicamente activas de las células viables. Después del tratamiento con CPA de 5 días, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de Reactivo One Solution (Promega) a 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo celular y las células se incubaron durante 2 horas a 37°C, y posteriormente las placas se leyeron a 490 nm usando un lector de placas de 96 pocillos. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células viables en comparación con las infectadas por los controles (Ad-LacZ o LV-GFP) tratadas a concentraciones de CPA idénticas.

[0079] Los valores de  $IC_{50}$  de líneas de células pulmonares A549 infectado después del tratamiento con CPA se muestran en la figura 10. Las células que expresaban CYP2B6TM-RED eran más sensibles a CPA que las células que expresaban CYP2B6wt o CYP2B6wt-RED.

[0080] La citotoxicidad de la ciclofosfamida se comparó en líneas celulares A549 y A253, que expresaban GFP (control) o CYP2B6TM-RED (enlazador 5S + 1T), tal como se muestra en la figura 11. La expresión del gen de fusión hizo que estas líneas celulares previamente insensibles a CPA fueran sensibles a dosis débiles de CPA.

5 [0081] La citotoxicidad de la ciclofosfamida también se comparó en las líneas celulares A549 y A253 TC1-LUC2, que expresaban GFP (control) o CYP2B6TM-RED (enlazador 3S + 1T), como se muestra en las figuras 12 y 13. La expresión de la proteína de fusión también hizo que estas líneas celulares fueran sensibles a dosis débiles de CPA. En placas de 6 pocillos, todas las células infectadas por CYP2B6TM-RED estaban muertas después del  
10 tratamiento con 1,5 o 3 mM de CPA. Las células infectadas con GFP no se vieron afectadas. Se observaron resultados similares en placas de 96 pocillos, tal como se muestra en las figuras 12 y 13. La infección de células TC1-Luc2 por lentivirus recombinantes y tratamiento con ciclofosfamida (CPA).

15 *Ensayos de citotoxicidad in vivo*

[0082] Para probar la capacidad del triple mutante para mejorar la respuesta a la CPA *in vivo*, se utilizó un modelo de ratón. Se infectaron células tumorales pulmonares de ratón (TC1-Luc2) con un vector de lentivirus que lleva la construcción CYP2B6TM-RED y se inyectaron por vía subcutánea en ratones C57Bl6. Como control, se inyectaron células TC1 no infectadas. Las células TC1-Luc2 expresan luciferasa, lo que permite el control del tamaño del tumor a través de bioluminiscencia.

20 [0083] En los experimentos iniciales, 10 ratones fueron inyectados con células CYP2B6TM-RED-TC1 y 10 fueron inyectados con células TC1 no infectadas. Se controló el crecimiento tumoral y cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 400 mm<sup>3</sup>, la mitad de los ratones fueron tratados con CPA a través de inyección intraperitoneal a 140 mg/kg. Los ratones no tratados se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó alrededor de 1.500 mm<sup>3</sup>.

25 [0084] La Figura 14 muestra que el efecto de CPA sobre las células tumorales que expresaban CYP2B6TM-RED fue espectacular. La CPA tenía sólo un efecto modesto sobre las células tumorales no infectadas y no produjo una reducción global en el volumen tumoral. El volumen del tumor continuó aumentando después del tratamiento inicial con CPA, seguido de una ligera reducción, pero no se observó una reducción general en el tamaño del tumor, incluso después de 4 semanas de tratamiento. Además; después de la cuarta y última inyección de CPA, el volumen del tumor de nuevo empezó a aumentar de forma espectacular.

30 [0085] En cambio, el tratamiento con CPA de células tumorales infectadas con CYP2B6TM-RED dio lugar a una disminución espectacular en el volumen del tumor. Se observó una regresión rápida dentro de las 48 horas de tratamiento, y en 3 semanas de tratamiento, los tumores habían casi desaparecido. Tres semanas después de la última inyección de CPA, los tumores permanecen indetectables.

35 [0086] Los inventores han demostrado que la proteína CYP2B6 triple mutante no sólo tiene una actividad catalítica muy mejorada en comparación con la de tipo natural, sino que también tiene un efecto mayor sobre la citotoxicidad inducida por CPA que el de la proteína de tipo natural. Además, la proteína triple mutante sigue mostrando estos efectos mejorados en el contexto de una proteína de fusión con la NADPH citocromo p450 reductasa. Tanto la proteína triple mutante sola como las proteínas de fusión triple mutante-NADPH citocromo p450 reductasa son por lo tanto de gran utilidad potencial en la terapia enzimática con profármacos.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

45 [0187]

50 <110> INSERM  
<120> Proteínas 2B6 mutantes de citocromo P450 y usos de las mismas  
<130> BET11P0327  
<160> 4  
<170> PatentIn version 3.4  
55 <210> 1  
<211> 491  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
60 <400> 1

ES 2 660 156 T3

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

ES 2 660 156 T3

	Asn	Ile	Ile	Cys	Ser	Ile	Val	Phe	Gly	Lys	Arg	Phe	His	Tyr	Gln	Asp
				180					185					190		
5	Gln	Glu	Phe	Leu	Lys	Met	Met	Asn	Leu	Phe	Tyr	Gln	Thr	Phe	Ser	Leu
			195					200					205			
10	Ile	Ser	Ser	Val	Phe	Gly	Gln	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu
		210					215					220				
15	Lys	Tyr	Phe	Pro	Gly	Ala	His	Arg	Gln	Val	Tyr	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu
	225					230					235					240
20	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ile	Gly	His	Ser	Val	Glu	Lys	His	Arg	Glu	Thr	Leu
					245					250					255	
25	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met
				260					265					270		
30	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Asn	Ala	His	Ser	Glu	Phe	Ser	His	Gln	Asn	Leu
			275					280					285			
35	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Ala	Gly	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser
		290					295					300				
40	Thr	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Lys	Tyr	Pro	His	Val
	305					310					315					320
45	Ala	Glu	Arg	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	His	Arg
					325					330					335	
50	Pro	Pro	Glu	Leu	His	Asp	Arg	Ala	Lys	Met	Pro	Tyr	Thr	Glu	Ala	Val
				340					345					350		
55	Ile	Tyr	Glu	Ile	Gln	Arg	Phe	Ser	Asp	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Val	Pro
			355					360					365			
60	His	Ile	Val	Thr	Gln	His	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Lys
		370					375					380				
65	Asp	Thr	Glu	Val	Phe	Leu	Ile	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	His	Asp	Pro	His
	385					390					395					400
70	Tyr	Phe	Glu	Lys	Pro	Asp	Ala	Phe	Asn	Pro	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Ala
					405					410					415	
75	Asn	Gly	Ala	Leu	Lys	Lys	Thr	Glu	Ala	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Leu	Gly
				420					425					430		

ES 2 660 156 T3

Lys Arg Ile Cys Leu Gly Glu Gly Ile Ala Arg Ala Glu Leu Phe Leu  
 435 440 445  
 5 Phe Phe Thr Thr Ile Leu Gln Asn Phe Ser Met Ala Ser Pro Val Ala  
 450 455 460  
 10 Pro Glu Asp Ile Asp Leu Thr Pro Gln Glu Cys Gly Trp Gly Lys Ile  
 465 470 475 480  
 15 Pro Pro Thr Tyr Gln Ile Arg Phe Leu Pro Arg  
 485 490  
 <210> 2  
 <211> 680  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 25 Met Ile Asn Met Gly Asp Ser His Val Asp Thr Ser Ser Thr Val Ser  
 1 5 10 15  
 30 Glu Ala Val Ala Glu Glu Val Ser Leu Phe Ser Met Thr Asp Met Ile  
 20 25 30  
 35 Leu Phe Ser Leu Ile Val Gly Leu Leu Thr Tyr Trp Phe Leu Phe Arg  
 35 40 45  
 40 Lys Lys Lys Glu Glu Val Pro Glu Phe Thr Lys Ile Gln Thr Leu Thr  
 50 55  
 45 Ser Ser Val Arg Glu Ser Ser Phe Val Glu Lys Met Lys Lys Thr Gly  
 65 70 75 80  
 50 Arg Asn Ile Ile Val Phe Tyr Gly Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu  
 85 90 95  
 55 Phe Ala Asn Arg Leu Ser Lys Asp Ala His Arg Tyr Gly Met Arg Gly  
 100 105 110  
 60 Met Ser Ala Asp Pro Glu Glu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Ser Ser Leu  
 115 120 125  
 65 Pro Glu Ile Asp Asn Ala Leu Val Val Phe Cys Met Ala Thr Tyr Gly  
 130 135 140  
 70 Glu Gly Asp Pro Thr Asp Asn Ala Gln Asp Phe Tyr Asp Trp Leu Gln  
 145 150 155 160





ES 2 660 156 T3

	Glu	Leu	Tyr	Leu	Ser	Trp	Val	Val	Glu	Ala	Arg	Arg	His	Ile	Leu	Ala
				420					425					430		
5	Ile	Leu	Gln	Asp	Cys	Pro	Ser	Leu	Arg	Pro	Pro	Ile	Asp	His	Leu	Cys
			435					440					445			
10	Glu	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Gln	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ala	Ser	Ser
		450					455					460				
15	Ser	Lys	Val	His	Pro	Asn	Ser	Val	His	Ile	Cys	Ala	Val	Val	Val	Glu
	465					470					475					480
20	Tyr	Glu	Thr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ile	Asn	Lys	Gly	Val	Ala	Thr	Asn	Trp
					485					490					495	
25	Leu	Arg	Ala	Lys	Glu	Pro	Ala	Gly	Glu	Asn	Gly	Gly	Arg	Ala	Leu	Val
				500					505					510		
30	Pro	Met	Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	Phe	Lys	Ala	Thr
			515					520					525			
35	Thr	Pro	Val	Ile	Met	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Pro	Phe	Ile
		530					535					540				
40	Gly	Phe	Ile	Gln	Glu	Arg	Ala	Trp	Leu	Arg	Gln	Gln	Gly	Lys	Glu	Val
	545					550					555					560
45	Gly	Glu	Thr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Cys	Arg	Arg	Ser	Asp	Glu	Asp	Tyr
					565					570					575	
50	Leu	Tyr	Arg	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Phe	His	Arg	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr
				580					585					590		
55	Gln	Leu	Asn	Val	Ala	Phe	Ser	Arg	Glu	Gln	Ser	His	Lys	Val	Tyr	Val
			595					600					605			
60	Gln	His	Leu	Leu	Lys	Gln	Asp	Arg	Glu	His	Leu	Trp	Lys	Leu	Ile	Glu
		610					615					620				
65	Gly	Gly	Ala	His	Ile	Tyr	Val	Cys	Gly	Asp	Ala	Arg	Asn	Met	Ala	Arg
	625					630					635					640
70	Asp	Val	Gln	Asn	Thr	Phe	Tyr	Asp	Ile	Val	Ala	Glu	Leu	Gly	Ala	Met
					645					650					655	
75	Glu	His	Ala	Gln	Ala	Val	Asp	Tyr	Ile	Lys	Lys	Leu	Met	Thr	Lys	Gly



ES 2 660 156 T3

	Gln	Glu	Phe 195	Leu	Lys	Met	Met	Asn 200	Leu	Phe	Tyr	Gln	Thr 205	Phe	Ser	Leu
5	Ile	Ser 210	Ser	Val	Phe	Gly	Gln 215	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe 220	Ser	Gly	Phe	Leu
10	Lys 225	Tyr	Phe	Pro	Gly	Ala 230	His	Arg	Gln	Val	Tyr 235	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu 240
15	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ile 245	Gly	His	Ser	Val	Glu 250	Lys	His	Arg	Glu	Thr 255	Leu
20	Asp	Pro	Ser	Ala 260	Pro	Lys	Asp	Leu	Ile 265	Asp	Thr	Tyr	Leu	Leu 270	His	Met
25	Glu	Lys	Glu 275	Lys	Ser	Asn	Ala	His 280	Ser	Glu	Phe	Ser	His 285	Gln	Asn	Leu
30	Asn 290	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu 295	Phe	Phe	Ala	Gly	Thr 300	Glu	Thr	Thr	Ser
35	Thr 305	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly 310	Phe	Leu	Leu	Met	Leu 315	Lys	Tyr	Pro	His	Val 320
40	Ala	Glu	Arg	Val	Tyr 325	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln 330	Val	Ile	Gly	Pro	His 335	Arg
45	Pro	Pro	Glu	Leu 340	His	Asp	Arg	Ala	Lys 345	Met	Pro	Tyr	Thr	Glu 350	Ala	Val
50	Ile	Tyr	Glu 355	Ile	Gln	Arg	Phe	Ser 360	Asp	Leu	Leu	Pro	Met 365	Gly	Val	Pro
55	His	Ile 370	Val	Thr	Gln	His	Thr 375	Ser	Phe	Arg	Gly	Tyr 380	Ile	Ile	Pro	Lys
60	Asp 385	Thr	Glu	Val	Phe	Leu 390	Ile	Leu	Ser	Thr	Ala 395	Leu	His	Asp	Pro	His 400
65	Tyr	Phe	Glu	Lys	Pro 405	Asp	Ala	Phe	Asn	Pro 410	Asp	His	Phe	Leu	Asp 415	Ala
70	Asn	Gly	Ala	Leu 420	Lys	Lys	Thr	Glu	Ala 425	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser 430	Leu	Gly
75	Lys	Arg	Ile	Cys	Leu	Gly	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Ala	Glu	Leu	Phe	Leu

ES 2 660 156 T3

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

ES 2 660 156 T3

	Phe	Ile	Thr	Trp	Arg	Glu	Gln	Phe	Trp	Pro	Ala	Val	Cys	Glu	His	Phe
	690						695					700				
5	Gly	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Glu	Glu	Ser	Ser	Ile	Arg	Gln	Tyr	Glu	Leu
	705					710					715					720
10	Val	Val	His	Thr	Asp	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Met	Gly	Glu	Met
					725					730					735	
15	Gly	Arg	Leu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Asn	Gln	Lys	Pro	Pro	Phe	Asp	Ala	Lys
				740					745					750		
20	Asn	Pro	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Thr	Thr	Asn	Arg	Lys	Leu	Asn	Gln	Gly
			755					760					765			
25	Thr	Glu	Arg	His	Leu	Met	His	Leu	Glu	Leu	Asp	Ile	Ser	Asp	Ser	Lys
	770						775					780				
30	Ile	Arg	Tyr	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Val	Ala	Val	Tyr	Pro	Ala	Asn	Asp
	785					790					795					800
35	Ser	Ala	Leu	Val	Asn	Gln	Leu	Gly	Lys	Ile	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Asp
					805					810					815	
40	Val	Val	Met	Ser	Leu	Asn	Asn	Leu	Asp	Glu	Glu	Ser	Asn	Lys	Lys	His
				820					825					830		
45	Pro	Phe	Pro	Cys	Pro	Thr	Ser	Tyr	Arg	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Leu
			835					840					845			
50	Asp	Ile	Thr	Asn	Pro	Pro	Arg	Thr	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu	Leu	Ala	Gln
	850						855					860				
55	Tyr	Ala	Ser	Glu	Pro	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Lys	Met	Ala	Ser
	865					870					875					880
60	Ser	Ser	Gly	Glu	Gly	Lys	Glu	Leu	Tyr	Leu	Ser	Trp	Val	Val	Glu	Ala
					885					890					895	
65	Arg	Arg	His	Ile	Leu	Ala	Ile	Leu	Gln	Asp	Cys	Pro	Ser	Leu	Arg	Pro
			900						905					910		
70	Pro	Ile	Asp	His	Leu	Cys	Glu	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	Gln	Ala	Arg	Tyr
			915					920					925			
75	Tyr	Ser	Ile	Ala	Ser	Ser	Ser	Lys	Val	His	Pro	Asn	Ser	Val	His	Ile
	930						935					940				

ES 2 660 156 T3

5 Cys Ala Val Val Val Glu Tyr Glu Thr Lys Ala Gly Arg Ile Asn Lys  
945 950 955 960

Gly Val Ala Thr Asn Trp Leu Arg Ala Lys Glu Pro Ala Gly Glu Asn  
965 970 975

10 Gly Gly Arg Ala Leu Val Pro Met Phe Val Arg Lys Ser Gln Phe Arg  
980 985 990

15 Leu Pro Phe Lys Ala Thr Thr Pro Val Ile Met Val Gly Pro Gly Thr  
995 1000 1005

Gly Val Ala Pro Phe Ile Gly Phe Ile Gln Glu Arg Ala Trp Leu  
1010 1015 1020

20 Arg Gln Gln Gly Lys Glu Val Gly Glu Thr Leu Leu Tyr Tyr Gly  
1025 1030 1035

25 Cys Arg Arg Ser Asp Glu Asp Tyr Leu Tyr Arg Glu Glu Leu Ala  
1040 1045 1050

30 Gln Phe His Arg Asp Gly Ala Leu Thr Gln Leu Asn Val Ala Phe  
1055 1060 1065

35 Ser Arg Glu Gln Ser His Lys Val Tyr Val Gln His Leu Leu Lys  
1070 1075 1080

Gln Asp Arg Glu His Leu Trp Lys Leu Ile Glu Gly Gly Ala His  
1085 1090 1095

40 Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Arg Asn Met Ala Arg Asp Val Gln  
1100 1105 1110

45 Asn Thr Phe Tyr Asp Ile Val Ala Glu Leu Gly Ala Met Glu His  
1115 1120 1125

50 Ala Gln Ala Val Asp Tyr Ile Lys Lys Leu Met Thr Lys Gly Arg  
1130 1135 1140

Tyr Ser Leu Asp Val  
1145

55 <210> 4  
<211> 491  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 4

ES 2 660 156 T3

	Met	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Leu
	1				5					10					15	
5	Leu	Leu	Leu	Val	Gln	Arg	His	Pro	Asn	Thr	His	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro
				20					25					30		
10	Gly	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Asn	Leu	Leu	Gln	Met	Asp	Arg
			35					40					45			
15	Arg	Gly	Leu	Leu	Lys	Ser	Phe	Leu	Arg	Phe	Arg	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asp
		50					55					60				
20	Val	Phe	Thr	Val	His	Leu	Gly	Pro	Arg	Pro	Val	Val	Met	Leu	Cys	Gly
	65					70					75				80	
25	Gly	Arg	Gly	Lys	Ile	Ala	Met	Val	Asp	Pro	Phe	Phe	Arg	Gly	Tyr	Gly
				100					105					110		
30	Val	Ile	Phe	Ala	Asn	Gly	Asn	Arg	Trp	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	Phe	Ser
			115					120					125			
35	Val	Thr	Thr	Met	Arg	Asp	Phe	Gly	Met	Gly	Lys	Arg	Ser	Val	Glu	Glu
		130					135					140				
40	Arg	Ile	Gln	Glu	Glu	Ala	Gln	Cys	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Ser
	145					150					155					160
45	Lys	Gly	Ala	Leu	Met	Asp	Pro	Thr	Phe	Leu	Phe	Gln	Ser	Ile	Thr	Ala
				165						170					175	
50	Asn	Ile	Ile	Cys	Ser	Ile	Val	Phe	Gly	Lys	Arg	Phe	His	Tyr	Gln	Asp
				180					185					190		
55	Gln	Glu	Phe	Leu	Lys	Met	Leu	Asn	Leu	Phe	Tyr	Gln	Thr	Phe	Ser	Leu
			195					200					205			
60	Ile	Ser	Ser	Val	Phe	Gly	Gln	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu
		210					215					220				
65	Lys	Tyr	Phe	Pro	Gly	Ala	His	Arg	Gln	Val	Tyr	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu
	225					230					235					240
70	Ile	Asn	Ala	Tyr	Ile	Gly	His	Ser	Val	Glu	Lys	His	Arg	Glu	Thr	Leu
				245						250					255	



ES 2 660 156 T3

	Asp	Pro	Ser	Ala	Pro	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met
				260					265					270		
5	Glu	Lys	Glu	Lys	Ser	Asn	Ala	His	Ser	Glu	Phe	Ser	His	Gln	Asn	Leu
			275					280					285			
10	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Ala	Gly	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser
		290					295					300				
15	Thr	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Lys	Tyr	Pro	His	Val
	305					310						315				320
20	Ala	Glu	Arg	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Glu	Gln	Val	Ile	Gly	Pro	His	Arg
					325					330					335	
25	Pro	Pro	Glu	Leu	His	Asp	Arg	Ala	Lys	Met	Pro	Tyr	Thr	Glu	Ala	Val
				340					345					350		
30	Ile	Tyr	Glu	Ile	Gln	Arg	Phe	Ser	Asp	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Val	Pro
			355					360					365			
35	His	Ile	Val	Thr	Gln	His	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Lys
		370					375					380				
40	Asp	Thr	Glu	Val	Phe	Leu	Ile	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	His	Asp	Pro	His
	385					390					395					400
45	Tyr	Phe	Glu	Lys	Pro	Asp	Ala	Phe	Asn	Pro	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Ala
					405					410					415	
50	Asn	Gly	Ala	Leu	Lys	Lys	Thr	Glu	Ala	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Leu	Gly
				420					425					430		
55	Lys	Arg	Ile	Cys	Leu	Gly	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Ala	Glu	Leu	Phe	Leu
			435					440					445			
60	Phe	Phe	Thr	Thr	Ile	Leu	Gln	Asn	Phe	Ser	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Ala
		450					455					460				
65	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp	Leu	Thr	Pro	Gln	Glu	Cys	Gly	Val	Gly	Lys	Ile
	465					470					475					480
70	Pro	Pro	Thr	Tyr	Gln	Ile	Arg	Phe	Leu	Pro	Arg					
					485					490						

## REIVINDICACIONES

1. Proteína CYP2B6 que comprende  
 5 (i) la secuencia de aminoácidos de la Figura 1 (SEQ ID No 1), o  
 (ii) una variante o fragmento de (i), en la que dicha variante o fragmento es al menos 90% idéntica a los residuos 1-490 de la figura 1 (SEQ ID NO: 1) y comprende los residuos 114V, 199M y 477W, tal como se muestra en la figura 1 (SEQ ID No 1) y dicha variante o fragmento retiene la actividad de CPA hidroxilasa de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la figura 1 (SEQ ID No 1).
- 10 2. Proteína de fusión que comprende la proteína CYP2B6, según la reivindicación 1 i) o ii), y (ii) una proteína NADPH-citocromo P450 reductasa, tal como se muestra en la figura 2/SEQ ID No 2 o variante o fragmento de la misma, en la que dicha proteína NADPH-citocromo P450 reductasa, variante o fragmento de la misma, es al menos 90% idéntica a los residuos 57-678 de la figura 2 (SEQ ID NO: 2).
- 15 3. Proteína de fusión, según la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína CYP2B6 está en dirección 5' de la NADPH-citocromo P450 reductasa.
4. Proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la proteína CYP2B6 humana mutante y la NADPH-citocromo P450 reductasa están separadas por un enlazador.
- 20 5. Proteína de fusión, según la reivindicación 4, en la que el enlazador consiste en 1 a 10 aminoácidos, y, opcionalmente, en el que el enlazador comprende Ser<sub>n</sub>Thr, en el que n = 1 a 7, opcionalmente 3 o 5.
- 25 6. Proteína de fusión, según la reivindicación 5, que tiene la secuencia de la figura 3 (SEQ ID No 3).
7. Ácido nucleico aislado que codifica una proteína, según la reivindicación 1, o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 30 8. Vector que comprende el ácido nucleico, según la reivindicación 7, en el que el vector es opcionalmente un vector viral, opcionalmente un vector lentiviral, y/o en el que el vector es opcionalmente un vector de expresión.
9. Célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8.
- 35 10. Procedimiento de fabricación de una proteína, según la reivindicación 1, o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende cultivar la célula huésped, según la reivindicación 9, en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína, y, opcionalmente, purificar dicha proteína del cultivo celular.
- 40 11. Proteína, según la reivindicación 1, o proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, o vector, según la reivindicación 8, para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.
- 45 12. Proteína, proteína de fusión o vector para usar, según la reivindicación 11, en que  
 (i) dicha proteína, proteína de fusión o vector se administran en combinación con un profármaco, ya sea simultánea o secuencialmente, en el que el profármaco es opcionalmente ciclofosfamida; y/o  
 (ii) dicho tratamiento es el tratamiento del cáncer, opcionalmente, un cáncer de cabeza y cuello, leucemia, linfoma, gliosarcoma, cáncer pancreático, cáncer de mama y melanoma.
- 50 13. Proteína, según la reivindicación 1, o proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, o vector, según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento de cáncer en un paciente, en que dicha proteína, proteína de fusión o vector se usan en combinación con un agente quimioterapéutico, ya sea secuencial o simultáneamente.

1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdrl ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre  
61 kygdvftvhl gprpvvmlcg veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr  
121 wkvlrrfsvt tnrdfgmgkr sveerigeaa qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic  
181 sivfgkrfhy qdqe flkmmn lfyqtfslls svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlge  
241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt  
301 ettsttlryg filmlkyphv aervyreieq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs  
361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevl ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal  
421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttilqnfisma spvapedidl tpqecgwski  
481 pptyqirflp r

## Figura 1

1 minmgdshvd tsstvseava eevslfsmt d milfslivgl ltywflfrkk keevpeftki  
61 qtlitssvres sfvekmkktg rniivfygsq tgtaeefanr lskdahrygm rgmsadpeey  
121 dladlsslpe idnalvvfcm atygegdptd naqdfydwlq etdvdlsgvk favfglgnkt  
181 yehfnamgky vdkrleqlga qrifelglgd ddgnleedfi twregfwpav cehtgveatg  
241 eessirqyel vvhtdidaak vymgemgrlk syenqkppfd aknpflaavt tnrklnqgte  
301 rhlmhleldi sdskiryesg dhvavypand salvnqlgki lgadldvms lnnldeesnk  
361 khpfpcptsy rtalyyldi tnprrtnvly elaqyaseps egellrkmas ssggekelyl  
421 swvvearrhi lailqdcpsl rppidhlcel lprlqaryys iassskvhpn svhicavvve  
481 yetkagrink gvatnwlrak epagenggra lvpmfvrksq frlpfkattp vimvgpgtg  
541 apfigfiger awlrqqgkev getllyygcr rsdedylyre elaqfhrdga ltqlnvafsr  
601 eqshkvyvqh llkqdrehlw klieggahiy vcgdarnmar dvqntfydiv aelgamehaq  
661 avdyikkimt kgryslvws

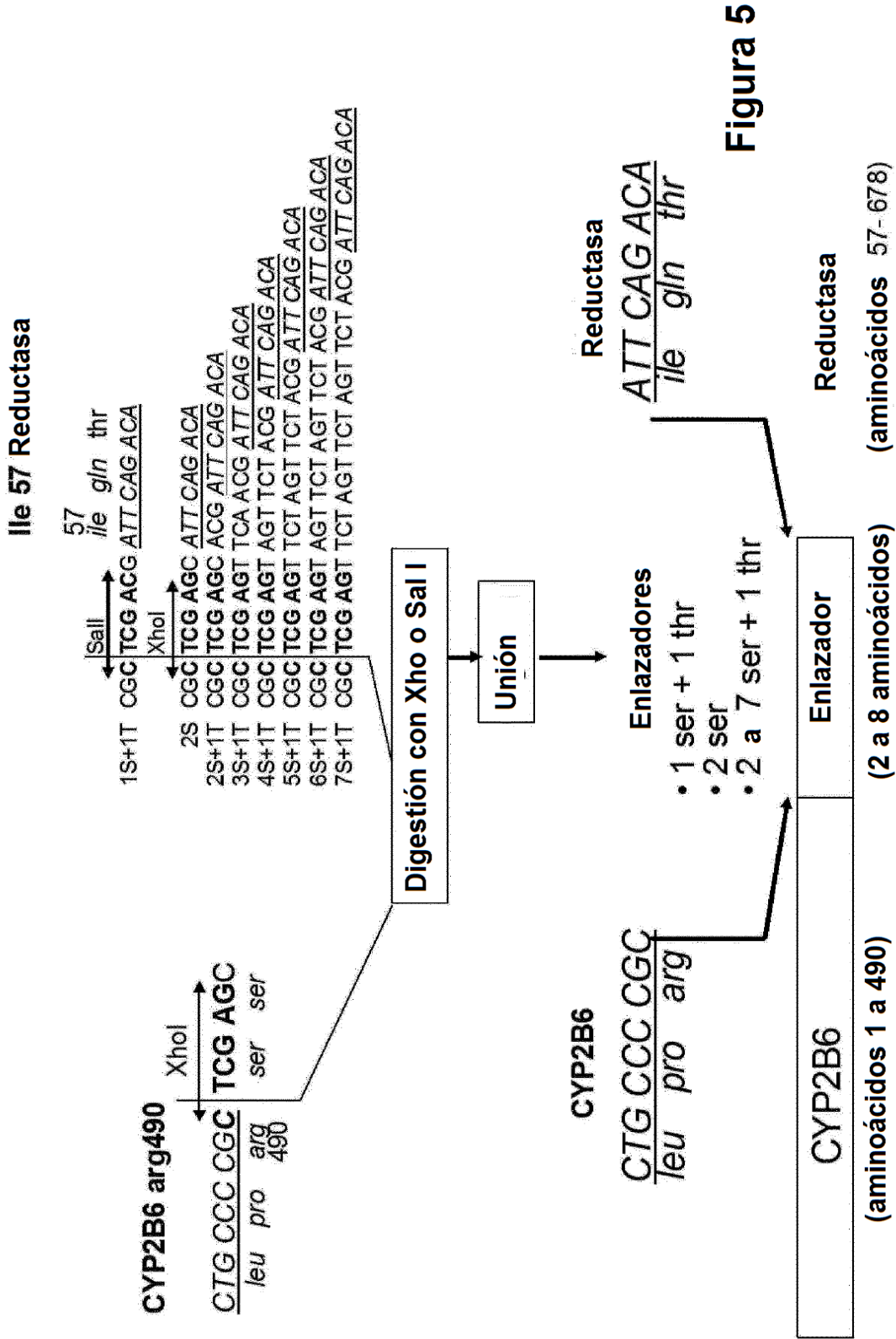
## Figura 2

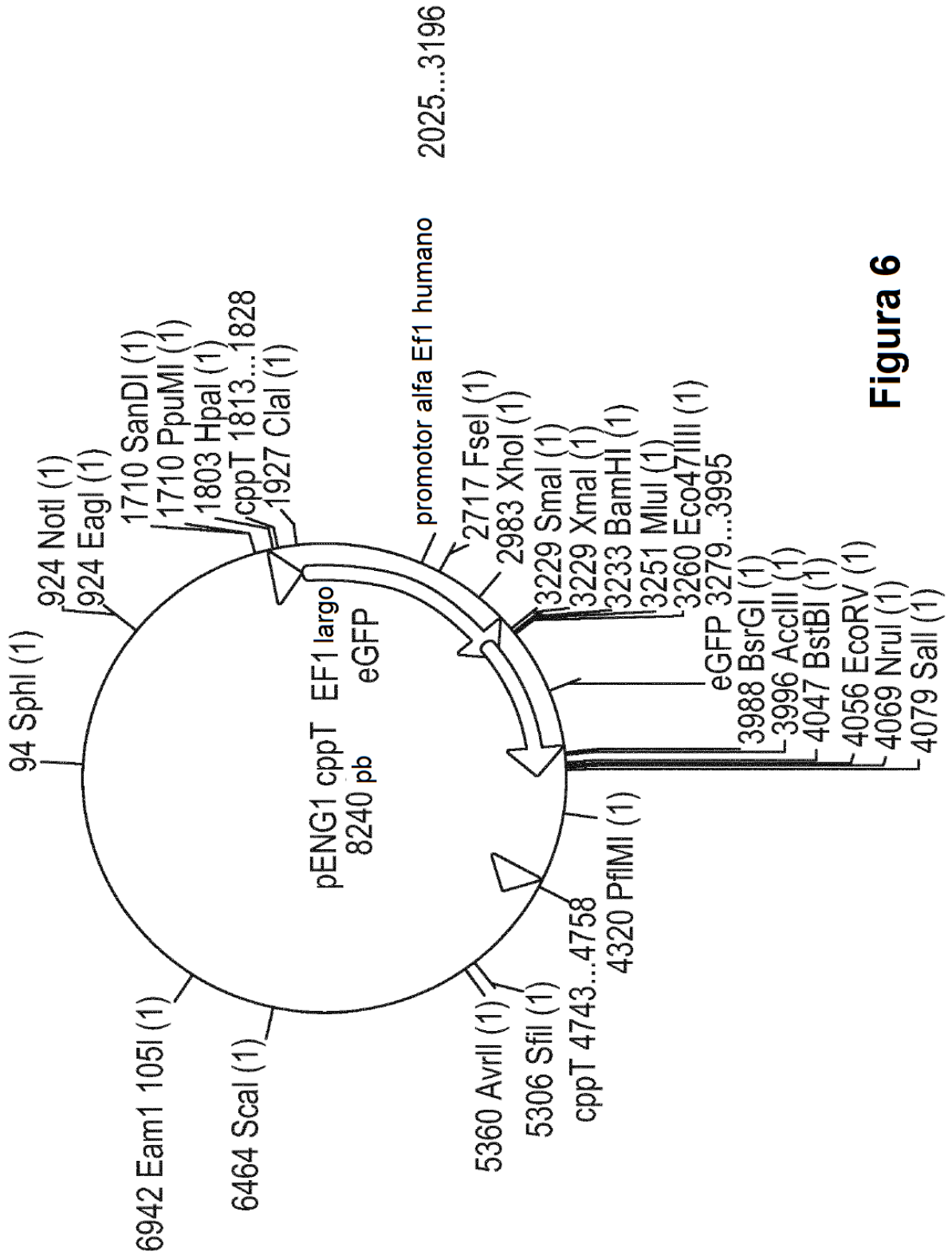
1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdrl ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre  
61 kygdvftvhl gprpvvmlcg veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr  
121 wkvlrrfsvt tmrdfgmgkr sveeriqeea qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic  
181 sivfgkrfhy qdqeflkmmn lfyqtfslis svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlqe  
241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt  
301 ettsttlryg fillmkyphv aervyreieq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs  
361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevfll ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal  
421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttillqnfsma spvapedidl tpqecgwski  
481 pptyqirflp sssstsmtd milfslivgl ltywflfrkk keevpeftki qtlstsvres  
541 sfvekmkktg rniivfygsq tgtaeefanr lskdahrygm rgmsadpeey dladlsslpe  
601 idnalvvfcm atygegdptd naqdfydlwq etdvdlsqvk favfglgnkt yehfnamgky  
661 vdkrleqlga grifelglgd ddnleedfi twreqfwpav cehtgveatg eessirgyel  
721 vvhtdidaak vymgemgrlk syengkppfd aknpflaavt tnrklnqgte rhlmhleldi  
781 sdskiryesg dhvavypand salvnqlgki lgadldvms lnnldeesnk khpfpcptsy  
841 rtaltyyldi tnprrtnvly elaqyaseps egellrkmas ssggekelyl swvvearrhi  
901 lailqdcpsl rppidhlcel lprlqaryys iassskvhpn svhicavvve yetkagrink  
961 gvatnwlrak epagenggra lvpmfvrksq frlpfkattp vimvgpgtg v apfigfiger  
1021 awlrqqgkev getllyygr rsdedylyre elaqfhrdga ltqlnvafsr eqshkvyvqh  
1081 llkqdrehlw klieggahiy vcgdarnmar dvqntfydiv aelgamehaq avdyikkllmt  
1141 kgryslav

### Figura 3

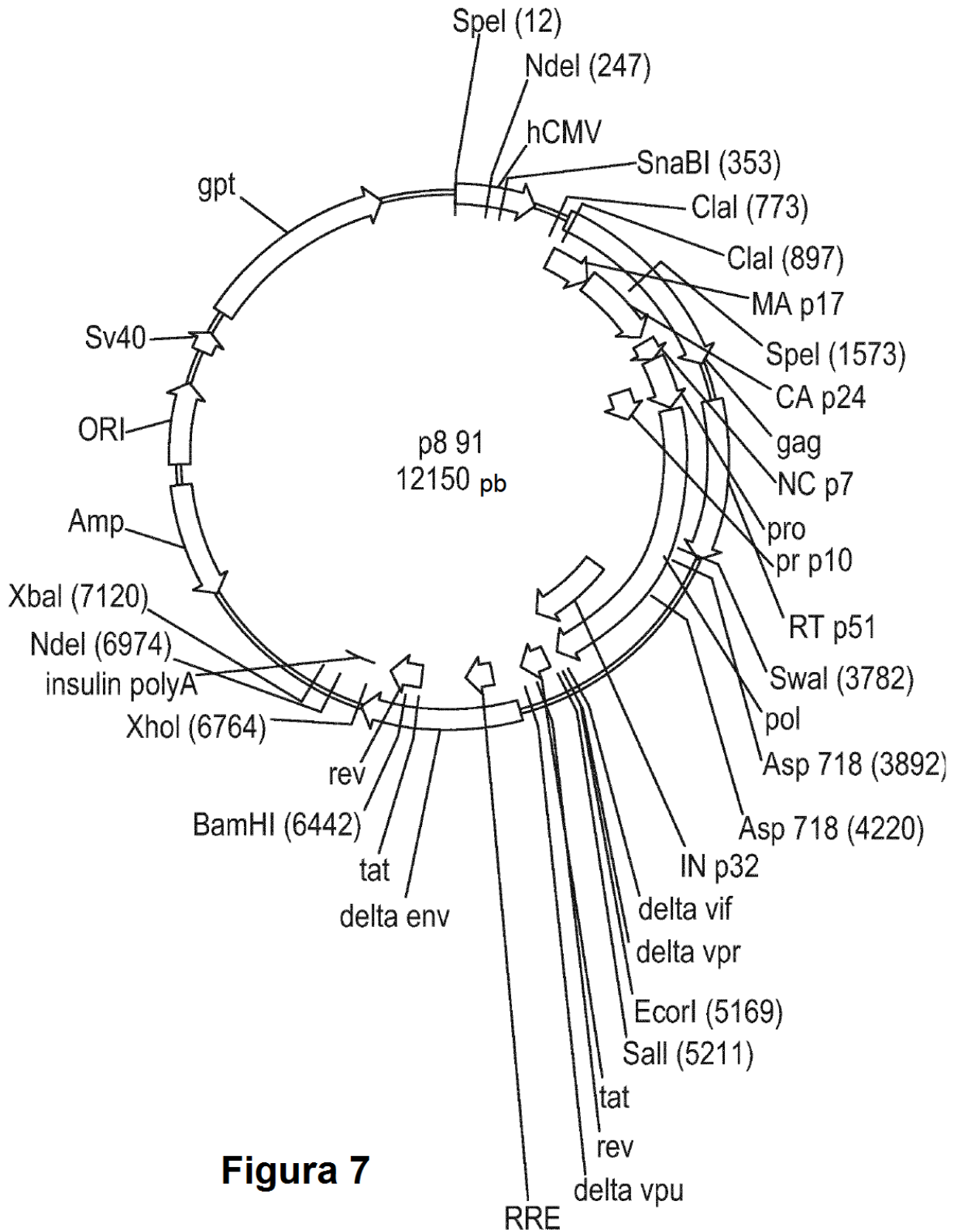
1 melsvllfla lltglllllv qrhpnthdrl ppgprplpll gnllqmdrrg llksflrfre  
61 kygdvftvhl gprpvvmlcg veairealvd kaeafsgrgk iamvdpffrg ygvvfangnr  
121 wkvlrrfsvt tmrdfgmgkr sveeriqeea qclieelrks kgalmdptfl fqsitaniic  
181 sivfgkrfhy qdqeflkmmn lfyqtfslis svfgqlfelf sgflkyfpga hrqvyknlqe  
241 inayighsve khretldpsa pkdlidtyll hmekeksnah sefshqnlnl ntlslffagt  
301 ettsttlryg fillmkyphv aervyreieq vigphrppel hdrakmpyte aviyeiqrfs  
361 dllpmgvphi vtqhtsfrgy iipkdtevfll ilstalhdph yfekpdafnp dhfldangal  
421 kkteafipfs lgkriclgeg iaraelflff ttillqnfsma spvapedidl tpqecgwski  
481 pptyqirflp r

### Figura 4

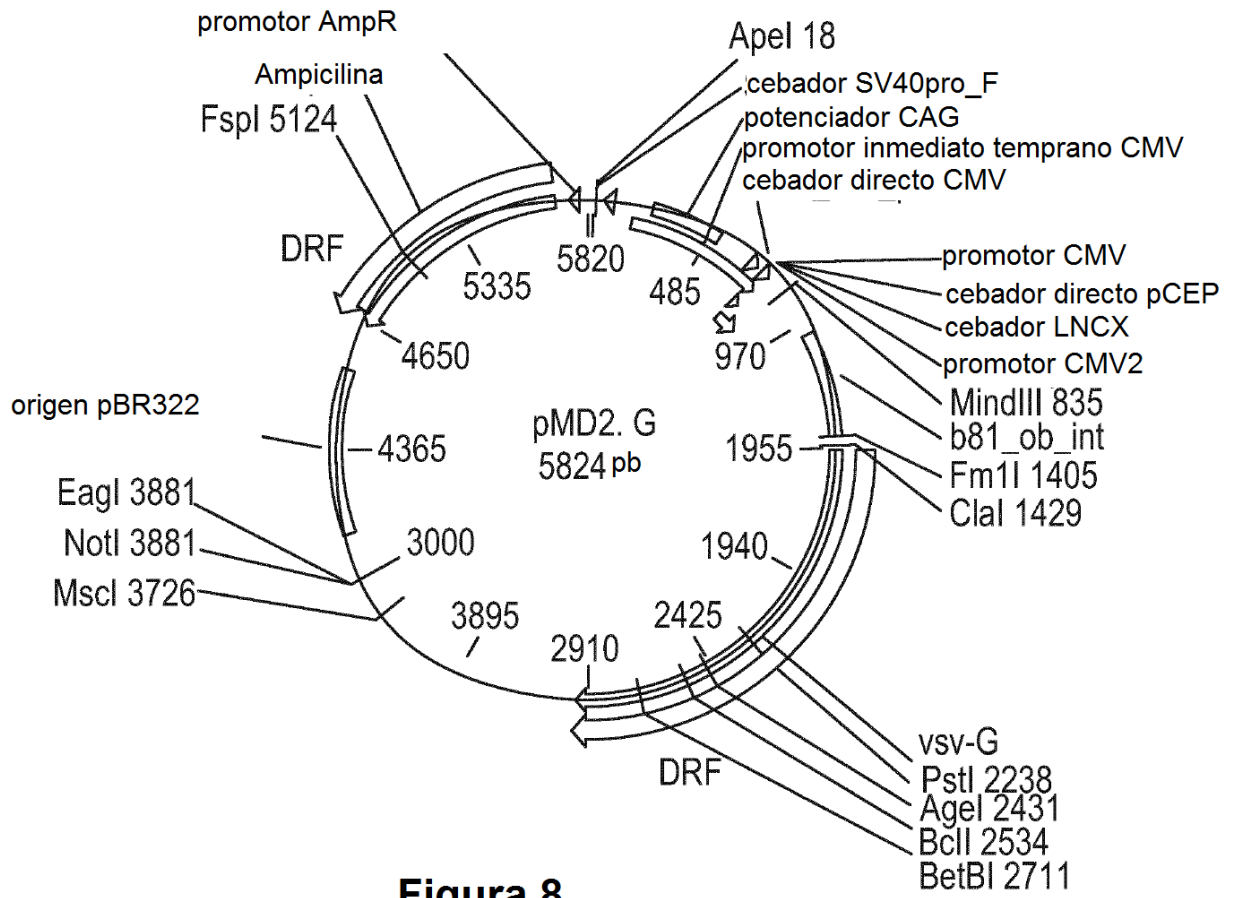




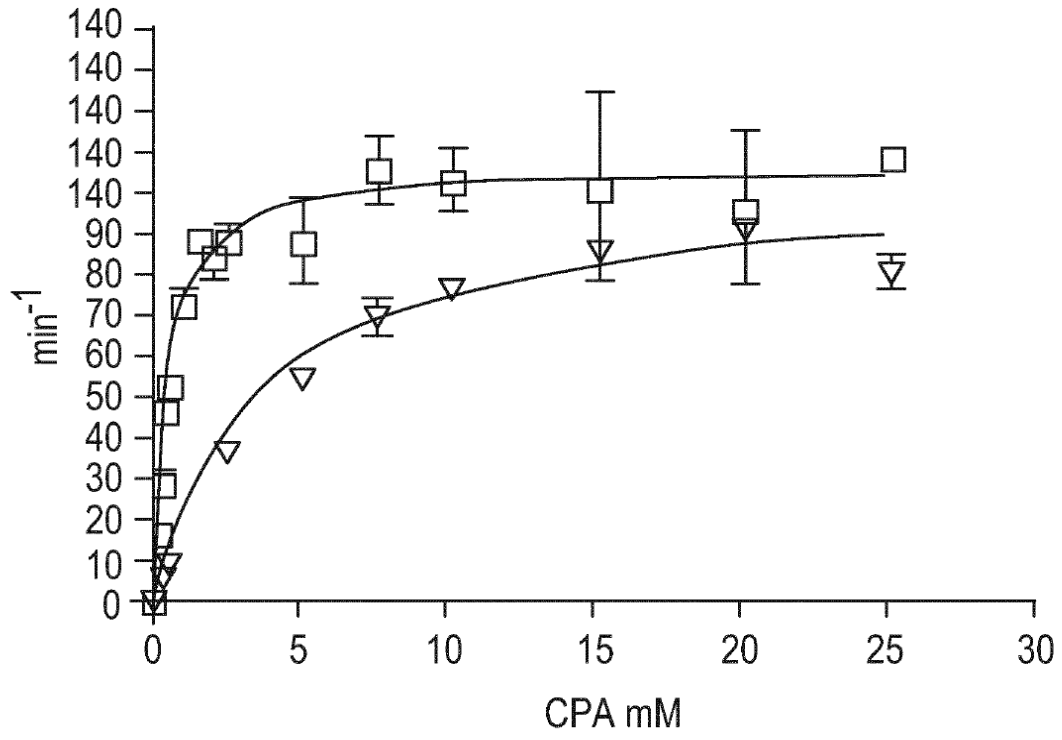
**Figura 6**



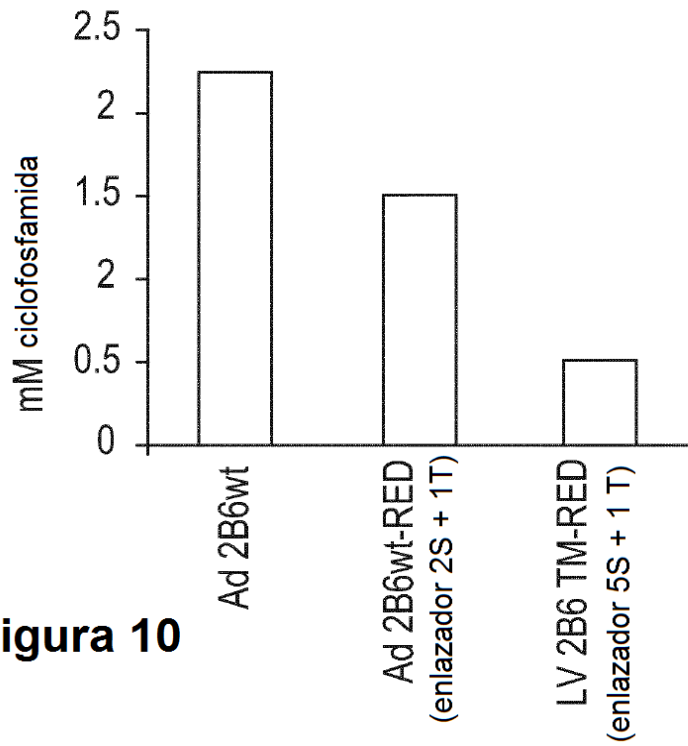








**Figura 9**



**Figura 10**

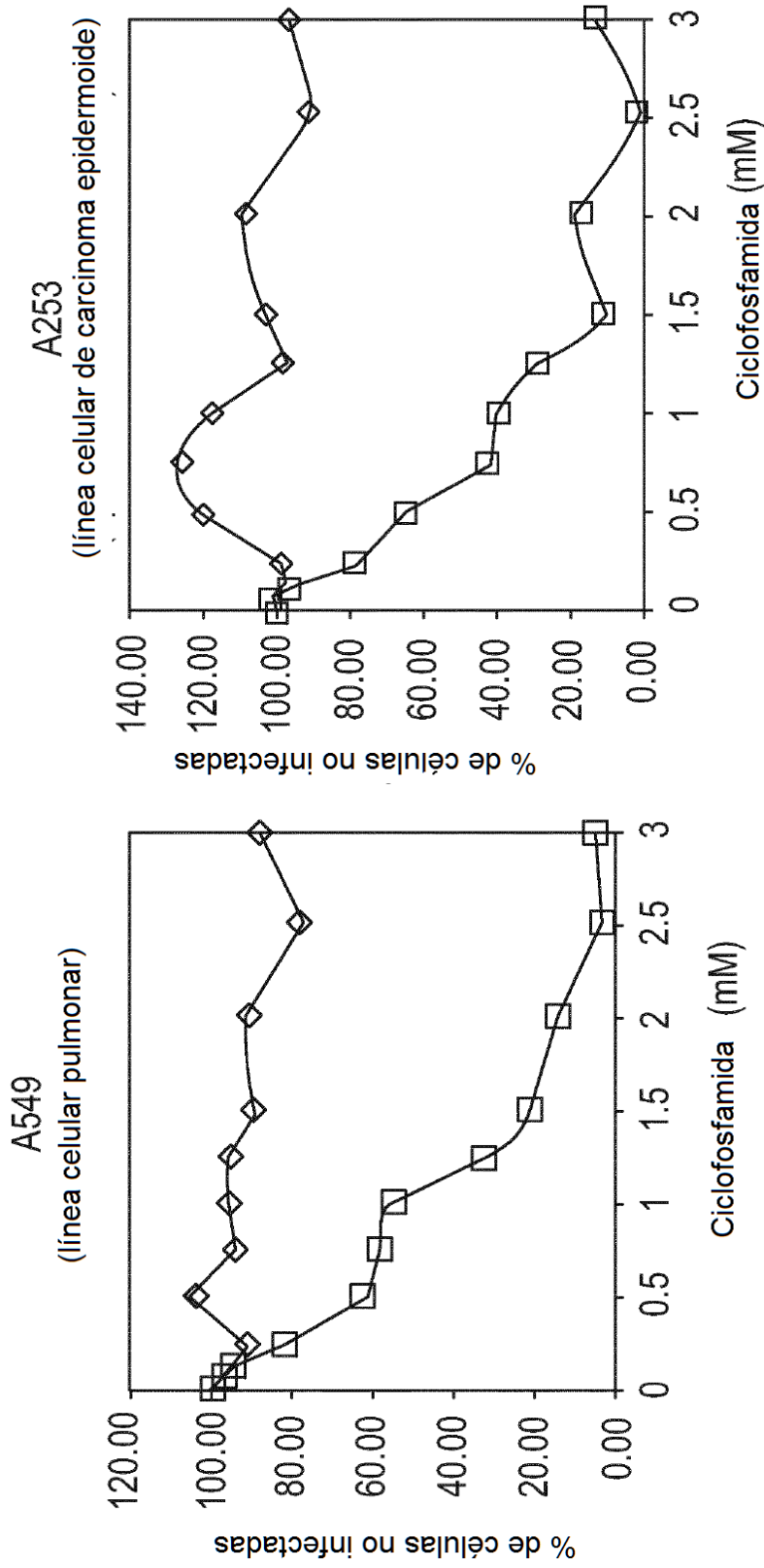
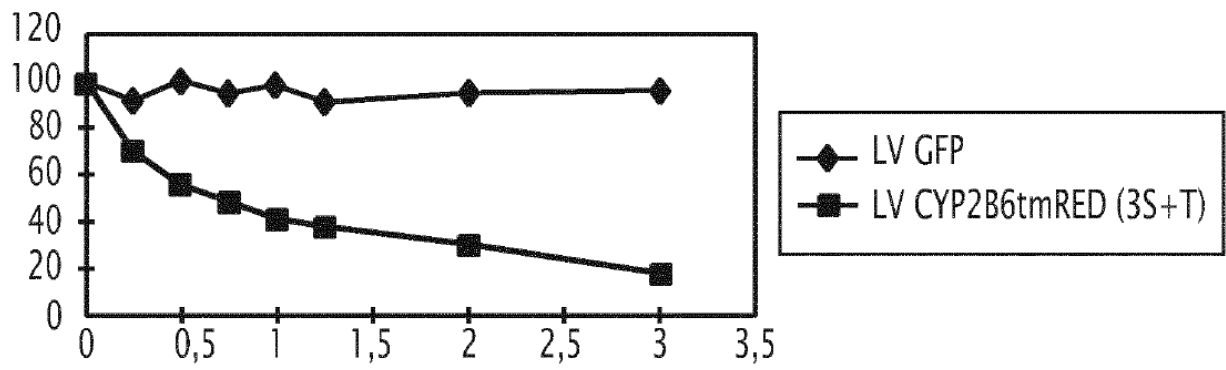
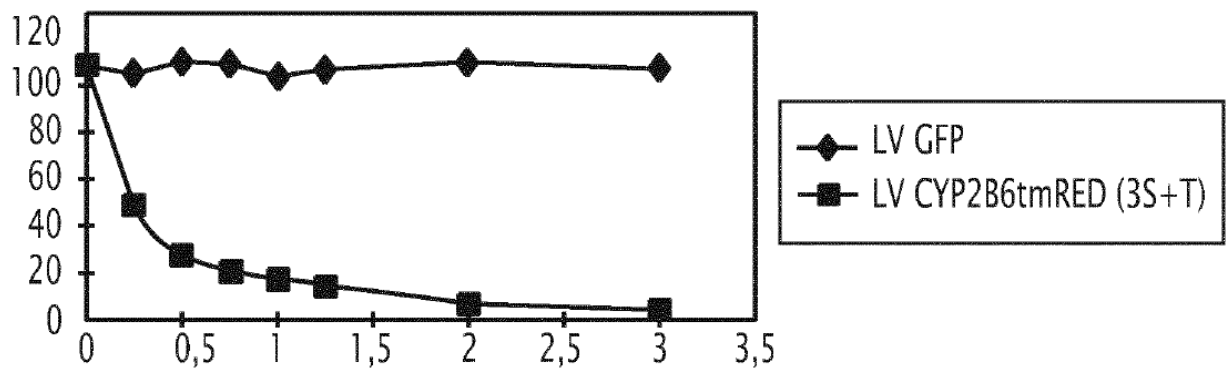


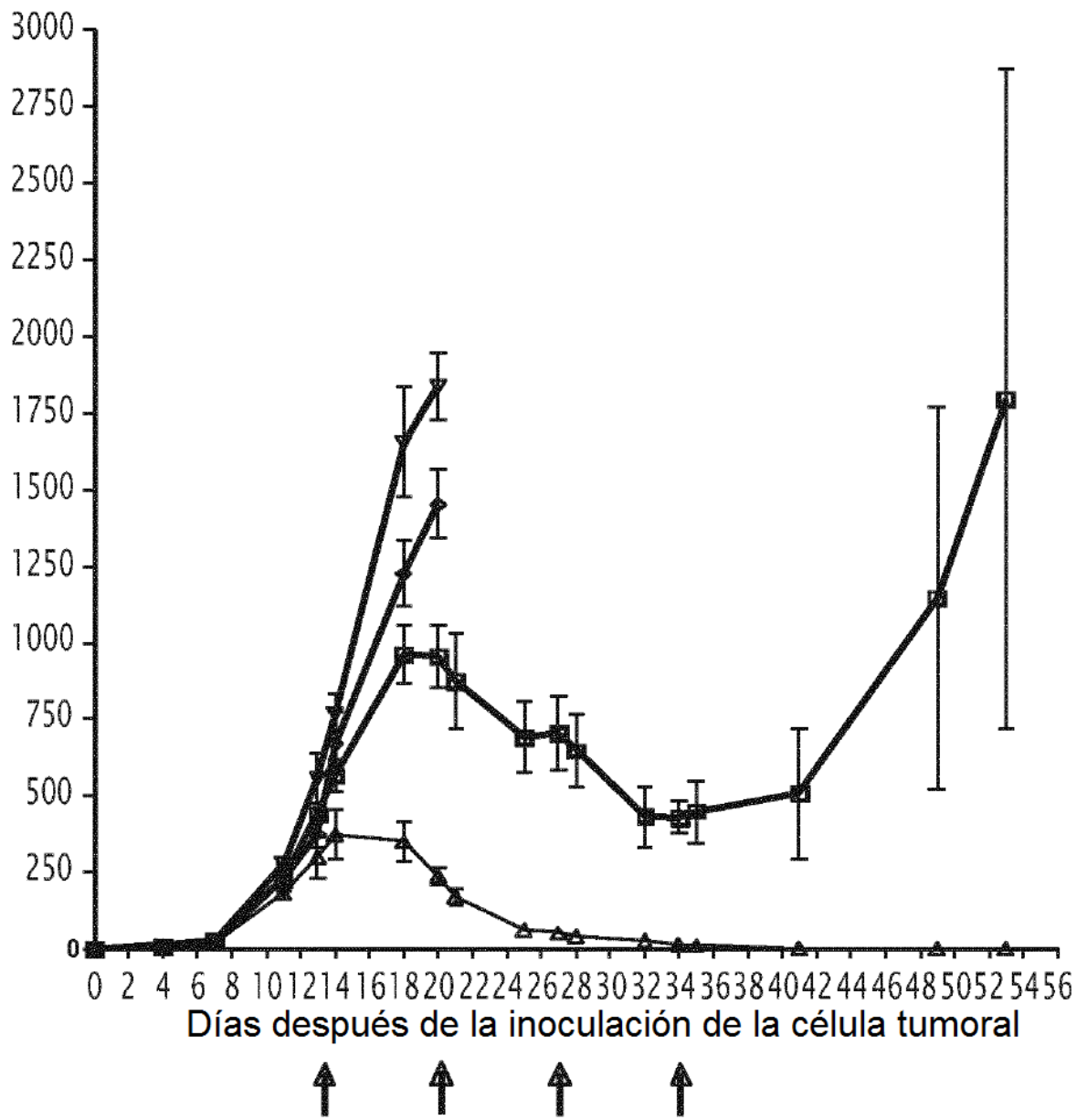
Figura 11



**Figura 12**



**Figura 13**



**Figura 14**